UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JAQUELINE REGINATO KOSER

Efeitos da meliponicultura na diversidade genética de *Melipona quadrifasciata* 1836 (Apidae, Meliponini) na região sul do Brasil

Ribeirão Preto, SP
2019

JAQUELINE REGINATO KOSER

Efeitos da meliponicultura na diversidade genética de *Melipona quadrifasciata* 1836 (Apidae, Meliponini) na região sul do Brasil

Tese apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutorado em Ciências.

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Área de Concentração: Genética.

Orientador: Tiago Maurício Franco

Ribeirão Preto, SP
2019

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

Koser, Jaqueline Reginato

Efeitos da meliponicultura na diversidade genética de *Melipona quadrifasciata* 1836 (Apidae, Meliponini) na região sul do Brasil. Ribeirão Preto, 2019.
161p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Francoy, Tiago Maurício

1. Abelhas sem Ferrão. 2. Unidades de manejo. 3. Conservação. 4. Diversidade genética. 5. Estruturação populacional.

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, com concessão de bolsas de estudos vinculadas ao Programa de Excelência Acadêmica (Proex). Número do processo do CNPQ: 141399/2015-5.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Koser, Jaqueline Reginato

Título: Efeitos da meliponicultura na diversidade genética de *Melipona quadrifasciata* 1836 (Apidae, Meliponini) na região sul do Brasil.

Tese apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutorado em Ciências.

Área de Concentração: Genética.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.(a)Dr.(a) _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a)Dr.(a) _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a)Dr.(a) _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a)Dr.(a) _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a)Dr.(a) _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

“Ao contrário de um engenheiro, que se preocupa em fazer uma combinação de elementos especialmente desenhados com um propósito, o funileiro trabalha com os elementos que estão à mão”.

François Jacob, sobre evolução biológica.

“Mel é como poder e trono; crie abelhas se você deseja poder”.

Provérbio da cultura Fon.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, Tiago Maurício Franco, que aceitou este projeto. Ao Departamento de Genética, especialmente à Susie Nalon e Silvia Consiglieri, e aos professores.
- Ao financiamento do CNPq, que permitiu a realização deste projeto, o meu sustento durante este período e a participação no EurBee 2018.
- Ao Centro de Psicologia Aplicada – CPA, USP, pelo atendimento gratuito durante dois anos.
- Aos colegas do Apilab, Vanessa Bonatti, Claudinéia Pereira Costa, Joyce Mayra, Priscila Cardoso, Clycie Machado, Elisa Cimitan Mendes, Patricia Gomes Pinhal, Rogério Pereira e Marina Lopes Grassi Sella, pela vívida convivência.
- Este trabalho foi feito com os produtores e para os produtores. Dentre eles, que foram muitos, destacam-se os que se expuseram, doaram as amostras e permitiram que entrássemos em suas casas: Diana Feldhaus e Luiz Miguel Rech, Vanessa Boeing e Juca, Suzana Schueroff e Gordo, Valério Defrein, Hiury e Guido Defrein, Felipe Brush, Irineu Nack, os Schmidt, Rodrigo Fronza, José Carlos Rodrigues, Wladimir Manzan, Adriano Joni, José Carlos Wegninoski, Alan dos Santos, Marco Masc, Antônio Xavier, Luiz Campagnolo, Cleiton Geuster, Sigfrid Fromming, Samuel Klein, Jorge Filippi, Cleudenir Oliveira, Giovani e Roseli Tessari, Benedito Antônio, Felix, Tiago Nunes e seu irmão, Harold Brand, Artur Favareto, João Scremim, Isaías Dino, Diego Vedovato, Miguel e Margarida Marques, Joel Schmid, João de Paula e Oldenir Nowack.
- Aos que nos deram aconchego de onde dormir e algumas refeições: Diana Feldhaus e Luiz Miguel Rech, Geraldo e Judite Tessari, Giovani e Roseli Tessari, Joel Schmid, Miguel e Margarida Marques e Maria Pozzan.
- Aos que conversaram, indicaram, e se ofereceram para ajudar: Alexandre Korte, Maicon Coelho, Jaime Souza, Jean Locatelli, Felipe Francisco, Tancredo Ronska, Joel Farias, Eliseu Droszak, Matheus Kochemborguer, Cleumar Liebert, Alceu Lima, Cleber Murari. Em especial ao Sebastião Gonzaga, que por telefone e e-mail indicou pessoas importantes no Paraná, e acompanha o progresso do estudo com muito interesse.

- Ao Francisco Estevão Carneiro e Karolin Wagner, com muito carinho, que são parceiros de vida e foram meus parceiros de campo deste trabalho.
- Ao Ivan de Castro por ceder uma amostra proveniente do estado de Minas Gerais e ao técnico Jairo de Souza e Dora Yovanna Barrios-Leal pela ajuda quando necessário.
- À Maura Helena Manfrin, Zilá Simões, Marcia Bittondi, Vera Figueiredo e Ana Lilia Alzate-Marin, que cederam seus laboratórios e reagentes quando preciso. À Vanessa Bonatti, Rômulo Moraes, Fernando Lopes e Rodolpho Menezes que contribuíram com sugestões e discussões. À Natácia Evangelista de Lima, pela revisão criteriosa.
- Ao Fabrício Henrique Simozo pelo carinho, atenção e diversas revisões do texto.
- Ao professor Dr. David de Jong pela revisão do manuscrito proveniente deste documento.
- Aos amigos de Ribeirão Preto e de longe. Aos novos amigos que encontrei nesta fase e (me) ensinam o tempo todo nas escolas Dom Alberto José Gonçalves, Professora Nair Guilhermina e Rafael Leme Franco.
- Ao meu mestre Geraldo Moretto, que me apresentou às abelhas e foi meu primeiro orientador em genética. À Lucia Sevegnani, que me disse que conservação só se faz com as pessoas.

RESUMO

KOSER, JAQUELINE REGINATO. **Efeitos da meliponicultura na diversidade genética de *Melipona quadrifasciata* 1836 (Apidae, Meliponini) na região sul do Brasil**. 2019. 161f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Espécies de abelhas sem ferrão são criadas e manejadas por hobbistas ou para exploração comercial de colônias e subprodutos. Normalmente, estas abelhas são mantidas em meliponários e estão sujeitas a práticas de manejo, como multiplicação artificial das colônias e transporte entre populações, de modo que este estoque pode, ao mesmo tempo, interagir com abelhas selvagens. Em virtude deste manejo, pode haver distúrbios na diversidade genética da espécie. O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição da diversidade genética de *Melipona quadrifasciata* mantida por meliponicultores da região sul do Brasil, através de marcadores de microssatélites e DNA mitocondrial. As hipóteses testadas foram: 1) a diversidade genética dos meliponários reflete o estoque natural e a estruturação populacional da região do meliponário; 2) colônias introduzidas podem ser identificadas; 3) meliponários onde ocorre multiplicação de colônias apresentam endogamia. Nossos resultados evidenciam como cada prática de manejo influencia na diversidade local e na estruturação das populações. A diversidade genética encontrada na amostragem total de abelhas manejadas foi compatível com a estimada em outros estudos de populações naturais da espécie, porém distribuída de forma heterogênea. Observamos que meliponários que se dedicam à multiplicação de colônias de maneira mais intensa exibem sinais de endogamia. Também encontramos haplótipos de diferentes origens distantes em meliponários que realizam a introdução de colônias, sendo capaz de descaracterizar a diversidade local e resultando em homogeneização das frequências alélicas. Não foi possível encontrar estruturação populacional. Porém, um gradiente genético foi encontrado com os marcadores de microssatélites, e o mtDNA indica o deslocamento geográfico de rainhas, com introdução de haplótipos do sudeste do sul do país. A diferenciação populacional e o Isolamento por Distância encontrados aqui não são suficientes para classificar populações ou delimitar Unidades de Manejo baseado em fluxo gênico natural. Nós sugerimos que os esforços na preservação da diversidade foquem na regulação das práticas de manejo, possibilitando o fluxo gênico através da preservação de fragmentos naturais de vegetação, e o manejo da diversidade ocorra dentro de regiões geográficas pequenas, como macrorregiões estaduais, que refletem cenários sociopolíticos e geográficos, já utilizadas em outros planos ambientais.

Palavras chave: 1. Abelhas sem Ferrão. 2. Unidades de manejo. 3. Conservação. 4. Diversidade genética. 5. Estruturação populacional.

ABSTRACT

KOSER, JAQUELINE REGINATO. **Beekkeeping effects in *Melipona quadrifasciata* 1836 (Apidae, Meliponini) genetic diversity in southern Brazil.** 2019. 161f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Social stingless bees have been manipulated by man since the pre-European civilization era; management practices include artificial colony division/multiplication and nest transport. We evaluated the effects of common management practices on the genetic diversity of *Melipona quadrifasciata* within its native range in southern Brazil. The proposed research hypotheses are: 1) Genetic diversity in meliponaries reflects natural variation and population genetic structuring; 2) Migrant nests can be identified; 3) Meliponaries in which colonies are artificially divided suffer from inbreeding. We employed microsatellite and mitochondrial DNA markers to test these hypotheses. The genetic diversity in our sample was compatible with that of feral populations investigated by other researchers, although this diversity was heterogeneously distributed. We observed that meliponaries subjected to intensive colony multiplication exhibited signs of inbreeding. We also found haplotypes of various origins in meliponaries into which colonies had been introduced, which affected local diversity and resulted in the homogenization of allele frequencies in various regions. Although no genetic structuring was observed, a clinal genetic differentiation was found based on microsatellite markers. The mtDNA analyses showed geographic displacement of the queens, in addition to the introduction of haplotypes from the southeastern region of the country. Population differentiation and isolation by distance could not be used to effectively delimit management units based on natural gene flow. We suggest that efforts to preserve genetic diversity should focus on regulating management practices, allowing gene flow only via natural vegetation fragments, and that diversity management should focus on local regions, reflecting geographic and sociopolitical scenarios already utilized in other environmentally oriented natural population management plans.

Keywords: 1. Stingless bees. 2. Management Units. 3. Conservation. 4. Genetic diversity. 5. Population structure.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Distribuição geográfica dos meliponários amostrados nos estados de Santa Catarina e Paraná. ● Meliponários com presença apenas de *Melipona quadrifasciata* (MQQ). ▲ Meliponários com histórico conhecido de presença de *Melipona quadrifasciata* antidioides (MQA). Paraná: Santo Antônio da Platina e Cambará (SAPCAM); Pato Branco (PBr); Prudentópolis (Pru); Curitiba (Cur); Campo Magro (CMA); Mandirituba (Man); Morretes (Mor) e Quatro Barras (QBa). Santa Catarina: Jaraguá do Sul e Guaramirim (JDSGua); Mafra (Maf); Campo Alegre (CAI); Rio Negrinho e São Bento do Sul (RNeSBS); Blumenau (Blu); Rio do Sul e Aurora (RDSAur); Santa Rosa de Lima (SRL); Armazém (Arm); Herval d'Oeste (HDO); Luzerna (Luz) e Xanxerê (Xan)..... 43
- Figura 2: Mapa do Brasil mostrando em amarelo as localidades de coleta de *Melipona quadrifasciata* por Batalha Filho et al., (2010) usadas para a construção de uma rede de haplótipos com sequências do gene COI juntamente com as amostras deste estudo, em preto..... 53
- Figura 3: Dendograma UPGMA gerado por análise dos marcadores de microssatélites para as 16 populações de *Melipona quadrifasciata* do sul do Brasil..... 58
- Figura 4: Análise de estruturação mostrando $k = 2$ realizada com marcadores STR de *Melipona quadrifasciata*..... 60
- Figura 5: Mapa de distribuição das proporções de cada *cluster* calculado por análise de estruturação genética e ancestralidade de *Melipona quadrifasciata* do sul do Brasil, realizado com marcadores de microssatélite. As cores correspondem à análise gerada pelo programa Structure..... 61
- Figura 6: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseado em marcadores de microssatélites das localidades criadoras de *Melipona quadrifasciata* no sul do Brasil. As cores são correspondentes ao *cluster* com maior frequência de indivíduos de cada população determinado por Structure..... 62
- Figura 7: Rede de haplótipos do gene mtDNA COI de *Melipona quadrifasciata*. O tamanho dos círculos representa o número de amostras contendo este haplótipo e os

pontos azuis sem identificação representam passos mutacionais não amostrados. A
liste de haplótipos está na Tabela 7 do Apêndice 65

Figura 8: Mapa do sul do Brasil com a distribuição dos 23 haplótipos de COI mtDNA
de *Melipona quadrifasciata* encontrado distribuídos em 14 localidades. Os círculos
representam a frequência de cada haplótipo na localidade e não expressam tamanho
amostral. Os pontos pretos representam locais amostrados, mas que não tiveram as
amostras sequenciadas para o gene COI..... 66

Figura 9: Dendograma UPGMA gerado por análise do gene COI de *Melipona
quadrifasciata* do sul do Brasil. O comprimento do braço é proporcional ao número
de substituições nucleotídicas..... 67

Figura 10: A estruturação populacional do gene COI de *Melipona quadrifasciata* mostra
que existem 4 grupos genéticos separados por cores: A) Vermelho, presentes no
Paraná e predominantes em Santa Catarina, B) Verde, de amostras do Paraná, C)
Azul, do Paraná e norte de Santa Catarina, e D) Amarelo, para haplótipos de origem
MQA..... 69

Figura 11: Rede de haplótipos de *Melipona quadrifasciata* colorida conforme a
indicação de estruturação populacional mostrando que existem 4 grupos genéticos
separados por cores: A) Vermelho, presentes no Paraná e predominantes em Santa
Catarina, B) Verde, de amostras do Paraná, C) Azul, do Paraná e norte de Santa
Catarina, e D) Amarelo, para haplótipos de origem MQA..... 70

Figura 12: Distribuição geográfica dos haplótipos de *Melipona quadrifasciata* colorida
conforme a indicação de estruturação populacional que mostra 4 grupos genéticos:
A) Vermelho, presentes no Paraná e predominantes em Santa Catarina, B) Verde,
de amostras do Paraná, C) Azul, do Paraná e norte de Santa Catarina, e D)
Amarelo, para haplótipos de origem MQA..... 71

Figura 13: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseados em sequências do gene
COI de *Melipona quadrifasciata* criadas no sul do Brasil. As cores correspondem à
análise de estruturação: A) Vermelho, presentes no Paraná e predominantes em
Santa Catarina, B) Verde, de amostras do Paraná, C) Azul, do Paraná e norte de
Santa Catarina, e D) Amarelo, para haplótipos de origem MQA..... 73

- Figura 14: Rede de haplótipos de *Melipona quadrifasciata* obtida com sequências do gene COI de amostras do presente estudo e de Batalha-Filho et al., 2010. Os grupos obtidos pelo presente estudo estão coloridos como segue: Vermelho para Grupo A, Verde para Grupo B, Azul Grupo C e Amarelos para Grupo D. As demais amostras estão coloridas por estado de origem, conforme legenda..... 74
- Figura 15: Análise de estruturação genética e ancestralidade de populações de *Melipona quadrifasciata* provenientes de toda a área de ocorrência da espécie. Localidades em negrito constituem as amostras obtidas pelo presente estudo. *Agrupamentos de localidades próximas..... 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição geográfica de coleta e análise de <i>Melipona quadrifasciata</i> . Município visitado, seu código, coordenada geográfica e número de meliponicultores visitados. Quantidade de colônias amostradas e analisadas quanto ao gene COI e microssatélites.....	44
Tabela 2: Meliponários amostrados nos estados de Santa Catarina e Paraná. Cada meliponário recebeu um código de identificação e teve dados como ano de estabelecimento, número de colônias de <i>Melipona quadrifasciata</i> amostradas, o tipo de manejo empregado e a matriz ambiental no qual está inserido.....	45
Tabela 3: Característica dos <i>loci</i> de microssatélite utilizados. Ta: temperatura de pareamento. Te: tamanho do fragmento esperado, em pares de base.....	46
Tabela 4: Medidas de variabilidade genética de <i>Melipona quadrifasciata</i> por <i>locus</i> . Número de amostras (N), Número de alelos (A), Heterozigosidade observada (Ho) e Esperada (He), adesão ao equilíbrio de HW (com correção de Bonferroni), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), Alelos nulos (F _{eqNull}) e Índice de Fixação (F _{is}) por <i>locus</i>	55
Tabela 5: Populações de <i>Melipona quadrifasciata</i> em que foram detectados desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada um dos <i>locus</i>	55
Tabela 6: Medidas de diversidade genética das populações de <i>Melipona quadrifasciata</i> do sul do Brasil. Tamanho amostral (N), a porcentagem de loci polimórficos (P), número médio de alelos após rarefação (Ar), número de alelos efetivos (Na), média de alelos privados (PAS), heterozigosidade observada (Ho) e esperada não enviesada (uHe), o índice de fixação (F _{is}), e o número efetivo populacional (Ne), com os respectivos valores de erro padrão (SD).....	57
Tabela 7: Comparações par a par de valores de F _{st} obtidos com 5 marcadores de microssatélites entre populações de <i>Melipona quadrifasciata</i> do sul do Brasil.....	59
Tabela 8: Amova hierárquica de marcadores microssatélites de <i>Melipona quadrifasciata</i> do sul do Brasil. A separação das localidades em dois grupos foi realizada de acordo com a separação proposta pelas análises de estruturação Structure e PCoA	63

Tabela 9: Medidas de diversidade genética de populações de <i>Melipona quadrifasciata</i> do sul do Brasil. Localidade, número amostral (N), número de haplótipos (H), número de sítios segregantes (S), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (Pi), número médio de diferenças nucleotídicas (k).....	64
Tabela 10: Comparações par a par de valores de Fst obtidos com sequências do gene COI entre populações de <i>Melipona quadrifasciata</i> do sul do Brasil.....	68
Tabela 11: AMOVA global das sequências de mtDNA COI de <i>Melipona quadrifasciata</i> provenientes do sul do Brasil.....	72
Tabela 12: Valores de Fst par a par das sequências de mtDNA COI de <i>Melipona quadrifasciata</i> das populações recuperadas pelo BAPS.....	72
Tabela 13: Amova global das sequências de mtDNA COI de <i>Melipona quadrifasciata</i> de toda a distribuição da espécie, propondo quatro grupos conforme BAPS.....	75
Tabela 14: Valores de Fst par a par das sequências de mtDNA COI de toda a distribuição de <i>Melipona quadrifasciata</i> . Os grupos foram sugeridos por análise de estruturação. Amarelo: populações de Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ), Espírito Santo (ES), Sergipe (SE) e Bahia (BA). Verde: populações de Minas Gerais (MG) e Bahia (BA). Vermelho: populações de Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR).....	75

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. A Meliponicultura	18
2.2. Diversidade Genética em abelhas manejadas.....	19
2.3. Delimitação de unidades de manejo.....	26
2.4. Legislação ambiental e a meliponicultura	27
2.5. Marcadores moleculares em genética de população	33
2.5.1. <i>Marcadores microssatélites</i>	34
2.5.2. <i>Marcador mitocondrial</i>	35
2.6. Objeto de estudo: <i>Melipona quadrifasciata</i>	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1. Material biológico	39
3.2. Amplificação dos marcadores genéticos	46
3.2.1. <i>Microssatélites</i>	46
3.2.2. <i>MtDNA</i>	47
3.3. Análise dos dados.....	48
3.3.1 <i>Marcadores Microssatélites</i>	48
3.3.1.1. <i>Caracterização das localidades e distribuição geográfica da diversidade</i>	48
3.3.1.2. <i>Estruturação populacional</i>	49
3.3.1.3. <i>Atribuição de origem e Detecção de migrantes</i>	50
3.3.2. <i>MtDNA</i>	51
3.3.2.1. <i>Caracterização das localidades e distribuição geográfica da diversidade</i>	51
3.3.2.2. <i>Estruturação populacional e caracterização das populações genéticas</i>	52
4. RESULTADOS.....	54
4.1. Microssatélites.....	54
4.1.2. <i>Caracterização genética das localidades</i>	55
4.1.3. <i>Estruturação Populacional</i>	58
4.1.4. <i>Atribuição de origem e Detecção de migrantes</i>	63
4.2. DNA mitocondrial.....	63
4.2.1. <i>Caracterização genética das localidades e distribuição geográfica da diversidade</i>	63

4.2.2. Estruturação populacional.....	66
5. DISCUSSÃO	76
5.1. Diversidade	76
5.1.1. <i>Microsatélites</i>	76
5.1.2. <i>MtCOI</i>	77
5.2. Redução da diversidade: multiplicação de colônias	77
5.2.1. <i>Microsatélites</i>	77
5.2.2. <i>Gene mtCOI</i>	80
5.3. Aumento da diversidade: Transporte de colônias	80
5.3.1. <i>Microsatélites</i>	80
5.3.2. <i>MtCOI</i>	81
5.4. Homogeneização com o ambiente: Fluxo gênico mediado por machos	81
5.4.1. <i>Microsatélites</i>	81
5.5. Ausência de estruturação populacional	82
5.5.1. <i>Microsatélites</i>	83
5.5.2. <i>MtCOI</i>	84
5.6. Atribuição de origem e migrantes	86
6. CONCLUSÕES.....	89
7. REFERÊNCIAS	91
8. APÊNDICE	106
9. ANEXO.....	127

1. INTRODUÇÃO

Espécies americanas de abelhas sociais produtoras de mel e própolis estão sujeitas às práticas de manejo desde os tempos das civilizações pré-Colombianas (Palazuelos Ballivián, 2008; Negrín Muñoz, 2016). Atualmente, é estimada a ocorrência de cerca de cinco mil meliponicultores registrados no Brasil. Meliponicultores são considerados importantes para a manutenção da diversidade genética de abelhas nativas (Velthuis, Koedam, & Imperatriz-Fonseca, 2005; Gehrke, 2010; Jaffé *et al.*, 2015; Barbiéri, 2018).

Duas atividades não mutualmente exclusivas dirigem a diversidade genética em meliponários: a multiplicação e o transporte de colônias. Assim sendo, o papel ecológico dos meliponários é controverso. Há divergências na literatura se a manutenção artificial de abelhas reduz a diversidade genética local, ou se pode sustentar ou mesmo aumentar a diversidade genética da população (Harpur *et al.*, 2012; De La Rúa *et al.*, 2013). O transporte de colônias é responsável pela formação de híbridos, já descritos no Gênero *Melipona* (Nogueira *et al.*, 2014) e *Tetragonisca* (Francisco *et al.*, 2014). Entretanto, pode também manter e aumentar a diversidade genética (Chapman, Lim, & Oldroyd, 2008; Delaney *et al.*, 2009; Oxley & Oldroyd, 2009; Harpur *et al.*, 2012).

A seleção de matrizes para reprodução causa perda de linhagens genéticas que talvez reservem alelos raros ou únicos, e traços de adaptação local (Jensen *et al.*, 2005; de La Rúa *et al.*, 2009; Crispo *et al.*, 2011; Oleksa *et al.*, 2011). Alguns estudos sugerem que a domesticação é uma das causas da baixa diversidade genética encontrada em *Apis* sp., sendo parcialmente responsável pelo declínio global das populações de abelhas (Schiff, Sheppard, & Loper, 1994; Schiff & Sheppard, 1996; Oldroyd, 2007; vanEngelsdorp *et al.*, 2009, 2010; Jaffé *et al.*, 2010; Meixner *et al.*, 2010; Potts *et al.*, 2010; vanEngelsdorp & Meixner, 2010). Estudos com diferentes abelhas sem ferrão manejadas em comparação com populações selvagens confirmam esse distúrbio na constituição genética devido às práticas de manejo (Carvalho-Zilse & Kerr, 2006; Costa Pinto, 2007; Francini *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2014; Santiago *et al.*, 2016).

Ademais, a maior preocupação em Himenópteros é a perda de diversidade genética e de alelos sexuais (gene *feminizer*) devido endogamia. Endogamia reduz a heterozigosidade enquanto a deriva causa a perda de alelos raros (Witzemberger &

Hochkirch, 2011; Price & Hadfield, 2014; Willoughby *et al.*, 2015), que faz os organismos haplodiplóides mais vulneráveis à extinção do que outros organismos (Hasselman & Beye, 2004; Zayed, 2004; Zayed & Packer, 2005; Delaney *et al.*, 2009). Como ainda não há maneira direta de monitorar os alelos do gene *feminizer* no grupo de abelhas sem ferrão, a investigação da variabilidade genética em populações naturais e artificiais pode ser usada como um sinal da saúde dos ecossistemas e dos serviços de polinização (Carvalho, 2001; Zayed, 2004, 2009; Zayed, Roubik, & Packer, 2004; Zayed & Packer, 2005; Carvalho-Zilse *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2011; Francini, Nunes-Silva, & Carvalho-Zilse, 2012; Boff *et al.*, 2014).

A manutenção da diversidade natural em colônias comerciais deve ser um foco da meliponicultura, objetivando aumentar a sobrevivência da população e a manutenção de genótipos raros e geograficamente restritos, que podem abrigar traços moldados pela seleção natural (de La Rúa *et al.*, 2009; Tarpy, Vanengelsdorp, & Pettis, 2013). Uma solução para monitorar a diversidade genética de populações selvagens e comerciais é a delimitação de Unidades de Manejo (*Management Units* – MUs). É recomendado que o planejamento de manejo ocorra no menor nível praticável possível (Linnell, 2005) e represente o fluxo gênico atual da espécie (Palsbøll, Bérubé, & Allendorf, 2007; Wasser *et al.*, 2008; Ogden, Dawnay, & McEwing, 2009; Alacs *et al.*, 2010; López-Urbe, Soro, & Jha, 2017).

A abelha sem ferrão *Melipona* (*Melipona*) *quadrifasciata* Lepeletier, 1836 é uma das mais cultivadas do Brasil (Gehrke, 2010; Barbiéri, 2018). É especialmente valiosa na polinização de lavouras como tomate, abóbora, pitanga, café, açaí e goiaba (del Sarto, Peruquetti, & Campos, 2005; Bispo dos Santos *et al.*, 2009; Giannini *et al.*, 2015) e de maçãs, quando associado com *A. mellifera* (Viana *et al.*, 2014), enquanto produz mel e própolis (Mercês *et al.*, 2013; Giannini *et al.*, 2015).

Tradicionalmente, *M. quadrifasciata* é dividida em duas subespécies de acordo com o padrão metassomal de listras abdominais. Há forte estruturação populacional e baixo compartilhamento de haplótipos mitocondriais entre *M. quadrifasciata quadrifasciata* (Lepetier) (MQQ) e *M. quadrifasciata antidioides* (Lepetier) (MQA) (Batalha-Filho *et al.*, 2010). *M. quadrifasciata antidioides* ocorre do norte do estado de São Paulo até o nordeste brasileiro e é identificada por listras interrompidas no 2º ao 5º segmento metassomal (Schwarz, 1948). *M. quadrifasciata quadrifasciata*, caracterizada

pelas listras contínuas, é encontrada nas regiões mais frias do Brasil. Entre os estados de Minas Gerais e São Paulo há uma zona híbrida onde indivíduos com um padrão intermediário de listras podem ser encontrados (Kerr, 1976; Page & Kerr, 1990; Silveira *et al.*, 2002; Camargo & Pedro, 2013; Tavares *et al.*, 2013).

M. quadrifasciata é ameaçada de extinção no estado do Rio Grande do Sul (Marques *et al.*, 2003; Rio Grande do Sul, 2014a), onde há registro de perda de colônias devido novos patógenos (Díaz *et al.*, 2017). Outros riscos à espécie incluem agroquímicos (Seide *et al.*, 2018), mudanças climáticas (Teixeira, Silveira, & Harter-Marques, 2018) e, como para outras abelhas, a perda de habitat devido desmatamentos (Araujo *et al.*, 2016).

Tendo em vista os fatores apresentados, o objetivo deste estudo é obter dados fundamentais para avaliar como a atividade da meliponicultura influenciou a diversidade genética de *Melipona quadrifasciata* até o momento, e contribuir para a elaboração de um plano de manejo da espécie no sul do Brasil, utilizando-se dos estoques comerciais como aliados da conservação, restauração e fins científicos. As hipóteses de estudo são: 1) a diversidade genética dos meliponários reflete o estoque natural e a estruturação populacional da região do meliponário; 2) colônias introduzidas podem ser identificadas; 3) meliponários onde ocorre multiplicação de colônias apresentam endogamia. Para atingir os objetivos, amostramos meliponários dos estados de Santa Catarina e Paraná, realizamos análises de diversidade e estruturação genética utilizando sequências do gene COI e genotipagem de cinco marcadores de microsatélites.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Meliponicultura

Espécies americanas de abelhas sociais produtoras de mel e própolis estão sujeitas às práticas de manejo desde os tempos das civilizações pré-Colombianas. Esta relação é tão íntima que comumente as abelhas da tribo Meliponini são chamadas de abelhas sem ferrão (ASF) ou abelhas indígenas (Palazuelos Ballivián, 2008; Negrín Muñoz, 2016). A tribo Meliponini abriga cerca de 400 espécies na região Neotropical (Camargo & Pedro, 2013), que são responsáveis pela maior parte da polinização da flora nativa brasileira (Kerr, Carvalho-Zilse, & Nascimento, 1996).

O mel das ASF tem alto valor de mercado, podendo ser comercializado a cerca de cem reais o quilo, oito vezes mais caro do que o mel das abelhas do gênero *Apis* (Gehrck, 2010, comunicação oral meliponicultores amostrados). Além da produção de mel e própolis, as abelhas sem ferrão tem alto potencial na polinização de diversas culturas. Ao contrário das espécies do gênero *Apis* (Buchmann, 1983), as abelhas da tribo Meliponini são capazes de vibrar o abdômen sem danificar a flor (Buchmann, 1974; Nunes-Silva, Hrcir, & Imperatriz-Fonseca, 2010), evitando a queda floral e produzindo frutos maiores e de melhor qualidade. Ao mesmo tempo, como são nativas do Brasil, são bem adaptadas ao clima e não oferecem perigo durante a manipulação das colônias, já que possuem ferrão atrofiado (McGregor, 1976). Consistem, portanto, em excelente alternativa para polinização em estufas e ambientes abertos, mercado praticamente inexplorado pelos meliponicultores no Brasil (Jaffé *et al.*, 2015; dos Santos, Otesbelgue, & Blochtein, 2018). Outro mercado importante é o de colônias matrizes, que ocorre na maioria das vezes irregularmente perante a legislação (Velthuis, Koedam, & Imperatriz-Fonseca, 2005; Gehrck, 2010).

Atualmente, muitas destas espécies são manejadas comercialmente e mantidas em meliponários, nome dado aos ambientes onde as colônias de abelhas sem ferrão são mantidas. Tradicionalmente, para a formação de um meliponário, os ninhos são realocados para o local especificado para a construção do meliponário, com ou sem a porção do tronco onde se encontravam. Entretanto, já há algumas décadas, têm se desenvolvido a criação chamada de racional, em que, durante a época de cópula e dispersão, a rainha recém-fertilizada e algumas operárias são atraídas para um ninho-

isca. Ninhos-isca são feitos com caixas de madeira, garrafas PET ou outras cavidades artificiais que ofereçam um local atraente para a nidificação e permitam o forrageamento livre das operárias. Posteriormente, estes ninhos são transferidos para caixas racionais que permitem a coleta de mel e a multiplicação artificial, evitando assim a retirada predatória de novas colônias da natureza (Velthuis *et al.*, 2005).

Para aumentar o número de colônias, a forma mais barata e rápida é a divisão dos discos de cria, em que é necessária apenas uma nova caixa de madeira e uma colônia populosa o suficiente para ser dividida. Aumentar o número de colônias é importante para a obtenção dos subprodutos de abelhas ou mesmo para o comércio destas novas colônias. Ademais, a manutenção destas abelhas em meliponários torna as colônias transportáveis para os locais necessários, garantindo a presença de polinizadores em sistemas agrícolas (Jaffé *et al.*, 2015).

A meliponicultura é vista como prática de subsistência e como um *hobby* cada vez mais comum, que vem se popularizando intensamente nos últimos anos. Porém, apesar das restrições legais, os estoques comerciais e hobbistas constituem grandes mantenedores de colônias de abelhas sem ferrão, com estimativas ao redor de cinco mil meliponicultores registrados no Brasil (Velthuis *et al.*, 2005; Gehrke, 2010; Jaffé *et al.*, 2015; Barbiéri, 2018).

Meliponicultores tem o potencial de colaborar na redução da necessidade de desmatamento e exploração de novos habitats e recursos naturais, ao contrário de outras atividades agrícolas tradicionais. Além disso, podem promover experiências de interação entre o homem e o ambiente, estimulando atitudes de conservação, de laços emocionais com os elementos naturais e de reflexão sobre questões ambientais, além de aumentar a participação popular em políticas de cunho ambiental (Jaffé *et al.*, 2015; Athayde, Stepp, & Ballester, 2016; Maderson & Wynne-Jones, 2016; Chanthayod, Zhang, & Chen, 2017; Carvalho *et al.*, 2018).

2.2. Diversidade Genética em abelhas manejadas

A pressão do cultivo moderno normalmente causa perda de biodiversidade, muitas vezes desconhecida, gerando uma preocupação mundial em manter os estoques naturais que podem conter características genéticas localmente adaptadas,

potencialmente úteis em desafios agrícolas futuros (Bruford, Bradley, & Luikart, 2003). Desta maneira, a conservação da diversidade e da identidade genética das espécies economicamente exploradas frequentemente se contrapõe aos interesses comerciais da maioria dos criadores de espécies nativas. Entender a história de espécies de diversos grupos taxonômicos pode ajudar a definir práticas e técnicas de manejo capazes de unir os interesses de conservação e de produção, como nos casos do salmão (Schenekar, Lerceteau-Khler & Weiss 2014), butiá (Nazareno & dos Reis, 2014) e insetos, sobretudo, abelhas (Bonatti *et al.*, 2014; Muñoz *et al.*, 2014a; Santiago *et al.*, 2016).

Devido à grande importância das ASF para os sistemas agrícolas, é necessário um melhor entendimento sobre os serviços ambientais fornecidos pelos polinizadores e os fatores que influenciam a sua atividade, além de promover a conservação e restauração das áreas naturais necessárias para estas abelhas, especialmente em locais de alta diversidade, como o Brasil (Imperatriz-Fonseca, Saraiva, & Gonçalves, 2007). O conhecimento da diversidade mantida pelos produtores pode contribuir para a adequação e a regulamentação desta atividade como um banco reconhecido da diversidade genética nativa e como fonte de colônias matrizes para fins de reintrodução e conservação. Diante do exposto, é imprescindível que haja maior empenho de programas de conservação e mais incentivo na adoção de programas de melhoramento sustentável que incluam o pequeno agricultor dentro desse cenário desenvolvimentista com fins de ampliação do mercado interno, gerando maior expectativa econômica e, conseqüentemente, preservando a biodiversidade e os recursos naturais necessários ao desenvolvimento (Silva *et al.*, 2014).

Existem iniciativas neste sentido, como o Projeto Manduri, o primeiro financiado pelo governo federal brasileiro que visa à reintrodução de abelhas nativas e sua criação para fins socioeconômicos e conservacionistas (Associação Papa-Mel de Apicultores de Rolante, 2006), e mais recentemente, o Plano de Fortalecimento da Cadeia Produtiva da Apicultura e da Meliponicultura do Estado de São Paulo (São Paulo, 2018), que separa as unidades de planejamento em pequenas divisões sócio-políticas.

O papel ecológico dos meliponários é controverso. Existe forte discordância na literatura se a manutenção artificial de abelhas nativas deteriora a diversidade genética local ou seria capaz de sustentar, e até mesmo aumentar a diversidade genética da

espécie (Harpur *et al.*, 2012; de La Rúa *et al.*, 2013). Desta forma, existem diversos fatores, desfavoráveis e favoráveis, a serem analisados quanto às práticas de manejo de colônias de abelhas. O consenso é que a diversidade em meliponários reflete as práticas de manejo e transporte que os produtores realizam na manutenção da produção (Santiago *et al.*, 2016). Sendo assim, a criação pode refletir ou alterar o estoque genético local.

Atualmente no Brasil, cada meliponário pode manter 50 colônias de cada espécie e, se não houver outros criadores ou remanescentes florestais com colônias naturais, o fluxo gênico destas localidades pode se tornar restrito (Brasil, 2004). Abelhas mantidas fora da área de ocorrência natural da espécie experimentam redução drástica da variabilidade genética, mas que com cuidados intensos, podem sobreviver durante mais de 10 anos (Alves *et al.*, 2011). Os acasalamentos não ao acaso e a deriva genética são as maiores preocupações para populações manejadas ou pequenas, podendo ter consequências devastadoras para o potencial evolutivo do grupo. Estes efeitos prejudiciais são cumulativos ao passar das gerações em grupos em cativeiro ou isolados (Christie *et al.*, 2012; Fox *et al.*, 2018), e, como consequência, quanto mais tempo uma população passa isolada, menos ela é adequada para projetos de reintrodução (Earnhardt, 2010; Lacy, 2013).

A seleção de matrizes por critérios de produtividade causa consequências como o efeito fundador e a endogamia, que diminuem a quantidade dos alelos da população, efeito conhecido como gargalo de domesticação (de La Rúa *et al.*, 2013), já descrito para diversas culturas agrícolas (Zeder *et al.*, 2006). A extensão do gargalo de domesticação estaria relacionada ao número de indivíduos na população fundadora e da duração do gargalo. Entretanto, a redução da diversidade pode ocorrer em regiões específicas do genoma que estariam ligados aos genes alvos de seleção, efeito conhecido como *selective-sweep*, e que é considerado como uma assinatura de seleção por domesticação. Outros efeitos da ‘domesticação’ seriam o aumento do *fitness* genético das populações alvo, o aumento da densidade populacional e a expansão da área natural de ocorrência, com a colonização de novos ambientes, tanto através do efeito de fundador quanto da adaptação direcionada a este novo habitat (Zeder *et al.*, 2006).

A baixa variação genética em conjunto com o pequeno tamanho efetivo da população tende, por consequência natural, aumentar a deriva genética e a probabilidade de perda de alelos importantes para a adaptação. Isso leva naturalmente a uma menor flexibilidade adaptativa (Falconer, 1987). Estudos com diferentes meliponíneos confirmam tal perturbação na constituição genética das populações (Carvalho-Zilse & Kerr, 2006; Costa Pinto, 2007; Francini *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2014; Santiago *et al.*, 2016). O que se percebe na maioria dos trabalhos é uma queda cada vez maior no número de alelos e de heterozigotos em função da deriva e da endogamia, causada pelo fluxo gênico restrito, uma vez que populações distintas são impedidas de cruzar genes entre si. Por consequência, isso aumenta a taxa de fixação de genes e amplia o nível de estruturação genético-populacional

A maior preocupação em himenópteras, entretanto, é a perda da diversidade genética devido a endogamia. A endogamia reduz a heterozigosidade com o passar das gerações (Witzenberger & Hochkirch, 2011; Price & Hadfield, 2014; Willoughby *et al.*, 2015). A alta diversidade genética em abelhas é importante porque influencia na saúde, resistência a patógenos e no *fitness* das colônias comerciais de *Apis* sp (López-Urbe *et al.* 2017; Mattila & Seeley 2007; Oldroyd & Fewell 2007; Page 1980; Seeley & Tarpay 2007).

Himenópteros possuem o *locus feminizer* de autoincompatibilidade, onde a homozigose gera a produção de machos diploides inférteis ou inviáveis, a morte da rainha pelas operárias e a sua substituição por uma rainha virgem. Da mesma forma que a baixa disponibilidade de machos de outras colônias foi responsável pelo cruzamento endogâmico, a nova rainha está sujeita ao mesmo risco, repetindo o ciclo. Desta forma, organismos haplodiplóides estão mais vulneráveis à extinção por causas genéticas que outros organismos (Hasselmann & Beye, 2004; Zayed, 2004; Zayed & Packer, 2005; Delaney *et al.*, 2009).

Como não há ainda nenhuma maneira direta de monitorar os alelos feminizer de melíponas, a investigação da variabilidade genética de populações artificiais e naturais e a produção de machos diploides podem ser usadas como sinal do estado de conservação do ecossistema e dos serviços de polinização (Carvalho, 2001; Zayed, 2004, 2009; Zayed, Roubik, & Packer, 2004; Zayed & Packer, 2005; Carvalho-Zilse *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2011; Francini, Nunes-Silva, & Carvalho-Zilse, 2012; Boff *et al.*, 2014).

As fêmeas de *Apis* sp. são altamente poliândricas, o que aumenta a diversidade genética e a sobrevivência em populações comerciais (Tarpy, Vanengelsdorp, & Pettis, 2013) e o número de alelos de genes de auto-incompatibilidade (Loman *et al.*, 1988). Diferentemente, as ASF são monândricas (da Silva, Zucchi, & Kerr, 1972; Page & Kerr, 1990; Peters *et al.*, 1999; Palmer *et al.*, 2002; Quezada-Euan *et al.*, 2007; Francini *et al.*, 2012; Jaffé *et al.*, 2014) e não existem dados sobre a diversidade e a distribuição dos alelos do *locus feminizer*. Além disso, há carência de informações sobre a diversidade genética comercial de ASF.

Quanto ao transporte artificial das colônias, as consequências genéticas são frequentemente negligenciadas (Meixner, Kryger, & Costa, 2015; Byatt *et al.*, 2016; Jaffé *et al.*, 2016). A necessidade de repor ou aumentar a densidade de polinizadores é responsável pela introdução de espécies exóticas de abelhas sociais em quase todo o mundo, e é consenso que o escape destas abelhas pode perturbar a biodiversidade local e disseminar doenças (Byatt *et al.*, 2016). Existem relatos de formação de híbridos, já descrita para os gêneros *Melipona* (Nogueira *et al.*, 2014) e *Tetragonisca* (Francisco *et al.*, 2014). Há também casos de perda de linhagens genéticas que podem reservar alelos únicos ou raros e traços de adaptação local (Jensen *et al.*, 2005; de La Rúa *et al.*, 2009; Crispo *et al.*, 2011; Oleksa *et al.*, 2011). Outro efeito negativo é a possível interferência no acasalamento causado pela espécie exótica, reduzindo a fertilidade dos indivíduos (Koeniger & Koeniger, 2000; Remnant *et al.*, 2014) e potencialmente causando dano físico durante o acasalamento (Gröning & Hochkirch, 2008), especialmente preocupante para as espécies em que a rainha cruza apenas uma vez (Tsuchida *et al.*, 2010). Para esse último fator não há, na literatura, evidências de ocorrência em *Meliponini* (Byatt *et al.*, 2016).

Entre populações da mesma espécie, o transporte de colônias entre distâncias acima de 1000 km, considerado comum (Byatt *et al.*, 2016), pode influenciar os padrões de fluxo gênico entre as ASF. Detectar mistura genética é desafiador quando ela ocorre por intermédio humano. Em alguns casos, os genótipos podem estar tão misturados que o sinal da população nativa pode ser perdido (de La Rúa *et al.*, 2009). Populações gerenciadas de *Melipona scutellaris*, por exemplo, são praticamente indiferenciáveis, presumivelmente devido às trocas de colônias entre os produtores (Carvalho-Zilse *et al.*, 2009).

As consequências da mistura de populações são controversas. Por um lado, se a seleção natural favoreceu genótipos locais adaptados, a mistura pode diluir o *gene pool* selecionado e tornar a população misturada pouco adaptativa, com impactos negativos no *fitness*, reduzindo a viabilidade e a fertilidade nos casos mais sérios de incompatibilidade, caracterizando depressão exogâmica (Strange, Garnery, & Sheppard, 2008; Byatt *et al.*, 2016).

Por outro lado, o transporte aumenta a diversidade genética dos meliponários. A mistura gera heterose, que pode contornar a depressão endogâmica, reduzindo os efeitos de gargalo genético e aumento a taxa de heterozigotos (López-Urbe *et al.*, 2017a). Além disso, propicia o surgimento de novos genótipos não encontrados nas populações parentais. A heterose, aumentando a variabilidade genética, pode ser importante no estabelecimento de novas populações, especialmente se tiverem poucos indivíduos e em ambientes novos, que podem exigir respostas às novas pressões seletivas (Delaney *et al.* 2009; Rius & Darling 2014 para revisão; Strange *et al.* 2017).

Os efeitos da seleção de colônias para a multiplicação e os de transporte sobre a diversidade genética das populações se misturam com as consequências do comportamento natural das espécies quando as populações são analisadas. Existem poucos estudos populacionais de ASF, e a maior parte foi realizada total ou parcialmente utilizando estoques genéticos mantidos em meliponários (Carvalho-Zilse *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2011; Francini *et al.*, 2012; Santiago, 2013; Duarte, Gaiotto, & Costa, 2014; Koser, Francisco, & Moretto, 2014; Santiago *et al.*, 2016), portanto, não há dados confiáveis como referência para se entender o que ocorre nos meliponários.

Meliponários mantidos próximos a florestas podem compartilhar da mesma diversidade genética que os estoques naturais. A diversidade genética nuclear de *Tetragonisca angustula*, a espécie nativa mais cultivada, mostra-se semelhante entre populações selvagens e cativas, sugerindo que os machos sejam capazes de homogeneizar a diversidade local. Porém, é observada redução da variabilidade mitocondrial nas populações artificiais, refletindo a prática da divisão de colônias para aumentar a densidade do meliponário, elevando a frequência de alguns haplótipos em detrimento de outros (Santiago *et al.*, 2016).

A divisão artificial de colônias parece reproduzir o comportamento natural da espécie, onde a filopatria da fêmea e a dependência do ninho novo com o ninho “mãe”

são as prováveis causas da alta estruturação populacional mitocondrial encontrada em populações selvagens de abelhas sem ferrão (Van Veen & Sommeijer, 2000; Roubik, 2006; Quezada-Euan *et al.*, 2007; Francisco & Arias, 2009; Brito & Arias, 2010; May-Itzá *et al.*, 2010; Thummajitsakul, Klinbunga, & Sittipraneed, 2011; Quezada-Euán *et al.*, 2012; Brito *et al.*, 2013; Francisco, Santiago, & Arias, 2013; Francisco *et al.*, 2017; Bonatti *et al.*, 2014).

Para subespécies europeias de *Apis mellifera*, alguns estudos sugerem que a domesticação seja uma das causas da baixa diversidade genética encontrada (Schiff, Sheppard, & Loper, 1994; Schiff & Sheppard, 1996; Jaffé *et al.*, 2010; Meixner *et al.*, 2010; vanEngelsdorp & Meixner, 2010) e que esta redução seja parcialmente responsável pelo declínio global das populações dessas abelhas (Oldroyd, 2007; vanEngelsdorp *et al.*, 2009, 2010; Potts *et al.*, 2010; vanEngelsdorp & Meixner, 2010). Entretanto, Delaney *et al.* (2009) afirma que os índices de diversidade genética são mantidos em populações domesticadas, porém, a composição alélica é alterada com a perda dos alelos raros. Enquanto isso, foram verificadas criações de *A. mellifera* fora da sua área de ocorrência natural com maior diversidade genética do que as fontes européias (Chapman, Lim, & Oldroyd, 2008; Oxley & Oldroyd, 2009; Harpur *et al.*, 2012). A principal causa alegada para a alta diversidade seria intercâmbio de colônias com diversas origens geográficas ou fluxo gênico espontâneo, que introduziriam alelos novos constantemente.

A combinação dos efeitos de mobilidade e a introdução de indivíduos de outras populações altera a distribuição da diversidade genética em estoques de espécies em escala global. Isso levanta duas questões principais, que são que tipo de diversidade desejamos conservar nestas espécies, e quais processos demográficos e genéticos nós desejamos facilitar para o futuro? Será que hoje a pressão ecológica é tanta que se adaptar à criação é a melhor alternativa (Bruford *et al.*, 2003)? Se pensarmos em conservação dos ecossistemas, talvez seja melhor mantermos abelhas polinizadoras híbridas do que nenhuma abelha (Byatt *et al.*, 2016).

2.3. Delimitação de unidades de manejo

Uma das soluções para monitorar a diversidade genética natural e comercial é a delimitação de unidades manejo (MUs - *management units*). Investigações forenses da origem de animais e plantas traficados também necessitam de unidades de gerenciamento delimitadas para ações de investigação e intervenção (Alacs et al. 2010; Nazareno & dos Reis 2014; Ogden, Dawnay & McEwing 2009; Wasser et al. 2008). A identificação de unidades de manejo também é central para o monitoramento de frequências alélicas e a distribuição da diversidade genética neutra e adaptativa, gerando dados que podem ser usados em programas de cruzamento, tanto em populações livres quanto em cativeiro (Palsbøll, Bérubé & Allendorf, 2007; López-Urbe, Soro & Jha, 2017b). Em cativeiro, o uso de poucos fundadores ou protocolos errôneos de reprodução pode causar perda da variabilidade genética, comprometendo os esforços de recuperação da espécie e tornando o gerenciamento genético de extrema importância para conservação da biodiversidade de espécies comerciais (Féral, 2002; Schwartz, Luikart, & Waples, 2007).

A delimitação de unidades de manejo necessita da interpretação da divergência genética populacional, acessada através de análises de diferenciação e estruturação populacional. Para fins imediatos de conservação, é necessário conhecer a taxa de dispersão atual dos indivíduos entre as populações, e não o fluxo gênico histórico, pois as MUs representam unidades isoladas demograficamente. Populações seriam demograficamente correlacionadas com taxas de dispersão em torno de 10%. Portanto, uma MU poderia ser menor que uma unidade evolutiva (Palsbøll, Bérubé, & Allendorf, 2007). Porém, o manejo de populações naturais através do espaço tende a seguir fronteiras administrativas ao invés de considerações ecológicas. Ecólogos documentam que espécies com interesse de manejo ocupam grandes áreas geográficas e ultrapassam barreiras administrativas, e a delimitação de unidades populacionais nem sempre é clara (Linnell *et al.*, 2001; Frantz *et al.*, 2009; Potts *et al.*, 2010; Bischof, Brøseth, & Gimenez, 2016; VonHoldt *et al.*, 2016; Bergamo *et al.*, 2018; De Keyser *et al.*, 2019). Levando esses fatores em conta, é recomendável que o planejamento do manejo de espécies deva ocorrer no menor nível praticável (Linnell, 2005).

Um exemplo deste tipo de gerenciamento é aplicado pela Associação Russa de Criadores de Abelhas (*Russian Honeybee Breeders Association – RHBA*), que

implementou em 2008 um sistema de identificação de estoque genético (Genetic stock identification - GSI) baseado em um conjunto de marcadores moleculares. Amostras desconhecidas são comparadas com uma base de dados de estoques alvo, com o objetivo de manter a integridade das populações e cruzamentos controlados, a fim de obter as características fenotípicas desejáveis pelos produtores sem, entretanto, perder diversidade genética. Nos primeiros anos da implementação dos sistemas fechados de acasalamento, apenas entre colônias 'membro' do plano, houve queda no POA (probabilidade de atribuição a alguma população) e aumento do índice de endogamia. Após a estabilização, os valores de POA e os de diversidade genética se mantiveram estáveis, não comprometendo o potencial evolutivo do estoque (Bourgeois & Beaman, 2017).

2.4. Legislação ambiental e a meliponicultura

O direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado é assegurado pela Constituição Federal, no capítulo VI, artigo 225º: "Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao poder público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações" (Brasil, 1988). Para chegar a este objetivo, o direito ambiental é apoiado em princípios fundamentais, sendo um deles o da precaução, da Declaração do Rio/92 sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. O princípio da precaução é definido como "a garantia contra os riscos potenciais que, de acordo com o estado atual do conhecimento, não podem ser ainda identificados". Desta forma, "Para que o ambiente seja protegido, serão aplicadas pelos Estados, de acordo com as suas capacidades, medidas preventivas. Onde existam ameaças de riscos sérios ou irreversíveis, não será utilizada a falta de certeza científica total como razão para o adiamento de medidas eficazes, em termos de custo, para evitar a degradação ambiental".

O Convênio sobre a Diversidade Biológica (*United Nations Convention on Biological Diversity*; CBD; www.cbd.int), do qual o Brasil é signatário, é ainda mais específico em seu preâmbulo quando afirma que "quando exista uma ameaça de redução ou perda substancial da diversidade biológica, não deve ser invocada a falta de completa certeza científica como razão para adiar a tomada de medidas destinadas a evitar ou

minimizar essa ameaça". O CBD tem descrito no seu Artigo 7º seus fundamentos de "(I) identificar componentes da diversidade biológica, (II) monitorar, por meio de amostragem e outras técnicas, os componentes da diversidade biológica, a fim de (III) identificar processos e categorias de atividades que tenham ou possam ter impactos adversos significativos na conservação e uso sustentável da diversidade biológica, e monitorar seus efeitos". Diversos projetos, apoiados pelo convênio ou não, alcançam esses objetivos. Porém, conclusões importantes de décadas de pesquisa em genética da conservação permanecem dentro da comunidade científica, e não são traduzidos em ações concretas no desenvolvimento de políticas internacionais para a conservação (Laikre, 2010).

Desta forma, devido ao desconhecimento da diversidade genética e das consequências do seu gerenciamento, diversas leis específicas regulam a criação das ASF buscando a conservação do seu estado natural. A criação e a comercialização de enxames de abelhas nativas estão sujeitas a instrumentos normativos federais e estaduais, sendo que até pouco tempo não havia legislação específica para a manutenção de insetos sociais. A atividade meliponicultura ocorria na maioria das vezes irregularmente perante a legislação (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006; Gehrke, 2010), e até 2015, mais da metade dos grandes meliponicultores comerciais apontavam a legislação vigente como o maior empecilho da atividade (Jaffé *et al.*, 2015). Após grande pressão dos meliponicultores, foi possível verificar a evolução da legislação nos últimos anos.

Uma das primeiras normas aplicadas foi a Portaria IBAMA nº 117 de 1997 (artigo 10º) (Brasil, 1997a) que regula o comércio de animais silvestres nativos, seguida pela Portaria do IBAMA nº 118-N de 1997, que normaliza os criadouros de animais silvestres com fins econômicos (Brasil, 1997b). Ambas exigem a marcação individual dos indivíduos (Art. 7º), contendo a informação de idade e sexo. A marcação e a individualização de cada um dos indivíduos evidencia que a elaboração destas portarias não considera a biologia dos insetos sociais. Ademais, a captura de animais ameaçados de extinção é vetada pela portaria nº 118-N (Art. 11º), o que inviabiliza a captura de enxames por ninhos-isca, uma vez que são inespecíficos. O Art. 20º veta a venda de matrizes e reprodutores para a formação de novos plantéis e para servirem de animais de estimação, sendo contrário aos hábitos tradicionais de meliponicultura e dos esforços atuais de fortalecer a atividade. Por outro lado, é prevista a possibilidade de o IBAMA utilizar este recurso para programas de reintrodução ou implementação de criadouros

com caráter social, comunitário ou demonstrativo (Art. 12º), um potencial importante dos criadores de abelhas sem ferrão, principalmente das espécies ameaçadas.

Em 2004 o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), na Resolução N° 346 foi o primeiro a disciplinar a utilização das abelhas silvestres, regular a implantação de meliponários (Art. 1º) e a captura de novas colônias através de ninhos-isca (Art. 3º) (Brasil, 2004). Estas atividades são reservadas aos criadouros cadastrados no IBAMA (Art. 5º), porém, estão liberados destas obrigações os pequenos produtores que mantêm menos de 50 colônias e que se dediquem à prática artesanal da meliponicultura de espécies de ocorrência geográfica natural na área de instalação do meliponário (Art. 5º), reafirmado pela Instrução Normativa n° 169 (Brasil, 2008). O transporte entre estados deve ser feito somente com autorização do IBAMA, sendo vetado o transporte para estados sem ocorrência natural da espécie, exceto para fins científicos (Art. 6º). Este artigo considera as divisões políticas do território como predominantes na distribuição natural das espécies, sem considerar as diversas fisionomias vegetais que um mesmo estado pode apresentar ou então a continuidade dos biomas entre as denominações políticas.

A Resolução CONAMA N° 346 ainda regulamenta os ninhos-isca e a obrigatoriedade de que as colônias mantidas e comercializadas sejam provenientes de métodos de multiplicação artificial (Art. 4º), prevenindo que as colônias sejam retiradas de troncos de árvores ainda vivas, evitando assim a extração predatória da espécie (Brasil, 2004). Apesar da Resolução não permitir a extração de colônias da natureza, estabelece que os desmatamentos ou empreendimentos facilitem a retirada dos enxames da sua área de impacto (Art. 7º). Esta Resolução dá um passo importante considerando inicialmente que as abelhas, bem como seus criadouros, são bens de uso comum do povo e também a importância da meliponicultura para a economia local e para a sustentabilidade de ambientes naturais e sistemas agrícolas. Porém, ressalva que as abelhas, por viverem naturalmente fora do cativeiro, constituem parte da “fauna silvestre” nativa.

Fauna silvestre nativa é definida pelo Art. 2º da Instrução Normativa do IBAMA N° 7 de 2015 como “todo animal pertencente à espécie nativa, migratória e qualquer outra não exótica, que tenha todo ou parte do seu ciclo de vida ocorrendo dentro dos limites do território brasileiro ou águas jurisdicionais brasileiras” (Brasil, 2015). Porém,

muitos produtores defendem que as ASF mantidas em meliponário deveriam ser tratadas sob a definição de “fauna doméstica”, descrita como “conjunto de espécies da fauna cujas características biológicas, comportamentais e fenotípicas foram alteradas por meio de processos tradicionais e sistematizados de manejo e melhoramento zootécnico tornando-as em estreita dependência do homem, podendo apresentar fenótipo variável, mas diferente da espécie silvestre que os originou”. Esta visão tem como argumento publicações de diversas espécies que tratam sobre a relação e criação tradicional com as abelhas, e racionalização das caixas de cultivo que permite que as espécies sejam criadas fora do habitat natural, manejo de doenças e métodos de alimentação (Nogueira-Neto *et al.*, 1986; Aidar, 1996; Kerr *et al.*, 1996; Aidar & Campos, 1998; Bruening, 2001; Venturieri, 2008; Contrera, Menezes, & Venturieri, 2011; Villas-Bôas, 2012; Roubik, 2018) .

A Instrução Normativa nº 7 de 2015 também categoriza os estabelecimentos de uso e manejo de fauna silvestre em cativeiro (Art. 3º), podendo ser para fins de conservação, pesquisa ou comercial (Brasil, 2015). Dentre as categorias de fins econômicos, aquela destinada à comercialização é vedada de realizar a reprodução dos indivíduos, prática resguardada para estabelecimentos definidos como ‘criadouros comerciais’. A dificuldade de aplicação desta normativa para os insetos sociais se dá pela continuidade do processo de reprodução dos indivíduos de uma colônia. Neste caso, a definição de ‘reprodução’ mais adequada seria a de multiplicação artificial das colônias racionais, e não dos indivíduos em si, também não especificado pela resolução 346/2004 do CONAMA que trata das abelhas nativas (Brasil, 2004). Estes estabelecimentos devem possuir a Autorização Prévia, de Instalação, e a de Uso e Manejo, caso mantenham mais de 50 colônias. Os plantéis pré-existentes devem ser comprovados documentalmente por autorizações e licenças de captura, de transporte ou notas fiscais emitidas por criadouros ou comerciantes autorizados. Não é regulamentado o uso de ninhos-isca.

Os Instrumentos Normativos supracitados não especificavam as espécies de abelhas, até que em 2014 foi editada a portaria 444 do CONAMA que proíbe a captura, o transporte, o armazenamento, a guarda, o manejo, o beneficiamento e o comércio de espécies ameaçadas de extinção, a não ser com o objetivo exclusivo de pesquisa e conservação (Brasil, 2014). A portaria especifica as abelhas em extinção no Brasil, sendo elas: *Melipona capixaba*; *M. rufiventris*; *M. scutellaris* e *Partamona littoralis*,

todas com potencial econômico explorado, amplamente cultivadas por *hobbistas* e, especialmente no caso das Meliponas, com papel socioambiental histórico.

Há evidências de que a espécie *Melipona quadrifasciata*, ameaçada de extinção, foi de fato extinta no estado do Rio Grande do Sul e está sendo reintroduzida pelos produtores e *hobbistas*. A reintrodução está ocorrendo de forma desordenada e sem o devido controle sobre a identidade genética e ecológica da espécie, pois não é permitida e por esse motivo não há parâmetros a serem seguidos (Gehrck, 2010, comunicação pessoas dos meliponicultores). Porém, constitui uma prova da estreita dependência que esta espécie tem do homem para se reestabelecer em seu ambiente outrora natural, e de que estes produtores podem se tornar aliados na conservação da espécie e na manutenção da variabilidade genética e dos serviços ambientais prestados pela espécie.

Com a atividade meliponicultura ganhando reconhecimento e considerando o Art. 8º da Lei Complementar nº 140 de 2011, que estabelece como responsabilidade dos Estados a aprovação do funcionamento dos criadouros da fauna silvestre, estão sendo publicadas leis estaduais específicas, bastante heterogêneas (Brasil, 2011). Elas têm em comum o fato de estarem mais alinhadas com os métodos de captura de colônias por ninho-isca e os métodos de divisão das colônias já existentes. Como por exemplo, a Lei Nº 16.171 (Santa Catarina, 2013) e o Decreto Nº 178 (Santa Catarina, 2015) que a regulamenta, que se destacam por liberarem o manejo de abelhas e seus produtos, assim como a compra de ninhos e discos de cria, sem necessidade de apresentação de comprovante de proprietário rural, e, desde que o transporte seja feito dentro dos limites políticos do estado de Santa Catarina, mediante a emissão de Guia de Trânsito Animal (GTA). No Rio Grande do Sul, existe a Lei Nº 14.763 (Rio Grande do Sul, 2015) que regulamenta a meliponicultura, e a Instrução Normativa SEMA Nº 3 (Rio Grande do Sul, 2014b) que traz uma lista das 24 espécies de abelhas nativas que são permitidas de serem mantidas no estado. Porém, esta lista é bastante criticada por excluir a *Melipona quadrifasciata*, que é uma das espécies mais cultivadas e alguns produtores argumentam que seria nativa. De acordo com esta IN, ficam dispensados da obtenção da autorização de funcionamento, os meliponários com até 100 colônias (Art. 7º), mais permissiva do que a portaria do CONAMA de 2004, que indica 50 colônias. Além disso, é permitido no território do Rio Grande do Sul, sem necessidade de autorização, o transporte de colônias ou parte delas (Art. 13º). Outros estados apresentam iniciativas, como a Lei Nº 13.905 de 2018 no estado da Bahia (Bahia, 2018), a Resolução CEMAAM Nº 22 de

2017 do Amazonas (Amazonas, 2017), a Resolução Estadual *Ad referendum* de Goiás nº007/2017 (Goiás, 2017), Lei Nº 19.152 de 2017 do Paraná (Paraná, 2017), e está em trâmite o Projeto de Lei Nº 4.943/2014 de Minas Gerais (Minas Gerais, 2014).

Se a criação e comercialização das abelhas nativas apresentam entraves, não é diferente com seus produtos. Mel e própolis de ASF estão sujeitos às normas da Divisão de Leite e Derivados (DILEI), subalterna ao Ministério da Agricultura (MA). As principais diretrizes são do Decreto nº 9.013, de 2017 (Brasil, 2017), que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal e apresentam diversos avanços em relação ao Decreto anterior, Nº 30.691 de 1952, que inseria no Art. 2º os produtos apícolas às mesmas regulações de derivados de açougue, caça, pesca, leite e ovos (Brasil, 1952). Estão sujeitos também à Portaria do IBAMA 117/97 por serem provindos de animais silvestres, porém, esta não faz nenhuma menção sobre abelhas ou produtos apícolas (Brasil, 1997a).

Apesar de o mel de abelhas nativas ser encontrado à venda em comércios locais, a comercialização de produtos de ASF é dificultada por não haver parâmetros de qualidade adequados para mel e própolis de abelhas nativas, devido às suas características exclusivas e divergentes dos produtos de *Apis* sp. A Instrução Normativa Nº 11 de 2000 define o mel pelo seu processo de obtenção (2.2.2.), onde se enquadra como sendo aquele obtido por “escorrimento dos favos desoperculados, sem larvas”; “prensagem dos favos, sem larvas”; “centrifugação dos favos desoperculados, sem larvas”, claramente ignorando a existência de espécies apícolas que não formam favos em suas colônias, caso de todas as espécies de abelhas nativas (Brasil, 2000). Nesta instrução são ainda apresentados valores de referência de características físico-químicas, elaboradas para atender a demanda do mel de *Apis mellifera*. Porém, vários destes atributos não são alcançados pelo mel de ASF. Além disso, a própria variabilidade de características que as abelhas nativas exibem, mesmo sendo criadas no mesmo local é indicativo de que a legislação deve estabelecer parâmetros para cada uma das espécies (Biluca *et al.*, 2016; Duarte *et al.*, 2018).

Como exemplo, o mel de jandaíra, *Melipona subntida*, uma das espécies mais cultivadas no nordeste brasileiro, não atende às conformidades de umidade e atividade de diástase (Almeida-Muradian *et al.*, 2013) e, na maior parte dos estudos, nenhuma espécie de abelha nativa atende aos valores recomendados de umidade máxima, sendo

que *Melipona quadrifasciata*, cultivada em toda a Mata Atlântica, exibe valores de umidade maiores do que o dobro do valor de referência (Biluca et al. 2016 e referências). No caso da *Melipona mondury*, apenas a atividade da diástase está dentro dos limites aceitos pela legislação atual (Alvez et al., 2018).

Existem esforços estaduais para atender a esta demanda. O pioneiro foi o estado da Bahia, com a Portaria ADAB Nº 207 de 2014 que regula a qualidade do mel para abelhas do gênero *Melipona*, e, em caso prático, poderia se estender a outros gêneros por analogia como método de integração da norma (Bahia, 2014). No estado de São Paulo, há o Regulamento Técnico de Identidade e Padrão do mel de abelhas sem ferrão, através da RESOLUÇÃO SAA-52 de 2017, baseado no artigo de Camargo, Oliveira, e Berto (2017), que abrange seis gêneros de Meliponini (São Paulo, 2017).

O estado de São Paulo também conta com o Plano de Fortalecimento da Cadeia Produtiva da Apicultura e da Meliponicultura do Estado (São Paulo, 2018), que usa pequenas unidades administrativas para o acompanhamento da atividade. Estas unidades são usadas para outras ações de cunho ambiental e com necessidade de polinização, como silvicultura, produção de abacate, algodão e café, e passaram a fazer parte do levantamento de quantidade de colônias, pasto apícola e produção de mel a partir da criação deste plano. Com a inviabilidade do conhecimento da estrutura populacional em fina escala de todas as espécies apícolas da região, a adesão de pequenas unidades vai de acordo com o recomendado para a conservação de espécies selvagens e exploradas comercialmente (Linnell, 2005). Desta forma, fica evidente a preocupação e os esforços que os estados estão dispensando na melhoria das práticas de manejo e de beneficiamento dos produtos das abelhas nativas, visando alcançar os objetivos de preservação garantidos pela constituição e também a garantia de ganhos econômicos para a população.

2.5. Marcadores moleculares em genética de população

A variabilidade genética é considerada um dos atributos mais importantes de uma população, pois, oriunda de mutação e recombinação, é matéria prima para a seleção natural atuarem sobre o processo de adaptação e a especiação. A genética de populações almeja descrever a quantidade de variação, os mecanismos envolvidos na

sua manutenção e os eventos históricos que contribuíram para a distribuição alélica atual. Estes dados, combinados com os aspectos biológicos do organismo, como comportamento reprodutivo e o processo de dispersão, permitem o melhor planejamento de manejo e a recomposição de populações alteradas, de forma que a população implantada dê continuidade aos processos evolutivos locais (Jaeger *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2012). Os parâmetros mais utilizados para medir a variabilidade genética são o grau de polimorfismo, o número total de alelos e as taxa de heterozigose observadas e esperadas.

Para a avaliação de panorama genético populacional, são frequentemente utilizados marcadores bem estabelecidos em genética da conservação, como sequências do genoma mitocondrial, que refletem a história matrilineal dos organismos (Quezada-Euan *et al.*, 2007; Batalha-Filho *et al.*, 2010; Bonatti *et al.*, 2014), e os microssatélites (Carvalho-Zilse *et al.*, 2009; Alattal, Al-Ghamdi, & Alsharhi, 2014; Boff *et al.*, 2014; Nogueira *et al.*, 2014), ambos consagrados também no estudo da história da domesticação animal (Loftus *et al.*, 1994; MacHugh *et al.*, 1997; Kadwell *et al.*, 2001; Bruford *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2004).

2.5.1. Marcadores microssatélites

Microssatélites são elementos curtos e repetitivos no DNA nuclear, com alto grau de polimorfismo, herança codominante (Peters *et al.*, 1998), formados por repetição em tandem de 1 a 10 nucleotídeos e espalhados por todo o genoma dos eucariotos. O alto grau de polimorfismo se deve a escorregões da enzima DNA polimerase durante a replicação da fita de DNA (*slipped-strand mispairing*) que são mais comuns nas regiões de microssatélites do que em outras partes do genoma (Levinson & Gutman, 1987; Eisen, 1999). Os alelos de microssatélite são diferenciados pelo tamanho, ou seja, pelo número de pares de base (Peters *et al.*, 1998). A taxa de mutação dos microssatélites varia muito, dependendo da composição e do número das unidades de repetição, sendo que quanto maior o número de repetições, maior é a taxa de erro na replicação, do tipo de genoma, do grupo taxonômico e da posição no cromossomo (Goldstein & Schlötterer, 1999), e parece haver um limite no número máximo de repetições (Takezaki & Nei, 1996). Além disso, certos locos são altamente polimórficos em algumas espécies e populações e são monomórficos em outras, sem

motivo aparente (Takezaki & Nei, 1996). É mais comum o ganho de repetições do que a perda, e por isso, diferentes locos de microsatélites são mais adequados para diferentes escalas de estudo, podendo variar de intrapopulacional a interespecíficos.

Estas características fazem com que a análise estatística dos resultados provindos de genotipagem seja altamente sensível a gargalos gênicos e seleção (Luikart & Cornuet, 1998), a documentação de misturas de linhagens (MacHugh *et al.*, 1997; Kadwell *et al.*, 2001), e a assinatura deste marcador pode ser usada para a identificação de indivíduos como provindos de grupos genéticos similares dentro das populações (Cornuet *et al.*, 1999; Matsuoka *et al.*, 2002; Maudet *et al.*, 2002). É considerado por diversos autores como o melhor tipo de marcador disponível para estudos de genética de populações (Rafalski, Tingey, & Williams, 1991), ultrapassado atualmente pelos marcadores *single nucleotide polymorphism* (SNPs), que ainda tem, em seu alto custo, seu principal empecilho.

Os microsatélites podem ser mais adequados para estudos populacionais do que outros marcadores menos variáveis para determinar o panorama atual da diversidade de espécies e populações, pois evoluem rapidamente e revelam estruturas populacionais e processos evolutivos mais recentes e em menor escala temporal. Como a riqueza alélica e a heterozigose tendem a se estabelecer após a separação de populações, podem ser usados para indicar o efeito do fundador, tempo da separação, o isolamento reprodutivo e fluxo gênico (Sequeira *et al.*, 2008), para monitoramento de populações naturais, principalmente quando se considera os recentes isolamentos pela fragmentação do habitat, para o desenvolvimento de populações para melhoramento genético, estudo do comportamento reprodutivo e parentesco (Viana, 2011), tamanho efetivo populacional, dispersão (Jaeger *et al.*, 2007) e hibridação.

2.5.2. Marcador mitocondrial

Para entender a origem de linhagens, é necessário que o marcador molecular evolua em taxa relativamente constante, e seja evolutivamente conservada entre as linhagens para que seja possível realizar comparações. É importante que este marcador seja variável e estruturado o suficiente entre as populações. O mtDNA é uma ferramenta

poderosa no estabelecimento de níveis de diversidade genética e estrutura filogenética dentro de uma espécie (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2009).

O mtDNA é quase sempre de herança exclusivamente materna, é haploide e não passa por recombinação, portanto o tamanho efetivo populacional dos genes deste genoma sejam $\frac{1}{4}$ do que os genes nucleares. São bons marcadores para eventos demográficos como expansão populacional, padrões de dispersão limitados por sexo, estabelecimento de genealogias no nível intraespecífico e microevolutivo. E como cada indivíduo exibe um único haplótipo, deixa as análises relativamente mais simples de interpretar. Devido à herança extra nuclear e modo de herança uniparental, há limitações no uso de mtDNA. Este pode ser um pobre preditor da diversidade genômica, por ser um *locus* único e não representar o fluxo gênico mediado pelos machos (Avise *et al.*, 1987; Bruford *et al.*, 2003; Hoelzel, 2009; Avise, 2009).

2.6. Objeto de estudo: *Melipona quadrifasciata*

A espécie *Melipona (Melipona) quadrifasciata* Lepeletier, 1836, conhecida popularmente como mandaçaia, é um modelo interessante de estudo da diversidade genética de espécies comerciais. Tal afirmativa é justificada por ser uma das abelhas mais conhecidas e estudadas do Brasil e, apesar de restrições jurídicas, uma das mais cultivadas (Gehrke, 2010; Barbiéri, 2018; da Silva *et al.*, 2019). Prova o seu valor econômico especialmente para a polinização de culturas como tomates, abóbora, pitanga, café, goiaba e açaí (del Sarto, Peruquetti, & Campos, 2005; Bispo dos Santos *et al.*, 2009; Giannini *et al.*, 2015) e maçãs, quando associada à *A. mellifera* (Viana *et al.*, 2014), aumentando a qualidade e o tamanho dos frutos. Também é explorada para a produção de mel e própolis (Mercês *et al.*, 2013; Giannini *et al.*, 2015). Apresenta colônias de fácil encontro e reprodução, mas com dificuldade de estabelecimento de um plano de manejo, causada pelo desconhecimento da estruturação populacional da espécie, da variabilidade genética natural e de conflito de interesse entre os produtores, legislação e ambientalistas.

O panorama genético atual da espécie é conhecido de forma fragmentada por estudos de amplitude geográfica local, focados na região sudeste e nordeste, nem

sempre especificando a origem da colônia (se natural ou de meliponário), e usando marcadores genéticos distintos, ou seja, de difícil comparação entre eles, alguns dos quais obsoletos ou menos informativos (Waldschmidt *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2010; Batalha-Filho *et al.*, 2010; Tavares *et al.*, 2013; Araujo *et al.*, 2016).

Tradicionalmente, a espécie *M. quadrifasciata* é dividida em duas subespécies de acordo com o padrão de listras metassomais. *M. quadrifasciata quadrifasciata* (Lepetier) (MQQ) e *M. quadrifasciata antidioides* (Lepetier) (MQA), com divergência estimada por volta de 500 mil anos, forte estruturação entre os dois grupos e baixo compartilhamento de haplótipos mitocondriais (Batalha-Filho *et al.*, 2010). *M. quadrifasciata antidioides* ocorre desde o norte do estado de São Paulo até o nordeste brasileiro e é identificada pelas listras interrompidas do 2° ao 5° segmento metassomais. (Schwarz, 1948). A subespécie *M. quadrifasciata quadrifasciata*, caracterizada pelas listras contínuas, é encontrada na região sul. Entre os estados de Minas Gerais e São Paulo há uma região híbrida onde pode-se encontrar indivíduos com padrão intermediário (Kerr, 1976; Page & Kerr, 1990; Silveira *et al.*, 2002; Camargo & Pedro, 2013; Tavares *et al.*, 2013).

Devido a essas características, acreditava-se que ambas seriam facilmente distinguidas por análise molecular, morfológica (Waldschmidt, Barros, & Campos, 2000; Waldschmidt *et al.*, 2002; Moretto & Arias, 2005; Souza *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2013; Araujo *et al.*, 2016), modelagem de nicho e de resposta às variações climáticas (Teixeira & Campos, 2005; Teixeira, Silveira, & Harter-Marques, 2018). Porém, apesar de o padrão de listras do tergito ser um indicador da origem da colônia, este não é um caracter que deva ser usado isoladamente para a identificação das subespécies ou estruturação genética.

No semiárido do bioma Caatinga e no norte de Minas Gerais, áreas de ocorrência de *M. q. antidioides*, há populações com listras abdominais contínuas, claramente disjuntas da distribuição geográfica de *M. q. quadrifasciata* (Batalha-Filho *et al.*, 2010). No nordeste, onde aparentemente o Rio São Francisco é uma barreira para o fluxo gênico das duas variedades, há populações que agrupam geneticamente (mtDNA) e morfológicamente com *M. q. quadrifasciata*, concordando com o padrão de bandas contínuas (Araujo *et al.*, 2016). Porém, outros estudos afirmam que se agrupam geneticamente (nDNA e mtDNA) com *M. q. antidioides* (Batalha-Filho *et al.*, 2010;

Tavares *et al.*, 2013). Já no norte de Minas Gerais, populações com listras contínuas são mais parecidas geneticamente (RAPD e mtDNA) com *M. q. antidioides* (Waldschmidt *et al.*, 2000, 2002; Batalha-Filho *et al.*, 2010). O padrão de listras também não coincide com análises de estruturação genética das populações (Nascimento *et al.*, 2010; Batalha-Filho *et al.*, 2010). No sul do Brasil, algumas colônias com listras contínuas foram identificadas como mais próximas de *M. q. antidioides* (Tavares *et al.*, 2013) podendo já ser uma consequência do transporte indiscriminado realizado pelos criadores. Provavelmente, as listras contínuas são um caracter ancestral compartilhado entre as subespécies, já que esta característica é plesiomórfica no subgênero *Melipona* (*Melipona*) (Batalha-Filho *et al.*, 2010).

A espécie está catalogada oficialmente como em perigo de extinção no estado do Rio Grande do Sul (Marques *et al.*, 2003; Rio Grande do Sul, 2014a), mas não há registros de ocorrência natural há mais de 50 anos (Witter & Blochtein, 2008; Gehrke 2010; comunicação oral meliponicultores amostrados). Há relatos da existência desta espécie por volta da década de 1940 no município de Não-me-Toque (comunicação oral Meliponicultor Oldenir Nowack). As colônias mantidas no Rio Grande do Sul atualmente foram trazidas, em sua maioria, de Santa Catarina, contra a legislação local (Rio Grande do Sul, 2014b, comunicação oral meliponicultores amostrados). E nos últimos anos diversos meliponicultores relataram mortes de colônias manejadas neste estado (Díaz *et al.*, 2017).

Os riscos para as populações de *M. quadrifasciata* incluem a perda de habitat devido desmatamento (Araujo *et al.*, 2016), patologias do sistema digestório (Díaz *et al.*, 2017) e, acredita-se que com as mudanças climáticas futuras, tanto *M. quadrifasciata quadrifasciata* quanto *M. quadrifasciata antidioides* irão alterar a área de ocorrência em direção ao litoral e a área de sobreposição das duas subespécies, aumentando a possibilidade de formação de híbridos. As consequências seriam mais graves para *M. q. quadrifasciata*, que perderia substancialmente área de ocorrência e, já estando ameaçada, poderia se tornar extinta (Teixeira *et al.*, 2018). Outro risco claro é o uso dos agrotóxicos. Os defensivos utilizados em transgênicos Bt e em plantas resistentes ao Glifosato são tóxico para as larvas de *M. quadrifasciata*, causando a morte ou efeitos subletais. O herbicida mais utilizado no mundo, o Glifosato, por exemplo, é mais tóxico para as larvas de *M. quadrifasciata* do que o inseticida Imidacloprid (Seide *et al.*, 2018).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material biológico

Inicialmente, buscou-se em periódicos artigos publicados até o ano de 2015 dados de ocorrência natural de *M. quadrifasciata* em e remanescentes florestais. Com a ausência de registros, apenas meliponários foram amostrados.

Foram coletadas amostras em 41 meliponários sediados em 24 municípios dos estados do sul do Brasil (Tabela 1, Figura 1). As coletas foram agendadas com cada proprietário previamente. No momento da visita aos produtores, foram obtidos dados como o tempo de estabelecimento do plantel, número de colônias, as atividades desenvolvidas e a matriz ambiental no qual o meliponário está alojado. As atividades foram classificadas em quatro tipos, não mutuamente excludentes: A) *Hobby*: compra, transporte e captura de colônias com ninhos-isca e divisão racional da colônia, com exploração comercial das divisões rara ou ocasional; B) *Comércio*: compra, transporte e captura com ninhos isca e divisão racional de colônias recorrentes, com o objetivo de aumentar o plantel para comercializar as divisões; C) *Educação*: compra, transporte e divisão racional das colônias com o objetivo de treinar meliponicultores e para educação ambiental das escolas locais; D) *Pesquisa*: compra, transporte e divisão racional das colônias para pesquisas sobre diversidade local (Tabela 2). A matriz foi definida pela observação do entorno, como aglomerados urbanos (independentes do tamanho), atividades agropecuárias ou locais de floresta nativa. Foi coletado o histórico individual de cada uma das colônias, quando conhecido, e o padrão das listras abdominais dos indivíduos, para o reconhecimento de possível cruzamento entre as subespécies (Apêndice - Tabela 1).

Coletou-se uma operária de cada colônia encontrada nos meliponários (Apêndice – Tabela 1), que foi mantida em etanol 99% até o momento da extração de DNA. A extração de DNA foi realizada a partir de uma perna de cada indivíduo seguindo o protocolo de Chelex® 100 (Walsh, Metzger, & Higuchi, 2013). As pernas foram maceradas com 100µl de Chelex e 5µl de proteinase K por amostra e, em seguida, a mistura foi aquecida por uma hora a 55°C, seguido de 15 minutos a 99°C e 37°C por um minuto, a fim de inibir a atividade da proteinase K.

Figura 1: Distribuição geográfica dos meliponários amostrados nos estados de Santa Catarina e Paraná. ● Meliponários com presença apenas de *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* (MQQ). ▲ Meliponários com histórico conhecido de presença de *Melipona quadrifasciata antidioides* (MQA). Paraná: Santo Antônio da Platina e Cambará (SAPCAM); Pato Branco (PBr); Prudentópolis (Pru); Curitiba (Cur); Campo Magro (CMa); Mandirituba (Man); Morretes (Mor) e Quatro Barras (QBa). Santa Catarina: Jaraguá do Sul e Guaramirim (JDSGua); Mafra (Maf); Campo Alegre (CAL); Rio Negrinho e São Bento do Sul (RNeSBS); Blumenau (Blu); Rio do Sul e Aurora (RDSAur); Santa Rosa de Lima (SRL); Armazém (Arm); Herval d'Oeste (HDO); Luzerna (Luz) e Xanxerê (Xan).

Tabela 1: Distribuição geográfica de coleta e análise de *Melipona quadrifasciata*. Município visitado, seu código, coordenada geográfica e número de meliponicultores visitados. Quantidade de colônias amostradas e analisadas quanto ao gene COI e microssatélites

Estado	Município	Código	Coordenadas do município	Nº de meliponicultores	Nº de colônias amostradas	Nº de colônias analisadas	
						MtCOI	Genotipagem
PR	Santo Antônio da Platina	SAP	-50.085515 -23.292001	1	18	0	5
	Cambará	Cam	-50.081459 -23.037927	1	13	0	4
	Pato Branco	PBr	-52.688493 -26.229623	1	8	0	4
	Prudentópolis	Pru	-50.988419 -25.216587	1	24	7	10
	Curitiba	Cur	-49.222944 -25.510183	3	46	10	10
	Campo Magro	CMA	-49.390306 -25.375861	1	15	1	3
	Mandirituba	Man	-49.345730 -25.913868	3	39	8	10
	Morretes	Mor	-48.846345 -25.466871	1	10	7	10
	Quatro Barras	QBa	-49.022778 -25.385306	1	15	8	10
SC	Jaraguá do Sul	JDS	-49.194649 -26.605657	1	7	2	7
	Guaramirim	Gua	-49.005000 -26.474722	1	10	3	3
	Mafra	Maf	-50.045457 -26.165024	2	21	4	10
	Campo Alegre	CAI	-49.241912 -26.177726	1	29	4	10
	Rio Negrinho	RNe	-49.519999 -26.260921	1	6	0	6
	São Bento do Sul	SBS	-49.383534 -26.214743	1	54	1	6
	Blumenau	Blu	-49.051966 -26.875470	3	46	3	10
	Rio do Sul	RDS	-49.665082 -27.233082	2	14	1	3
	Aurora	Aur	-49.560666 -27.302398	1	34	3	7
	Santa Rosa de Lima	SRL	-49.139472 -28.072667	10	221	5	9
	Armazém	Arm	-48.993333 -28.202778	1	25	3	4
	Rio Fortuna	RFO	-49.122667 -28.073972	1	50	1	1
	Herval D'Oeste	HDO	-51.457602 -27.178168	1	16	3	5
	Luzerna	Luz	-51.467608 -27.127355	1	7	4	5
	Xanxerê	Xan	-52.410840 -26.872091	1	4	3	4
Total				41	737	89	158

Tabela 2: Meliponários amostrados nos estados de Santa Catarina e Paraná. Cada meliponário recebeu um código de identificação e teve dados como ano de estabelecimento, número de colônias de *Melipona quadrifasciata* amostradas, o tipo de manejo empregado e a matriz ambiental no qual está inserido.

Meliponário	Ano	Município	Nº de colônias	Manejo principal	Matriz
ARM1	2000	Armazém	25	Comércio	Rural
AUR1	2006	Aurora	34	Comércio	Rural
BLU1	2012	Blumenau	4	Hobbie	Urbano
BLU2	2010	Blumenau	18	Hobbie	Urbano
BLU3	2004	Blumenau	24	Pesquisa	Urbano
CAL1	2008	Campo Alegre	29	Hobbie/Educação	Misto
CAM1	2005	Cambará	13	Hobbie	Misto
CMA1	2014	Campo Magro	15	Hobbie	Misto
CUT1	2015	Curitiba	7	Hobbie/Comércio	Urbano
CUT2		Curitiba	22	Hobbie/Comércio	Urbano
CUT3	2000	Curitiba	17	Hobbie/Comércio	Urbano
GUA1	2012	Guaramirim	10	Hobbie/Comércio	Rural
HDO1	2007	Herval D'Oeste	16	Hobbie/Comércio	Rural
JDS1	2014	Jaraguá do Sul	7	Hobbie/Comércio	Urbano
LUZ1	2006	Luzerna	7	Hobbie	Rural
MAF1	1989	Mafra	16	Comercial/ Pesquisa pessoal	Rural
MAF2	2014	Mafra	5	Hobbie	Urbano
MAN1	2012	Mandirituba	22	Hobbie/Comércio	Rural
MAN2	2012	Mandirituba	4	Hobbie/Comércio	Rural
MAN3	2006	Mandirituba	13	Hobbie/Comércio	Rural
MOR1	2008	Morretes	14	Hobbie	Florestal
PBR1	2005	Pato Branco	8	Hobbie	Urbano
PRU1	2005	Prudentópolis	24	Hobbie/Educação	Urbano
QBA1	2012	Quatro Barras	15	Hobbie	Florestal
RDS1	2006	Rio do Sul	7	Hobbie/Comércio	Urbano
RDS2	2014	Rio do Sul	7	Hobbie	Urbano
RFO1	2012	Rio Fortuna	50	Comércio	Rural
RNE1	2010	Rio Negrinho	6	Hobbie	Rural
SAP1	2005	Santo Antônio da Platina	18	Comércio/Hobbie	Urbano
SBS1	2013	São Bento do Sul	54	Hobbie	Urbano
SRL1	2000	Santa Rosa de Lima	22	Comércio	Rural
SRL10	2005	Santa Rosa de Lima	42	Comércio	Rural
SRL11	2005	Santa Rosa de Lima	4	Comércio	Rural
SRL2	2003	Santa Rosa de Lima	14	Comércio	Rural
SRL3	2013	Santa Rosa de Lima	15	Comércio	Rural
SRL5	2013	Santa Rosa de Lima	32	Comércio	Rural
SRL6	2013	Santa Rosa de Lima	9	Comércio	Rural
SRL7	2013	Santa Rosa de Lima	34	Comércio	Rural
SRL8	2009	Santa Rosa de Lima	35	Comércio	Rural
SRL9	2005	Santa Rosa de Lima	14	Comércio	Rural
XAN1	2014	Xanxerê	4	Hobbie	Urbano

3.2. Amplificação dos marcadores genéticos

Foram amplificados cinco marcadores nucleares do tipo microssatélite e um fragmento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI).

3.2.1. Microssatélites

Para os microssatélites, os pares de *primers* utilizados foram os específicos Mqua, descritos por Tavares *et al.* 2013 (Tabela 3). Para realizar a amplificação, a sequência *forward* (F) de cada *primer* foi modificada com a adição da ‘cauda’ M13 à extremidade 5’ (5’TGTAACGACGGCCAGT3’) complementar ao *primer reverse* (R) M13 (5’ TGTAACGACGGCCAGT3’) etiquetado com um fluorocromo (6-FAM, NED e HEX) para posterior visualização após leitura em sequenciador automático (Schuelke, 2000).

Tabela 3: Característica dos *loci* de microssatélite utilizados. Ta: temperatura de pareamento. Te: tamanho de fragmento esperado, em pares de base.

<i>Locus</i>	Motivo	Sequência do <i>primer</i> 5’-3’	Ta (°C)	Te (pb)
Mqua4	(GC) ₅	F: CGCTGACTTTAAAATCGTTC R: TCGCTTCTGTTCGTTCTC	55	121-153
Mqua6	(TAT) ₇	F: TCAGAGAACAGACCCAATC R: GGACCTAATACCTGCACT	55	112-148
Mqua7	(AT) ₂₁	F: CGCACACGCTAACGGAACG R: CAGGACGAGGCGTAACCG	65	131-185
Mqua19	(TC) ₈	F: GGGACGCACGATCTCGGACG R: GGACACGCCCCGTGGGAAGAG	65	120-194
Mqua20	(GGACG) ₅	F: CGTGACGGGATAATCCTTGC R: TCACCGAGCCTGTTTTTCAGG	60	189-234

A solução para amplificação dos *loci* por reação em cadeia da polimerase (PCR) consistiu de 1 µg de solução de DNA com concentração entre 30 e 100 ng/µl, 5 µl de *Master Mix 2x* (Promega n° CatM7132), 0,37 µl do *primer forward* contendo a cauda M13 (10 µM), 0,75 µl do *primer reverse* (10 µM), 0,75 µl do *primer* M13 (10 µM) marcado com fluorocromo e 2,13 µl água milli-Q autoclavada, completando 10µl. A amplificação ocorreu com um primeiro passo de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, temperatura específica de cada *primer* por 20 segundos (Tabela 3) e 30 segundos a 72°C. Posteriormente, para o pareamento

do *primer* M13 marcado, seguiu-se 15 ciclos com as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 30 segundos, 53°C por 20 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto. A extensão final foi de 10 minutos a 72°C. O produto da reação de PCR foi diluído 40 vezes em água mili-Q, e 1µl deste produto foi adicionado a 9µl de mistura de formamida (Formamida HI-DI – *Applied Biosystems n° Cat. 4311320*) e padrão de peso molecular (GeneScan™ 500 ROX™ – *Applied Biosystems n° Cat. 4310361*), 8,925 µl e 0,075 µl, respectivamente. Os alelos foram genotipados com sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) pelo Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), sediado na UNESP – Campus de Jaboticabal.

3.2.2. *MtDNA*

Para a amplificação do gene mtCOI, foi utilizado o par de iniciadores específicos para a espécie descritos por Batalha-Filho et al. (2010), COX2 (5' CAATTACTATATTATTATTTGATCG 3') e COX4 (5' CTTGAAATGAAATTATATTTTCATGTTG 3'). A reação de amplificação consistiu de 1 µg de solução de DNA com concentração entre 30 e 100 ng/µl, 5 µl de *Master Mix 2x* (*Promega n° CatM7132*) e 0,5 µl de cada um dos *primers* 10mM/µl, completando 10µl com água. A amplificação ocorreu da seguinte maneira: um passo de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto e 20 segundos e 2 minutos a 72°C, adicionado de um passo final de extensão de 10 minutos a 72°C.

A qualidade dos produtos da PCR foi verificada por meio da eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídeo e visualizados por meio da exposição à luz UV em transiluminador. Os produtos de PCR foram purificados com o conjunto de reagentes QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante para a realização do sequenciamento e quantificadas com Nanodrop (ND 1000). Em seguida, 50ng de cada produto de PCR com concentração mínima de 10ng/µl foram encaminhadas ao CREBIO para sequenciamento em sequenciador automático de DNA modelo ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado apenas no sentido *Forward* da fita de DNA e caso

houvesse a necessidade de confirmação foi realizado o sequenciamento da fita *Reverse* separadamente.

A leitura e a verificação da qualidade dos picos de STR e das sequências de DNA foram realizadas com o programa Geneious 7.1.3 (Kearse *et al.*, 2012), assim como o alinhamento das sequências de mtDNA e a formação dos arquivos adequados para as etapas subsequentes.

3.3. Análise dos dados

As localidades amostradas foram agrupadas levando em consideração a proximidade geográfica e o transporte relatado pelos próprios produtores, a fim de aumentar o número amostral para a realização das análises populacionais, evitando o desvio por baixa amostragem e dados perdidos e aumentando a confiabilidade dos resultados. Para que não houvesse comprometimento das análises por unir demes distintas, os valores de FST entre as localidades foram previamente verificadas para que não ultrapassasse 0,2. Desta forma, os códigos utilizados para as localidades analisadas são o resultado da junção dos nomes das localidades originais. Os municípios agrupados foram: Santo Antônio da Platina e Cambará (SAPCam), , Jaraguá do Sul e Guaramirim (JDSGua), Rio Negrinho e São Bento do Sul (RNeSBS) e Rio do Sul e Aurora (RDSAur), .

3.3.1 Marcadores Microsatélites

3.3.1.1. Caracterização das localidades e distribuição geográfica da diversidade

A diversidade genética foi acessada através de diversos índices. Para cada *locus*, foram calculados o número médio de alelos, a Heterozigosidade esperada (H_e) e a observada (H_o), o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW), a frequência de alelos nulos (F_{eqNull}) e o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) com o programa Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007). O índice de fixação alélica (F_{is}) foi calculado pelo GDA 1.1 (Lewis & Zaykin, 2001).

Para cada localidade, foi calculada a riqueza alélica padronizada por rarefação (A_r), com o programa HP Rare 1.1 (Kalinowski, 2005); o desequilíbrio de ligação entre

os *loci*, a adesão ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg e o coeficiente de fixação alélica intrapopulacional (Fis) pelo programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) com 1023 permutações; os valores de Fis foram considerados diferentes de 0 quando $p \leq 0,05$. A Heterozigosidade observada (H_o), a Heterozigosidade esperada não-enviezada (uHe), a porcentagem de loci polimórficos (P), o número de alelos com frequência maior que 5% ($Na5\%$), o número efetivo de alelos por locus (N_a), Índice de Informação (I) e o número de alelos privados por população (PAS) foram calculados com GenAlex 6.5 (Peakall, 2012).

O tamanho efetivo populacional (N_e) de cada localidade foi calculado com o método Sibship Frequency (SF) Full Likelihood (Wang, 2009), implementado pelo programa Colony 2.0.6.5 (Jones & Wang, 2010), com intervalo de confiança de 95% (IC), assinalando a opção de espécie haplodiplóide, considerando ambos os sexos monogâmicos, permitindo endogamia. Foram realizadas 3 corridas de cadeia longa, com *prior* ótimo para o cálculo de N_e , assumindo acasalamentos ao acaso.

3.3.1.2. Estruturação populacional

O software MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) foi utilizado para gerar um dendograma de dissimilaridade genética com base no algoritmo UPGMA, cujo gráfico foi construído pelo programa FigTree 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Os coeficientes de diferenciação genética (F_{st}) par a par entre as localidades, Isolamento por Distância (IBD), através da correlação entre a distância genética e a geográfica, foram calculado com o teste de Mantel com o programa GenAlex 6.5 (Peakall, 2012). Para evitar erro do Tipo I, foi utilizado $p = 0,01$ (Cushman *et al.*, 2013).

A estrutura populacional e a ancestralidade dos indivíduos foram acessadas por agrupamentos baseados em modelos Bayesianos (*model-based clustering*) com o programa Structure 2.3.4 (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000). O modelo usou frequência alélica correlacionada e *admixture*, com 10 repetições de 100 mil *burn-in* e 1 milhão de permutações com K entre 1 e 10, dentre as quais o melhor número de populações foi escolhido através do método de Evanno (Earl & VonHoldt, 2012). Nenhuma informação foi utilizada para a definição dos grupos *a priori*. Para cada indivíduo e localidade, o método estima a proporção do seu genoma testado derivado de

cada um dos diferentes grupos. Estas proporções foram usadas para a criação de um mapa de distribuição das populações genéticas e para o cálculo de correlação de Pearson entre altitude e a proporção entre os grupos de cada localidade (Tabela 3 – Apêndice), com o programa Microsoft Excel.

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi utilizada para investigar a posição relativa das populações em um espaço multidimensional e foi calculado por meio do programa GenAlex 6.5 (Peakall, 2012) com 1000 permutações. Para o cálculo da PCoA, foi utilizada uma tabela de F_{st} gerada pelo mesmo programa, pela fórmula de Nei para G_{sr} (Peakall 2012). Os dados de distância foram transformados em matriz de covariância, e então a PCoA pode ser calculada. Foram usados os resultados provenientes da análise de estruturação pelo Structure para a coloração do gráfico da PCoA.

Para testar a estruturação dos grupos proposta pelo programa Structure e pela PCoA, foi feita a Análise de Variância Molecular (AMOVA) com 1000 permutações, também pelo programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

3.3.1.3. *Atribuição de origem e Detecção de migrantes*

A probabilidade de atribuição de indivíduos foi calculada pelo GeneClass2 (Piry *et al.*, 2004), usando critério de atribuição Bayesiano parcial (Rannala & Mountain, 1997). A probabilidade de exclusão das localidades de origem foi calculada com simulações de Monte Carlo das frequências alélicas (Paetkau *et al.*, 2004), com 10.000 reamostragens e valor de $\alpha = 0,001$. Indivíduos são atribuídos a uma localidade se forem excluídos de todas as outras populações ($p < 0,001$), mas não da população de origem ($P > 0,001$), seguindo o procedimento de avaliação de padrões forenses da vida selvagem (Manel *et al.*, 2002). O programa GeneClass2 calcula probabilidades de exclusão, e não necessita que todas as populações da espécie sejam amostradas. Desta forma, o método é capaz de excluir todas as populações amostradas como origem, e inferir que a população original da amostra testada não foi amostrada.

O programa GeneClass2 também calcula a probabilidade de uma colônia ser migrante ou possuir ancestrais recentes migrantes. O critério utilizado foi o parcialmente Bayesiano (Rannala & Mountain, 1997), e as probabilidades calculadas

usando L_h/L_{max} , onde L_h é a probabilidade de um indivíduo ser atribuído à população onde foi coletado e L_{max} é a probabilidade máxima de atribuição em todas as populações consideradas. Um indivíduo é considerado um migrante quando o valor de α de L_h/L_{max} for abaixo de 0,01 (Paetkau *et al.*, 2004).

O método utilizado pelo programa GeneClass2 não precisa de populações genéticas estruturadas para realizar testes de atribuição e exclusão, porém é necessário que as populações testadas tenham frequências alélicas distinguíveis, por isso, a atribuição de origem, a exclusão de origem e a detecção de migrantes de primeira geração foram realizadas usando as macroregiões hidrográficas dos estados para atribuição dos indivíduos, já usados como delimitadores em ações ambientais como comitês de bacia. São elas: Vale do Itajaí, Sul catarinense, Oeste catarinense, Norte catarinense, Sudoeste do Paraná, Metropolitana de Curitiba, Norte pioneiro paranaense e Sudeste paranaense.

3.3.2. MtDNA

3.3.2.1. Caracterização das localidades e distribuição geográfica da diversidade

Os índices de diversidade genética como Número de haplótipos (H), Número de sítios Segregantes (S), Diversidade Haplotípica (H_d), Diversidade nucleotídica (π), Número médio de diferenças nucleotídicas (k), do gene COI da amostra total e de cada uma das localidades foram calculados por meio do programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) com 1000 simulações.

A rede de haplótipos foi feita pelo programa Haplotype Viewer (<http://www.cibiv.at/~greg/haploviewer>) a partir de uma árvore construída com o algoritmo *Maximum Likelihood* implementado no programa MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). A probabilidade de atribuição de ancestralidade a um dos haplótipos da rede e a lista haplótipos de cada amostra foi gerada pelo programa TCS 1.21 (Clement, Posada, & Crandall, 2000). A lista de haplótipos foi utilizada para a criação de um mapa com os haplótipos presentes em cada localidade. Para a construção deste mapa, localidades próximas foram unidas para melhor visualização dos dados, de acordo com a Figura 1.

3.3.2.2. Estruturação populacional e caracterização das populações genéticas

O coeficiente de diferenciação genética (F_{st}) par a par entre as localidades foi calculado e utilizado para reconstrução filogenética por UPGMA pelo programa MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) e o teste de Mantel foram realizados com o programa GenAlex 6.5 (Peakall, 2012).

A inferência de unidades estruturadas foi realizada através BAPS 6 (Corander *et al.*, 2008) com modelo *admixture*. O valor testado de K variou de 1 a 10, com 10 repetições para cada valor de K. A estruturação proposta pelo BAPS foi testada por Análise de Variância Molecular (AMOVA) e os valores de F_{st} foram calculados pelo programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010), com 1023 e 10000 permutações, respectivamente.

Para comparar a diversidade genética dos meliponários do Paraná e de Santa Catarina com as colônias das demais regiões do Brasil e localizar a provável origem dos haplótipos exógenos da área do presente estudo, uma rede de haplótipos foi construída juntamente com as sequências de COI obtidas por Batalha-Filho *et al.*, (2010) de vários estados do Brasil (Códigos de acesso GenBank: FJ975620 a FJ975764, Figura 2), pelo programa Haplotype Viewer (<http://www.cibiv.at/~greg/haploviewer>) a partir de uma árvore construída com o algoritmo *Maximum Likelihood* implementado no programa MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011).

Figura 2: Mapa do Brasil mostrando em amarelo as localidades de coleta de *Melipona quadrifasciata* por Batalha Filho et al., (2010) usadas para a construção de uma rede de haplótipos com sequências do gene COI juntamente com as amostras deste estudo, em preto

Foram repetidas as análises de estruturação com programa BAPS 6 (Corander *et al.*, 2008) com modelo *admixture*, com o número de populações (k) variando entre 1 a 10, com 10 repetições para cada valor de k. Esta proposta de estruturação foi testada por Análise de Variância Molecular (AMOVA) e os valores de F_{st} destes grupos foram calculados pelo programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010), com 1023 e 10000 permutações, respectivamente.

4. RESULTADOS

Foram amostrados 41 meliponários, sendo o mais antigo estabelecido em 1989, no município de Mafra-SC, e o mais novo em 2015, em Curitiba-PR. A média de colônias de *M. quadrifasciata* é de 17,95 colônias por meliponário, variando de 4 a 54 colônias. Destes, 26 (63,4%) são mantidos exclusivamente ou não para atividade de *hobby* (Tipo A); 25 (60,9%) realizam regularmente atividades de comércio de colônias (Tipo B); 2 (4,8%) são mantidos para atividades educacionais (Tipo C); e 2 (4,8%) mantêm colônias para atividades acadêmicas (Tipo D). Quanto à matriz onde os meliponários estão estabelecidos, 2 (4,8%) podem ser considerados mantidos em matriz florestal; 3 (7,3%) estão em ambiente misto, com características rurais e fragmentos florestais próximos; 21 (51,2%) estão inseridos em ambiente rural; e 15 (36,5%) estão em ambiente predominantemente urbano.

4.1. Microsatélites

Todos os *loci* de microsatélite testados foram polimórficos, variando de 4 (Mq6) a 20 alelos (Mq7). O número médio de alelos por *loci* foi de 8,8. A H_o variou de 0,096 a 0,52 (Mq6 e Mq4, respectivamente) com média de 0,26, e a H_e variou de 0,129 a 0,73 (Mq19 e Mq7, respectivamente) com média de 0,4. Foram detectados desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos *loci* Mq6, Mq7 e Mq20 (amostra total), todos com excesso de homozigotos. A média de PIC ($0,375 \pm 0,176$) caracteriza que todos os *loci* de microsatélite são marcadores razoavelmente informativos (Botstein *et al.*, 1980). A taxa de alelos nulos foi considerada aceitável (Dakin & Avise, 2004), porém valores altos foram obtidos nos *loci* Mq6 e Mq7 (0,475 e 0,439, respectivamente) com média de 0,214. O índice Fis variou de -0,008 a 0,628 (Mq4 e Mq6, respectivamente), com média de 0,303. Os valores de todos estes índices estão detalhados por *loci* na Tabela 4. Todos os genótipos obtidos estão expostos na Tabela 2 do Apêndice.

Tabela 4. Medidas de variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata* por *locus* de microsatélite. Número de amostras (N), Número de alelos (A), Heterozigosidade observada (Ho) e Esperada (He), adesão ao equilíbrio de HW (com correção de Bonferroni), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), Alelos nulos (FeqNull) e Índice de Fixação (F) por *locus*.

Locus	N	A	Ho	He	HW	PIC	FeqNull	F
Mq4	123	10	0,52	0,516	NS	0,486	-0,028	-0,008
Mq6	94	4	0,096	0,257	*	0,24	0,475	0,628
Mq7	124	20	0,298	0,73	*	0,706	0,439	0,59
Mq19	141	5	0,135	0,129	NS	0,126	-0,025	-0,045
Mq20	155	5	0,245	0,378	*	0,321	0,212	0,351
Média (Desvio Padrão)		7,8	0,26 (0,12)	0,4 (0,17)		0,375 (0,176)	0,214 (0,193)	0,303 (0,263)

* $p \leq 0,05$. NS: Não significativo.

4.1.2. Caracterização genética das localidades

Foram encontrados desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg em pelo menos um *locus* em 9 localidades de coleta, mostrando excesso de homozigotos (Tabela 5).

Tabela 5: Populações de *Melipona quadrifasciata* em que foram detectados desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada um dos *locus*.

<i>Locus</i>	Mq7	Mq20
Populações	Cur	
	Mor	
	Pru	Blu
	Maf	QBa
	RNeSBS	RNeSBS
	SRL	
	CAI	

$p \leq 0,05$.

Foram obtidos valores de desequilíbrio de ligação entre os *loci* Mq4 e Mq6, quando a amostra total é analisada como uma única população panmítica, e em diferentes pares de combinações, quando as populações são comparadas par a par (Tabela 4 do Apêndice).

A riqueza alélica (Ar) das populações variou de 1,1 (Arm-SC) a 5 (HDO-SC), com total de $3,17 \pm 0,88$. Não foram encontrados alelos privados (PAS) em metade das populações, enquanto que os valores mais elevados foram encontrados em SAPCam-PR e em SRL-SC, com 0,6. Os valores de Ho variaram de 0 a 0,422, nas localidades Arm-SC e RDSAur-SC, respectivamente, com valor de 0,246 na amostra total. Os valores de He variaram de 0,16 a 0,422, nas localidades Arm-SC e PBr-PR, respectivamente, com valor de 0,287 na amostra total.

O índice de Fixação (Fis) teve o menor valor em Xan-SC e o maior valor em Arm-SC, sendo de -0,414 e 1, respectivamente, com valor de 0,04 na amostra total. O número efetivo populacional (Ne) variou de 1 a 21, nas localidades CMa-PR e RNeSBS-SC, respectivamente, com valor de 48 na amostra total. O tamanho amostral (N), a riqueza alélica (Ar) e outros índices de cada uma das localidades amostradas estão na Tabela 6.

Tabela 6: Medidas de diversidade genética de microssatélites das populações de *Melipona quadrifasciata* do sul do Brasil. População (Pop), tamanho amostral (N), a porcentagem de *loci* polimórficos (P), número médio de alelos após rarefação (Ar), número de alelos efetivos (Na), média de alelos privados (PAS), heterozigosidade observada (Ho) e esperada não enviesada (uHe), índice de fixação (Fis), e o número efetivo populacional (Ne), com os respectivos valores de erro padrão (SD).

Pop	N	P %	Ar	Na (SD)	PAS (SD)	Ho (SD)	uHe (SD)	F	Ne (SD)
SAPCam	10	80	2,6	1,35 (0,43)	0,6 (0,4)	0,254 (0,08)	0,287 (0,11)	-0,018 (0,09)	11 (5-33)
PBr	5	60	1,4	2,387 (0,83)	0	0,36 (0,16)	0,422 (0,18)	-0,022 (0,21)	4 (2-20)
Pru	10	80	2,8	1,875 (0,70)	0	0,38 (0,14)	0,397 (0,14)	-0,028 (0,13)	9 (4-25)
Cur	10	80	2,6	1,212 (0,34)	0	0,252 (0,12)	0,26 (0,10)	-0,039 (0,14)	9 (4-26)
CMa	3	40	1,3	1,36 (0,22)	0	0,2 (0,20)	0,307 (0,20)	0 (0,63)	1
Man	10	60	2,6	1,242 (0,36)	0,2 (0,2)	0,32 (0,14)	0,256 (0,11)	-0,294 (0,06)	13 (6-40)
Mor	10	60	1,3	1,802 (0,49)	0	0,291 (0,14)	0,306 (0,15)	-0,032 (0,03)	10 (5-28)
Qba	10	80	2,7	1,741 (0,65)	0,4 (0,245)	0,3 (0,12)	0,385 (0,14)	0,237 (0,25)	11 (5-30)
JDSGua	10	80	1,2	1,436 (0,20)	0	0,229 (0,10)	0,269 (0,10)	0,017 (0,16)	16 (8-42)
Maf	10	60	1,8	1,437 (0,38)	0,2 (0,2)	0,09 (0,04)	0,182 (0,13)	0,173 (0,17)	8 (4-23)
CAI	10	100	1,2	1,502 (0,29)	0	0,27 (0,14)	0,276 (0,10)	0,007 (0,16)	10 (5-26)
RNeSBS	12	80	1,3	1,812 (0,49)	0,4 (0,4)	0,156 (0,06)	0,328 (0,14)	0,401 (0,13)	21 (10-50)
Blu	10	80	1,2	1,44 (0,22)	0	0,287 (0,18)	0,267 (0,12)	-0,14 (0,28)	9 (4-26)
RDSAur	10	80	1,3	1,812 (0,36)	0,4 (0,4)	0,422 (0,17)	0,371 (0,13)	-0,178 (0,13)	8 (4-24)
SRL	10	60	1,2	1,41 (0,21)	0,6 (0,4)	0,102 (0,04)	0,237 (0,11)	0,4 (0,20)	4 (2-20)
Arm	4	20	1,1	1,4 (0,4)	0	0 (0)	0,16 (0,16)	1 (0,16)	
HDO	5	40	5,0	1,227 (0,38)	0	0,09 (0,05)	0,233 (0,14)	0,565 (0,02)	2 (1-)
Luz	5	80	1,3	1,519 (0,18)	0	0,33 (0,09)	0,334 (0,1)	-0,119 (0,08)	3 (2 -)
Xan	4	40	4,9	1,148 (0,39)	0,2 (0,2)	0,25 (0,19)	0,186 (0,13)	-0,414 (0,17)	5 (2-30)
Total	158	66,32 (4,6)	3,17 (0,88)	1,532 (0,09)		0,241 (0,029)	0,287 (0,02)	0,040 (0,04)	48 (34-73)

Valores em negrito $p \leq 0,05$.

4.1.3. Estruturação Populacional

O dendrograma mostra que a população de SRL-SC é basail em relação às demais, que podem ser separadas em dois grupos: o primeiro formado apenas por localidades do Paraná, e o segundo com as localidades do de Santa Catarina, somado das localidades paranaenses de CMa e Mor (Figura 3).

Figura 3: Dendrograma UPGMA gerado por análise dos marcadores de microssatélites para as 16 populações de *Melipona quadrifasciata* do sul do Brasil.

O valor de F_{st} foi 0,12. Entre as localidades, variam entre 0 (entre Cur-PR, Man-PR e QBa-PR, entre JDS-SC e HDO-SC, entre Maf-SC e Arm-SC, entre CAI-SC e RNeSBS-SC, entre RNeSBS-SC, Arm-SC e Luz - SC) e 0,597 (entre Xan-SC e SRL-SC). Os valores de F_{st} entre todas as localidades estão expostos na Tabela 7. O teste de Mantel indicou que não existe correlação entre a distância genética e a geográfica ($R^2 = 0,0067$, $p = 0,01$).

Tabela 7: Comparações par a par de valores de Fst obtidos com 5 marcadores de microssatélites entre populações de *Melipona quadrifasciata* do sul do Brasil.

	SAPCam	PBr	Pru	Cur	CMa	Man	Mor	Qba	JDSGua	Maf	CAI	RNeSBS	Blu	RDSAur	SRL	Arm	HDO	Luz
SAPCam																		
PBr	0,116																	
Pru	0,050	0,060																
Cur	0,119	0,138	0,103															
CMa	0,419	0,262	0,431	0,498														
Man	0,185	0,164	0,159	0,000	0,536													
Mor	0,302	0,107	0,260	0,303	0,140	0,347												
Qba	0,108	0,163	0,104	0,000	0,486	0,000	0,312											
JDSGua	0,459	0,291	0,437	0,480	0,118	0,478	0,266	0,470										
Maf	0,406	0,373	0,410	0,426	0,344	0,455	0,274	0,400	0,291									
CAI	0,317	0,210	0,310	0,310	0,020	0,349	0,117	0,306	0,068	0,128								
RNeSBS	0,309	0,190	0,297	0,291	0,027	0,312	0,116	0,285	0,098	0,061	0,000							
Blu	0,521	0,376	0,490	0,526	0,116	0,535	0,235	0,518	0,025	0,340	0,073	0,118						
RDSAur	0,477	0,309	0,427	0,491	0,233	0,486	0,244	0,478	0,015	0,312	0,115	0,154	0,034					
SRL	0,444	0,400	0,428	0,474	0,544	0,485	0,419	0,451	0,423	0,400	0,348	0,334	0,489	0,419				
Arm	0,247	0,131	0,231	0,242	0,071	0,284	0,123	0,228	0,146	0,000	0,001	0,000	0,176	0,195	0,323			
HDO	0,531	0,329	0,493	0,539	0,064	0,542	0,316	0,531	0,000	0,456	0,128	0,134	0,048	0,142	0,563	0,205		
Luz	0,357	0,193	0,347	0,384	0,152	0,390	0,170	0,369	0,017	0,083	0,002	0,000	0,127	0,058	0,299	0,000	0,205	
Xan	0,446	0,308	0,412	0,505	0,044	0,530	0,231	0,489	0,280	0,485	0,215	0,173	0,263	0,347	0,597	0,215	0,185	0,356

Quando o número de populações genéticas e a ancestralidade são investigados, o número de *clusters* mais provável é de $K = 2$ (Figura 4), e pode-se observar grande miscigenação na maior parte das populações. Com a probabilidade de atribuição a um ou ao outro *cluster* de cada indivíduo, foi construído um mapa de distribuição da ancestralidade (Figura 5). A tendência que se observa é a de separação entre as populações do Paraná (maior proporção da população ‘vermelha’) e de Santa Catarina (maior proporção da população ‘verde’), com exceção da população de Xan-SC, que se identifica com as demais populações do Paraná, e da população Mor-PR, que se identifica com as demais de Santa Catarina. A correlação entre a proporção dos clusters sugeridos pelo Structure e a altitude foi moderada ($r = 0,529$ $p = 0,001$), sendo assim, o cluster verde pode ser denominado de ‘baixa altitude’ e o cluster vermelho de ‘alta altitude’.

Figura 4: Análise de estruturação mostrando $k = 2$ realizada com marcadores microssatélite de populações de *Melipona quadrifasciata* do sul do Brasil.

Figura 5: Mapa de distribuição das proporções de cada *cluster* calculado por análise de estruturação genética e ancestralidade de *Melipona quadrifasciata* do sul do Brasil, realizado com marcadores de microsatélite. As cores correspondem à análise gerada pelo programa Structure.

O gráfico de dispersão da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) reflete a tendência de separação entre as populações do Paraná e de Santa Catarina ao longo do primeiro eixo, com exceção das localidades de Mor-PR e CMa-PR, que se agrupam com as demais de Santa Catarina (Figura 6). Pode-se recuperar a classificação feita pelo programa Structure, porém, na PCoA a localidade Xan-SC está mais próxima das demais amostras de Santa Catarina, enquanto que SRL-SC se encontra em posição intermediária.

Figura 6: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseado em marcadores de microssatélites das localidades criadoras de *Melipona quadrifasciata* no sul do Brasil. As cores são correspondentes ao *cluster* com maior frequência de indivíduos de cada população determinado por Structure.

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada de acordo com a separação proposta pelo Structure (com a localidade Xan-SC agrupada com as demais amostras do Paraná e Mor-PR com as amostras de Santa Catarina) e com a separação proposta pela PCoA (Xan-SC e Mor-PR com as demais amostras de Santa Catarina). Nenhuma das duas abordagens corrobora para a distinção de duas populações genéticas estruturadas. Tanto na separação proposta por Structure quanto a separação proposta pela PCoA, a diversidade dos marcadores está concentrada dentro das populações (87,28% e 87,53%, respectivamente), enquanto que o restante (13,40% e 13,70%, respectivamente) se encontra entre as populações, sem diferenciação entre os grupos ($F_{st} = 0,127$ e $0,124$, respectivamente) (Tabela 8).

Tabela 8: Amova hierárquica de marcadores microsatélites de *Melipona quadrifasciata* do sul do Brasil. A separação das localidades em dois grupos foi realizada de acordo com a separação proposta pelas análises de estruturação Structure e PCoA.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Componente de variação	Porcentagem de variação
Separação proposta por Structure			
Entre os grupos	1	-0,00123 Va	-0,68
Entre populações dentro dos grupos	14	0,02430 Vb	13,40
Dentro de populações	300	0,15827 Vc	87,28
Separação proposta por PCoA			
Entre os grupos	1	-0,00223 Va	-1,23
Entre populações dentro dos grupos	14	0,02478 Vb	13,70
Dentro de populações	300	0,15827 Vc	87,53

4.1.4. Atribuição de origem e Detecção de migrantes

A atribuição de indivíduos nas macrorregiões teve índice de qualidade de 35,97%, e apenas 63 indivíduos (39,9%) foram atribuídos à própria macrorregião de coleta. As probabilidades de atribuição de origem de cada indivíduo estão expostas na tabela 5 do Apêndice. O teste de exclusão de origem obteve índice de qualidade de 17,20%, com atribuições corretas (atribuição ao local de coleta) de 43 indivíduos (27,2%), porém, não foi capaz de excluir todas menos uma macrorregião. O teste de migrantes de primeira geração indicou sete indivíduos. As probabilidades de atribuição pelo teste de exclusão de origem e a indicação dos indivíduos migrantes estão na tabela 6 do Apêndice.

4.2. DNA mitocondrial

4.2.1. Caracterização genética das localidades e distribuição geográfica da diversidade

Foram obtidas sequências de 692 pb de comprimento de 81 indivíduos distribuídos em 17 locais de coleta, onde foram encontrados 23 haplótipos (números de acesso GenBank MK425767 - MK425847). O número de haplótipos variou de 1, nas localidades Xan-SC e QBa-PR, a 7, na localidade Man-PR. A diversidade nucleotídica (P_i) da amostra total foi de 0,004, e o maior valor foi de 0,007, encontrado em HDO-SC

e Arm-SC. Os demais índices de diversidade de todas as localidades de coleta estão expostos na Tabela 9.

Tabela 9: Medidas de diversidade genética de populações de *Melipona quadrifasciata* do sul do Brasil. Localidade, número amostral (N), número de haplótipos (H), número de sítios segregantes (S), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (Pi), número médio de diferenças nucleotídicas (k).

Localidade	N	H	S	Hd	Pi	k
Pru	7	3	5	0,666	0,003	2,285
Cur	10	4	8	0,733	0,004	2,866
CMa	2	1	0	0	0	0
Man	8	7	9	0,964	0,004	3,285
Mor	7	3	3	0,523	0,001	1,047
QBa	8	1	0	0	0	0
JDSGua	3	3	2	1	0,001	1,333
Maf	4	3	2	0,8333	0,001	1,166
CAI	4	4	5	1	0,003	2,5
RNeSBS	2	2	1	1	0,001	1
Blu	3	2	1	0,6667	0,001	0,666
RDSAur	4	3	2	0,8333	0,001	1,166
SRL	6	1	0	0	0	0
Arm	3	2	8	0,666	0,007	5,333
HDO	3	3	8	1	0,007	5,333
Luz	4	3	8	0,833	0,005	4
Xan	3	1	0	0	0	0
Total	81	23	20	0,856	0,004	2,702

Apenas dois haplótipos possuem frequência maior que 5% e estão distribuídos em mais de duas localidades de coleta. Foram encontrados 14 haplótipos exclusivos (60,86% dos haplótipos amostrados) distribuídos em sete locais (Tabela 7 do Apêndice): um haplótipo exclusivo em Blu-SC (H13), JDSGua-SC (H15) e em CAI-SC (H16), 2 haplótipos em Maf-SC (H8 e H14) e em Pru-PR (H4 e H20), 3 haplótipos em Man-PR (H21, H22 e H23) e 3 haplótipos em Luz-SC (H12, H18 e H19) e 1 em HDO-SC (H17). A rede de haplótipos está representada na Figura 7. O haplótipo 1 tem a maior probabilidade de ser o ancestral da rede (0,267). A distribuição geográfica dos haplótipos foi utilizada para a confecção de um mapa (Figura 8).

Figura 7: Rede de haplótipos do gene mtDNA COI de *Melipona quadrifasciata*. O tamanho dos círculos representa o número de amostras contendo este haplótipo e os pontos azuis sem identificação representam passos mutacionais não amostrados. A lista de haplótipos está na Tabela 7 do Apêndice.

Figura 8: Mapa do sul do Brasil com a distribuição dos 23 haplótipos de COI mtDNA de *Melipona quadrifasciata* encontrado distribuídos em 14 localidades. Os círculos mostram a frequência de cada haplótipo na localidade e não expressam tamanho amostral. Os pontos pretos representam locais amostrados, mas que não tiveram as amostras sequenciadas para o gene COI.

4.2.2. Estruturação populacional

A reconstrução filogenética (Figura 9) gerou ramos com pouco suporte e não há separação das sequências conforme o local de coleta.

Figura 9: Dendrograma UPGMA gerado por análise do gene COI de *Melipona quadrifasciata* do sul do Brasil. O comprimento do braço é proporcional ao número de substituições nucleotídicas.

Entre as localidades, os valores de F_{st} variaram de valores negativos (entre Cur-PR, Arm-SC e Luz-SC, entre Man-PR, Mor-PR, CAI-SC, RNeSBS-SC, Arm-SC e RDSAur-SC, entre JDSGua-SC, CAI – SC, RNeSBS-SC, Arm-SC, entre Arm-SC, Luz-SC e HDO-SC, entre Luz- SC e Cur-PR) e 1 (entre QBa-PR, Xan-SC e CMa-PR, e entre SRL-SC e QBa-PR), e sendo de 0,244 na amostra total. Nota-se também que a localidade Pru-PR é significativamente diferente de todas às demais. Os valores de F_{st} entre as demais localidades estão detalhados na Tabela 10. O teste de Mantel indica que não há correlação entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas ($R^2 = 9$, $p=0,1162$).

Tabela 10: Comparações par a par de valores de Fst obtidos com sequências do gene COI entre populações de *Melipona quadrifasciata* do sul do Brasil.

	Pru	Cur	CMa	Man	Mor	QBa	JDSGua	Maf	CAI	RNeSBS	Blu	RDSAur	SRL	Arm	HDO	Luz
Cur	0,40															
CMa	0,80	0,67														
Man	0,38	0,05	0,59													
Mor	0,57	0,24	0,86	-0,01												
QBa	0,67	0,16	1,00	0,18	0,48											
JDSGua	0,55	0,11	0,82	0,01	0,00	0,00										
Maf	0,59	0,18	0,84	0,19	0,37	0,22	0,12									
CAI	0,45	0,17	0,71	-0,08	-0,16	0,29	-0,10	0,27								
RNeSBS	0,57	0,12	0,86	-0,07	-0,30	0,00	-0,40	0,13	-0,17							
Blu	0,64	0,25	0,91	0,26	0,49	0,50	0,25	0,35	0,34	0,29						
RDSAur	0,57	0,18	0,84	0,01	-0,07	0,22	-0,36	0,22	-0,13	-0,44	0,35					
SRL	0,72	0,47	1,00	0,18	0,08	1,00	0,33	0,67	0,00	0,00	0,80	0,22				
Arm	0,22	-0,07	0,50	-0,20	-0,12	0,11	-0,03	0,13	-0,15	-0,12	0,18	-0,05	0,00			
HDO	0,29	0,14	0,58	0,11	0,34	0,43	0,35	0,40	0,25	0,34	0,44	0,36	0,47	-0,17		
Luz	0,36	-0,01	0,60	0,01	0,25	0,20	0,16	0,17	0,19	0,17	0,26	0,21	0,43	-0,12	-0,04	
Xan	0,72	0,47	1,00	0,18	0,08	1,00	0,33	0,67	0,00	0,00	0,80	0,22	0,00	0,00	0,47	0,43

A estruturação populacional bayesiana apontou $K = 4$ como o número mais provável de populações (Figura 10), com probabilidade igual à 1 (valor de $\log(\text{ml}) - 299.9441$). O Grupo A, de cor vermelha, está presente em todas as localidades, com exceção de Pru-PR. O Grupo B, de cor verde, é formado apenas por amostras provenientes de Pru-PR (113.Pru, 114.Pru, 115.Pru, 118.Pru, 119.Pru), sendo que esta origem é confirmada pelo produtor apenas para a amostra 119.Pru. O Grupo C, de cor azul, é formado por colônias provenientes do norte de Santa Catarina (135.Man, 104.Mor, 42.CAl) até a região de Curitiba-PR (93.CMa, 94.CMa, 135.Man, 104.Mor, 42.CAl) e por amostras coletadas em Pru-PR com origem declarada de Cur-PR (112.Pru, 116.Pru), sendo que 116.Pru apresenta abdômen com listras interrompidos, sendo um provável híbrido MQA. Em amarelo está o Grupo D, formado por colônias de indivíduos com as listras do abdômen interrompidas (156.Cur, 136.Man, 18.Arm, 59.HDO), com ou sem conhecimento de hibridação por parte do meliponicultor, e colônias com listras contínuas, mas que coexistiam com colônias de *Melipona quadrifasciata antidioides* (MQA) no mesmo meliponário, indicando possibilidade de hibridização (57.HDO, 63.Luz; 152.Cur). Estes grupos possivelmente são indicadores da procedência das colônias.

Figura 10: A estruturação populacional do gene COI de *Melipona quadrifasciata* mostra que existem 4 grupos genéticos separados por cores: A) Vermelho, presentes no Paraná e predominantes em Santa Catarina, B) Verde, de amostras do Paraná, C) Azul, do Paraná e norte de Santa Catarina, e D) Amarelo, para haplótipos de origem MQA.

A rede de haplótipos, quando colorida de acordo com os grupos genéticos propostos pelo BAPS, mostra o relacionamento entre os haplótipos (Figura 11) e a distribuição geográfica das linhagens no mapa (Figura 12).

Figura 11: Rede de haplótipos de *Melipona quadrifasciata* colorida conforme a indicação de estruturação populacional mostrando que existem 4 grupos genéticos separados por cores: A) Vermelho, presentes no Paraná e predominantes em Santa Catarina, B) Verde, de amostras do Paraná, C) Azul, do Paraná e norte de Santa Catarina, e D) Amarelo, para haplótipos de origem MQA.

Figura 12: Distribuição geográfica dos haplótipos de *Melipona quadrifasciata* colorida conforme a indicação de estruturação populacional que mostra 4 grupos genéticos: A) Vermelho, presentes no Paraná e predominantes em Santa Catarina, B) Verde, de amostras do Paraná, C) Azul, do Paraná e norte de Santa Catarina, e D) Amarelo, para haplótipos de origem MQA.

A análise de estruturação por AMOVA foi realizada considerando cada um dos 3 grupos propostos pelo BAPS (A, B e C) (Tabela 11). O Grupo D não foi utilizado por apresentar amostras exógenas sem representar uma população real. A AMOVA calculada com as amostras em suas localidades de coleta mostrou que a maior fonte de variação está dentro das populações (75,57%) enquanto que apenas 24,43% da variação é encontrada entre as populações, sugerindo a ausência de estruturação populacional. Porém, quando os indivíduos são organizados de acordo com a estruturação proposta pelo BAPS, em que provavelmente o agrupamento correto das colônias é recuperado,

vê-se que 75,88% da variabilidade é encontrada entre as populações e 24,12% dentro das populações, com F_{st} total = 0,758.

Tabela 11: AMOVA global das sequências de mtDNA COI de *Melipona quadrifasciata* provenientes do sul do Brasil.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Componente de variação	Porcentagem de variação
Amostras em suas localidades de coleta			
Entre populações	13	0,33638 Va	24,43
Dentro de populações	67	1,37678 Vb	75,57
Total		1,37678	
Provável agrupamento correto das colônias			
Entre Grupos	3	1,88120 Va	75,88
Dentro dos Grupos	77	0,59786 Vb	24,12
Total		2,47907	

$P < 0,001$.

As consequências da organização das amostras do sul do Brasil de acordo com a estruturação genética proposta pelo BAPS também são observadas nas análises de diferenciação populacional através do aumento dos valores de F_{st} (Tabela 12).

Tabela 12: Valores de F_{st} par a par das sequências de mtDNA COI de *Melipona quadrifasciata* das populações recuperadas pelo BAPS.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Grupo A	0		
Grupo B	0,762	0	
Grupo C	0,582	0,721	0
Grupo D	0,835	0,827	0,715

Valores em negrito $p \leq 0,05$.

A análise de dispersão por PCoA realizada com os indivíduos (Figura 13) separa os agrupamentos encontrados pelo BAPS através do eixo 1, que segrega as amostras do Grupo A, em contraposição ao Grupo D, sendo o Grupo B e C intermediários.

Figura 13: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseados em sequências do gene COI de *Melipona quadrifasciata* criadas no sul do Brasil. As cores correspondem à análise de estruturação: A) Vermelho, presentes no Paraná e predominantes em Santa Catarina, B) Verde, de amostras do Paraná, C) Azul, do Paraná e norte de Santa Catarina, e D) Amarelo, para haplótipos de origem MQA.

Os haplótipos deste estudo ficam próximos quando uma rede é construída com amostras obtidas de outras localidades do Brasil (Batalha-Filho *et al.*, 2010). Os indivíduos de Santa Catarina coletados por Batalha-Filho *et al.* (2010) se agrupam com as demais amostras do Grupo A. Os indivíduos que provavelmente são híbridos com MQA (Grupo D) se agrupam com amostras provenientes de Minas Gerais e Rio de Janeiro, local do qual MQA são nativas. Além disso, as amostras de Porto Alegre, RS, se agrupam com as de Santa Catarina, se alinhando com o relato dos produtores gaúchos que afirmam comprarem suas colônias principalmente do sul de Santa Catarina.

Figura 14: Rede de haplótipos de *Melipona quadrifasciata* obtida com sequências do gene COI de amostras do presente estudo e de Batalha-Filho et al., 2010. Os grupos obtidos pelo presente estudo estão coloridos como segue: Vermelho para Grupo A, Verde para Grupo B, Azul Grupo C e Amarelos para Grupo D. As demais amostras estão coloridas por estado de origem, conforme legenda.

A análise de estruturação genética e ancestralidade de populações de *M. quadrifasciata* com as amostras provenientes de toda a área de ocorrência da espécie mostra que o número mais provável de populações é $K=4$ (Figura 15). Todas as amostras do sul do Brasil, com exceção das colônias com histórico de cruzamento com indivíduos MQA (Grupo D), formam apenas um grupo, em vermelho. O Grupo D agrupa com indivíduos provenientes dos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Sergipe, provável origens das MQA encontradas no sul do Brasil, corroborado pelos relatos dos produtores. Um terceiro grupo, em azul, é formado por localidades dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Bahia, enquanto o quarto grupo, em verde, também abriga amostras de Minas Gerais e Bahia.

Figura 15: Análise de estruturação genética e ancestralidade de populações de *Melipona quadrifasciata* provenientes de toda a área de ocorrência da espécie. Localidades em negrito constituem as amostras obtidas pelo presente estudo. *Agrupamentos de localidades próximas

A variação da diversidade de populações de *M. quadrifasciata* de toda a distribuição da espécie está em sua maior parte (72,67%) dentro dos grupos propostos pelo BAPS, enquanto que apenas 27,33% estão dentro dos grupos (Tabela 13).

Tabela 13: Amova global das sequências de mtDNA COI de *Melipona quadrifasciata* de toda a distribuição da espécie, propondo quatro grupos conforme BAPS.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Componente de variação	Porcentagem de variação
Entre Grupos	3	2,34749	72,67
Dentro dos Grupos	213	0,88297	27,33
Total		3,23047	

P < 0,01.

Todos os valores de Fst são altos e significativos (Tabela 14) entre os quatro grupos propostos pelo BAPS para toda a distribuição da espécie. Os valores variam entre 0,404 (grupo Verde contra grupo Amarelo) e 0,799 (grupo Verde contra grupo Vermelho).

Tabela 14: Valores de Fst par a par das sequências de mtDNA COI de toda a distribuição de *Melipona quadrifasciata*. Os grupos foram sugeridos por análise de estruturação. Amarelo: populações de Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ), Espírito Santo (ES), Sergipe (SE) e Bahia (BA). Verde: populações de Minas Gerais (MG) e Bahia (BA). Vermelho: populações de Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR).

	Amarelo	Azul	Verde
Amarelo	0		
Azul	0,408	0	
Verde	0,404	0,687	0
Vermelho	0,733	0,797	0,799

Valores em negrito $p \leq 0,05$.

5. DISCUSSÃO

A maior parte dos meliponários amostrados tem fins comerciais. Este resultado já era esperado e se alinha a trabalhos de levantamento de criadores de outras regiões (Gehrke, 2010; Barbiéri, 2018). A facilidade em encontrar meliponários em áreas urbanas corrobora os autores que defendem a facilidade em criar estas espécies nativas de abelhas em pouco espaço e de forma segura (McGregor 1976).

Existem três fatores, não mutuamente exclusivos, observados em estudos comparativos entre estoques naturais e de meliponários que devem ser considerados na avaliação dos resultados de diversidade genética e estruturação populacional de meliponários: multiplicação dos ninhos, transporte de colônias e fluxo gênico com as colônias selvagens. Estes fatores podem ser mais importantes do que as características da paisagem natural no fluxo gênico das espécies cultivadas (Jaffé *et al.*, 2016). Uma limitação deste estudo é que não foram encontradas populações naturais de *Melipona quadrifasciata*, portanto não é possível realizar uma comparação entre os estoques naturais e manejados na área de estudo. Porém, os indícios de perda de diversidade e descaracterização das populações foram encontrados nos dados históricos dos meliponários e nas análises genéticas comparativas dos próprios meliponários.

5.1. Diversidade

5.1.1. Microssatélites

Este estudo encontrou de 4 a 20 alelos por *locus* de microssatélites no sul do Brasil, valor semelhante a Tavares *et al.* (2013) (3 a 15 alelos por *locus*) que analisaram a distribuição geográfica quase completa da espécie. A riqueza alélica encontrada também foi semelhante às outras espécies do gênero *Melipona*, como *M. fasciculata* (Silva *et al.*, 2018), *M. rufiventris* (Lopes *et al.*, 2009), *M. seminigra merrillae* (Francini *et al.*, 2009), *M. interrupta manausensis* (Francini *et al.*, 2010), *M. mondury* (Lopes *et al.*, 2010) e *M. yucatanica* (May-Itzá *et al.*, 2010).

5.1.2. *MtCOI*

Já com o gene *MtCOI*, a diversidade haplotípica e a nucleotídica podem ser consideradas altas, de acordo com o encontrado em populações naturais na distribuição quase completa da espécie ($H_d = 0,97$ e $P_i = 0,0054$) (Nascimento *et al.*, 2010). Entretanto, apesar dos valores de diversidade encontrados refletirem a manutenção do número esperado de haplótipos totais, essa diversidade é mal distribuída entre as localidades, variando de 0 a 1. Estes valores também são considerados altos quando se compara com outras espécies de populações naturais como *Partamona helleri* (Brito & Arias, 2010), *T. angustula* (Francisco *et al.*, 2017) e *M. subnitida* (Souza *et al.*, 2018).

A proporção de haplótipos exclusivos (60%) é alta e maior do que a de outros estudos com abelhas brasileiras de populações selvagens. Por exemplo, foram encontrados 50% de haplótipos exclusivos em *Partamona mulata* (Brito *et al.*, 2013), *P. helleri* (Brito & Arias, 2010) e em *Xylocopa frontalis* (Toledo *et al.*, 2017). Como esperado, a localização dos haplótipos pouco distribuídos e de baixa frequência na rede haplotípica é periférica (Templeton, 1998). Quando a divergência entre os haplótipos exclusivos é baixa, estes podem ser interpretados como originários de uma dispersão de uma localização central seguida por mutações, como em Pru-PR e em Maf-SC. Quando os haplótipos são divergentes, podem ser remanescentes após *bottlenecks*, como em Man-SC. Devido a natureza da amostragem deste estudo, *bottlenecks* podem ter sido causados artificialmente pela escolha arbitrária de colônias matrizes para a multiplicação. A região que compreende as localidades HDO-SC e Luz-SC parece misturar as duas possibilidades, com os haplótipos H12 e H19 próximos em uma extremidade da rede enquanto os haplótipos H17 e H18 estão próximos na outra extremidade.

5.2. Redução da diversidade: multiplicação de colônias

5.2.1. *Microsatélites*

Os resultados obtidos através do número efetivo de alelos (N_a), desequilíbrio de ligação, desequilíbrio de Hardy-Weinberg com déficit de heterozigotos, altos índices de fixação alélica (F_{is}) e baixo número efetivo populacional (N_e) em conjuntos são interpretados como consequências genéticas derivadas da fundação da população com

poucas colônias, multiplicação de matrizes preferenciais e consequente endogamia como verificado em outras espécies de abelhas cultivadas (Muñoz, Pinto, & De la Rúa, 2014b; Chapman *et al.*, 2018). Além do número de alelos, a composição pode ser alterada pelo manejo. A média de alelos privados foi baixa, mostrando que as localidades apresentam similaridades e podem ter perdidos alelos devido a seleção de poucas matrizes para a reprodução.

O número de alelos efetivos (N_a) indica se a proporção de alelos é uniforme e este índice diminui conforme a presença de alelos raros, facilmente perdidos por deriva genética. Os valores encontrados nos meliponários, variando de 1 a 2, podem ser interpretados como moderados, semelhante a populações naturais de *Melipona rufiventris* (Tavares *et al.*, 2007) e de *Euglossa* (Suni, Bronstein, & Brosi, 2014), e de *Apis mellifera* manejadas (Muñoz *et al.*, 2014b). Porém, estes valores são menores que de populações naturais de *Bombus* (Dreier *et al.*, 2014) e de populações naturais e de meliponários de *T. angustula* (Santiago, 2013).

Números de tamanho efetivo populacional e de alelos efetivos refletem a distribuição da diversidade e chamam a atenção para a perda de alelos de determinação sexual e auto-incompatibilidade (Zayed, 2004) que ocorrem em ambientes de dispersão restrita como os meliponários amostrados. Em populações naturais, baixos valores de N_e podem representar risco de extinção. Os valores de N_e e de heterozigosidade encontrados neste estudo podem significar perda da variabilidade genética devido endogamia, com possível perda de *fitness* e de colônias (Reed & Frankham, 2003). Porém, em meliponários, estes valores podem ser monitorados e controlados.

A redução da variabilidade humano-induzida reduz o número efetivo populacional (Bruford *et al.*, 2003; Zeder *et al.*, 2006; Meixner *et al.*, 2010; Byatt *et al.*, 2016). Valores de N_e calculados foram próximos do número de colônias amostradas, apesar do alto desvio padrão. Na amostra total, o valor de N_e ficou muito aquém do número de indivíduos coletados, consequência da homogeneidade das localidades. SRL-SC é a localidade com mais colônias observadas e atividade de comércio mais preponderante com mais de 500 colônias visualizadas, e apresentou valor de $N_e = 4$, indicando baixa variabilidade genética desta região. Enquanto RNeSBS-SC, com 50 colônias visualizadas, apresentou $N_e = 21$.

Foi encontrado desequilíbrio de ligação dentro das localidades, não encontrado em outro estudo usando estes marcadores (Tavares *et al.*, 2013). Este resultado pode ser um fenômeno das populações amostradas neste estudo, relacionados com déficit de heterozigotos e com desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg observados, devido cruzamentos não aleatórios que ocorrem em populações isoladas. Resultado semelhante foi descrito em populações de peixes de cativeiro que apresentam 48% de desequilíbrio de ligação, enquanto os indivíduos capturados na natureza mostraram 0% (Fox *et al.*, 2018).

Os valores aqui encontrados de H_o e H_e são considerados baixos quando comparados com outras melíponas, como *M. scutellaris* ($H_o = 0,31$ a $0,44$, $H_e 0,54$ a $0,57$) (Carvalho-Zilse *et al.*, 2009) *Melipona fasciculata* ($0,536$ e $0,453$) (Silva *et al.*, 2018), *M. yucatanica* (México: $0,38$ e $0,39$; Guatemala: $0,59$ e $0,45$) (May-Itzá *et al.*, 2010). Valores baixos de H_o podem ser consequência da frequência de alelos nulos, mas também é descrita em outras espécies manejadas (Carvalho-Zilse *et al.*, 2009).

Valores baixos de heterozigosidade (H_o) enquanto há índices de diversidade altos, como os encontrados por este estudo, indicam que há poucos alelos com alta frequência e muitos alelos com frequência baixa, já descrito em meliponários de *M. scutellaris* (Carvalho-Zilse *et al.*, 2009). O desvio de Hardy-Weinberg com ausência de heterozigotos em *M. scutellaris* também foi interpretado como causado por endogamia, consequência das práticas de meliponicultura (Carvalho-Zilse *et al.*, 2009), como a reprodução de algumas colônias usando critérios como a produção de mel, velocidade de produção de operárias e resistência a pragas (Jaffé *et al.*, 2015).

O coeficiente de endogamia tem amplitude maior do que a descrita para outras espécies de ASF, $0,016$ a $0,044$ em *Tetragonula carbonaria* (Chapman *et al.*, 2018), $0,32$ a $0,48$ em *Melipona scutellaris* (Carvalho-Zilse *et al.*, 2009) e $0,013$ a $0,194$ em *Tetragonisca angustula* (Santiago *et al.*, 2016) certamente devido à diferenciação de tratamentos de cada meliponicultor. Todos os meliponários de Santa Catarina e dois do Paraná (QBa-PR e Pru-PR) apresentam valores positivos para a fixação de alelos, esperado quando a introdução de novas colônias é baixa no meliponário ou estas são provenientes de locais próximos.

5.2.2. Gene *mtCOI*

Alguns locais possuem apenas um haplótipo, como em QBa-PR e Xan-SC. Em SRL-SC, mesmo com o maior número de meliponários do estudo, foi encontrado $H_d = 0$, considerado baixo. Esta localidade é considerada uma exportadora de colônias, e não importadora. Sendo assim, observamos uma consequência da multiplicação de matrizes nesta localidade e falta de fluxo gênico com outras populações.

Dos 23 haplótipos encontrados, apenas dois são amplamente distribuídos e possuem alta frequência ($H_1 = 27,16\%$ e $H_2 = 25,92\%$). 60,86% dos haplótipos são considerados raros. Assim como o encontrado com os microsatélites, esta pode ser uma consequência da atividade de multiplicar sempre as mesmas colônias matrizes. Poucos haplótipos com alta frequência também foram encontrados populações manejadas de *T. angustula* (Santiago *et al.*, 2016) e de *T. carbonaria* (Chapman *et al.*, 2018).

Localidades em que a prática de multiplicar colônias é bem estabelecida experimentam intensamente a seleção de haplótipos. A localidade de SRLArm-SC possui apenas dois haplótipos, um deles (H_1) presente em 90% das amostras, apesar do número de colônias visualizadas ser maior que 500. Este mesmo haplótipo foi o único encontrado em Xan-SC. Na localidade de QBa-PR, onde o número de colônias é abundante, apenas H_2 foi amostrado e possui alta frequência nas demais localidades do entorno. Dados similares foram encontrados em um apiário a dedicado à conservação de *A. mellifera sahariensis*, com valores de diversidade genética baixos quando comparados a outras populações no norte da África, em concordância com a suspeita falta de introdução de rainhas de outros apiários (Chahbar *et al.*, 2013).

5.3. Aumento da diversidade: Transporte de colônias

5.3.1. Microsatélites

Espera-se que localidades que importam colônias de outros lugares exibam excesso de heterozigotos e altos índices de diversidade, resultado da introdução de novos genótipos, responsável pelo desequilíbrio de Hardy-Weinberg (Chahbar *et al.*, 2013; López-Urbe *et al.*, 2017a). De acordo, o lugar onde foi encontrado maior heterozigosidade (H_o) foi RDSAur-SC (0,422), onde o produtor afirma que a maior parte das suas colônias vieram de outros municípios, especialmente SRL-SC e Arm-SC.

Este estudo não amostrou populações naturais, porém, não se pode descartar a hipótese de que machos provenientes dos meliponários possam estar causando perturbações genéticas nas colônias naturais. Este tipo de perturbação foi documentado em populações naturais de *Apis m. siciliana*, devido invasão de machos de colônias exógenas de *A. m. ligustica* (Muñoz *et al.*, 2014a).

5.3.2. *MtCOI*

A maior diversidade nucleotídica encontrada em HDO-SC é explicada pelo histórico que indicam a sua origem em pelo menos 4 municípios, inclusive de áreas de MQA (Ribeirão Preto), desta forma, deixando rastros no genoma mitocondrial. A diversidade nucleotídica de Pru-PR e de CAI-SC também se destacam das demais (0,0033 e 0,00361). Todas as amostras de Pru vieram da região de Cur-PR e a alta diversidade pode ser um reflexo da escolha das colônias.

A introgressão de novas colônias através do transporte em pequenas escalas pelos meliponicultores apenas deixa como testemunhas haplótipos mitocondriais (Chahbar *et al.*, 2013; Chapman *et al.*, 2018) e estes puderam ser notados. O haplótipo 11 é encontrado apenas em Cur-PR e HDO-SC, e o haplótipo 7 é encontrados apenas nos dois extremos da amostragem: Cur-PR e Arm-SC, duas localidades onde há histórico de importar e exportar colônias.

5.4. Homogeneização com o ambiente: Fluxo gênico mediado por machos

5.4.1. *Microsatélites*

Valores de Fis negativos e iguais à 0, fazendo crer que não há endogamia, foram obtidos em locais caracterizados como matriz ambiental florestal, como em Mor-PR, ou mista, como em Man-PR, CAI-SC e Maf-SC, não sendo possível descartar a influência da introgressão artificial de colônias pelos produtores.

A ausência do fluxo gênico com colônias naturais levou à diminuição radical dos índices de diversidade descritos em *M. subnitida* (Souza *et al.*, 2018) e *M. scutellaris* (Alves *et al.*, 2011) cultivadas fora da área natural de ocorrência. Enquanto isso,

meliponários em matriz florestal podem manter a diversidade nuclear através do fluxo gênico mediado pelos machos selvagens (Santiago *et al.*, 2016). Este fato não foi observado em QBa-PR, indicando que não há fluxo gênico com machos selvagens nesta localidade.

O meliponário localizado em CAI-SC não apresenta nenhum indício de endogamia através do microssatélites e tem diversidade nucleotídica maior que as demais localidades (0,00361). Este meliponário está inserido em área com extensos fragmentos de floresta, e foi coletado o único ninho considerado natural deste estudo. Segundo o proprietário, todas as colônias são de regiões próximas. A troca de colônias e a manutenção de ninhos naturais próximos podem ajudar a manter essa diversidade natural do local das populações manejadas.

Manter o fluxo gênico com colônias naturais, a fim de aumentar a diversidade genética, pode ajudar a manter a saúde das populações manejadas (Reed & Frankham, 2003), como o que provavelmente ocorre em CAI-SC. Não há dados para abelhas brasileiras, porém, mesmo quando populações naturais de *Apis mellifera* exibem menor diversidade, apresentaram maiores níveis de imunocompetência do que as colônias gerenciadas. Esta variação genética pode ter sido mantida por seleção natural em colônias não manejadas e pode ser usada em programas de cruzamento com o objetivo de aumentar a resistência contra doenças (López-Urbe *et al.*, 2017a; Pirk, Crewe, & Moritz, 2017). A falta de fluxo gênico com populações naturais apontado por este estudo na maior parte dos meliponários pode ser um alerta para o gerenciamento da diversidade buscando a saúde da população artificial.

5.5. Ausência de estruturação populacional

A multiplicação de colônias reforça e aumenta a variação local em populações manejadas, levando à diferenciação das subpopulações e consequentemente estruturação populacional (Quezada-Euan *et al.*, 2007; Bonatti *et al.*, 2014; Jaffé *et al.*, 2016; Santiago *et al.*, 2016). Entretanto, não encontramos estruturação populacional através de nenhum dos marcadores utilizados, indicando que a atividade da meliponicultura, através do transporte indiscriminado de colônias foi capaz de desfazer a diferenciação populacional esperada entre as populações naturais. A homogeneização genética foi

encontrada em ASF manejadas da Austrália (Chapman *et al.*, 2018), e está ocorrendo em *Apis* do norte da África (Chahbar *et al.*, 2013).

5.5.1. *Microsatélites*

Os valores de F_{st} e as análises de estruturação e clusterização, e o particionamento da variância genética mostram que a estruturação genética das populações foi desfeita pelo transporte de colônias.

O $F_{st} = 0,130$ em populações manejadas é baixo se comparado a populações naturais de *M. quadrifasciata* do estado de Minas Gerais (F_{st} de 0,59) (Nascimento *et al.*, 2010). Outras populações selvagens de ASF também apresentam valores maiores, como *M. rufiventris* com 0,26 e 0,77 (Tavares *et al.*, 2007), *M. mandacaiá* com 0,296 (Miranda *et al.*, 2012) e *T. angustula* com 0,375 (Francisco *et al.*, 2017).

O programa Structure mostrou duas linhagens genéticas que formam um gradiente geográfico, com indivíduos exibindo miscigenação e outros deslocados da população de origem. Gradientes genéticos contínuos geralmente apontam para IBD forte, responsável pela delimitação errônea de estrutura populacional (Frantz *et al.*, 2009; Meirmans, 2012; Priadka *et al.*, 2018). Como a distância é um fator importante na diferenciação genética de ASF, a ausência de sinal de IBD não era esperada. Espécies de abelhas manejadas exibem menores valores de IBD do que espécies selvagens, já que a dispersão não é apenas mediada pelos machos, e até então, estudos com *M. quadrifasciata* demonstram valores de IBD maiores do que espécies consideradas manejadas (Jaffé *et al.*, 2016). Desta forma, indivíduos reprodutivos parecem manter fluxo gênico irrestrito através de ambientes heterogêneos e antrópicos através dos produtores. Homogeneização genética devido à mistura das populações fonte, como o que estamos mostrando em *M. quadrifasciata* em meliponários, já foi descrita em *M. scutellaris* em meliponários do nordeste (Carvalho-Zilse *et al.*, 2009), *A. mellifera* na Europa (de La Rúa *et al.*, 2004), e em outros grupos, como lagartos (Kolbe *et al.*, 2008).

Na PCoA e na UPGMA pode-se notar que as amostras foram divididas entre as provenientes de Santa Catarina e as do Paraná. Esta separação pode ser uma consequência observada da aplicação das leis estaduais de Santa Catarina que restringem o transporte de colônias dentro das fronteiras estaduais. Porém, SRL-SC se

encontra em posição intermediária na PCoA e Xan-SC está agrupado com as amostras do Paraná na UPGMA. SRL-SC e Xan-SC se destacam por não se diferenciarem significativamente de nenhuma outra localidade através dos microssatélites. SRLArm-SC ainda se configura como o maior centro comercial amostrado, com rotas para toda a área de amostragem e possível centro homogeneizador da amostragem.

Nenhuma forma de estruturação testada por AMOVA foi capaz de particionar a variância da variabilidade. Desta forma, é provável que a diferenciação que poderia existir tenha sido perturbada por migração artificial das colônias, aumentando a variabilidade dentro de cada localidade e homogeneizando a diversidade encontrada entre as localidades.

Valores altos de variabilidade genética intrapopulacional geralmente estão associados com a falta de fluxo gênico entre as colônias de diferentes locais, que podem levar ao aumento de endogamia (Miranda *et al.*, 2012), tal qual neste trabalho. A homogeneização genética devido a atividades da meliponicultura também foi encontrada através de baixos valores de F_{st} em *M. scutellaris* (Carvalho-Zilse *et al.*, 2009), *T. angustula* (Santiago *et al.*, 2016) e *Tetragonula carbonária* (Chapman *et al.*, 2018).

A proporção entre as duas populações propostas pelo Structure pode ser moderadamente correlacionada com a altitude da localidade de amostragem ($r = 0,529$), evidenciada pelo mapa (Figura 5). Porém, Jaffé *et al.* (2016) não encontrou Isolamento Por Resistência à temperatura ou altitude em *M. quadrifasciata*, apesar de esta espécie ser a mais afetada pela temperatura do que outras ASF brasileiras investigadas. Estas informações em conjunto atestam que a geografia física, como altitude e clima característico, tenham papel na determinação do fluxo gênico e delimitação de estrutura populacional, quando não perturbada por transporte de colônias.

5.5.2. MtCOI

Com o gene COI, quando a análise de estruturação é realizada com os locais originais de coleta de cada haplótipo, a diferenciação genética encontrada foi maior, mas ainda assim não foi possível estabelecer populações estruturadas. Os grupos formados pela UPGMA e a distribuição na PCoA não refletem a proximidade

geográfica da amostragem. A ausência de Isolamento por Distância não pode ser descartado pelo teste de Mantel. Corroborando este resultado, o valor de F_{st} (0,244) é baixo quando comparado à populações de naturais de *Melipona subnitida* com 0,431 (Souza *et al.*, 2018), *T. angustula* com 0,772 (Francisco *et al.*, 2017) e *P. helleri* com 0,623 (Brito & Arias, 2010).

Através F_{st} , apenas Prudentópolis (Pru-PR) é distinta de todas as demais localidades, apesar de uma colônia com origem conhecida de Cur-PR. Esta diferenciação tem origem na frequência de haplótipos exclusivos de origem materna encontrados neste local (71% dos indivíduos), porém, não foram encontrados alelos excluídos através dos microssatélites. Esses haplótipos podem ser o resultado da seleção natural e de ausência de fluxo gênico mediado pelas fêmeas, devido ao comportamento filopátrico, e da ausência de transporte artificial de colônias desta localidade (Jensen *et al.*, 2005; de La Rúa *et al.*, 2009; Crispo *et al.*, 2011; Oleksa *et al.*, 2011).

Também na região de Prudentópolis, foram encontrados haplótipos raros e exclusivos para a espécie *Plebeia remota*, causando a maior diferenciação genética da espécie (Francisco & Arias, 2009). Os autores sugeriram que esta população teria divergido das demais populações no Plioceno tardio, e passado um *bottleneck* recente ou sido fundada por uma pequena população. A divergência encontrada em *M. quadrifasciata* não é tão expressiva quanto em *P. remota*, mas a convergência dos resultados pode ser um indício de que as populações de ambas as espécies exibem dinâmicas populacionais em resposta a uma história ambiental compartilhada (Moritz, 1995; Zink, 2002; Lapointe & Rissler, 2005).

O cenário encontrado através de mtCOI em *M. quadrifasciata* de meliponicultores foi a de 4 linhagens genéticas, porém com ausência de estrutura geográfica atual. Quando o histórico das colônias é revisitado, as quatro linhagens genéticas encontradas estão associadas a uma região de origem geográfica e provavelmente refletem a uma estrutura genética perturbada pelo transporte de colônias, especialmente as colônias de origem MQA, que são segregadas das demais na PCoA. Esta hipótese é corroborada pelos valores de F_{st} entre esses grupos, quando o local de coleta das amostras é ignorado. Desta forma, pode-se teorizar que existia uma estrutura populacional que foi perturbada pelo transporte das colônias.

A perturbação causada pelo transporte de colônias é evidenciada pela discrepância entre as redes de haplótipos de origem de coleta (Figura 7), que mostra haplótipos distantes coexistindo na mesma localidade, e da rede de haplótipos construída com a origem atribuída pela análise de estruturação (Figura 11), que indica regiões de origem do haplótipo coerentes com os dados históricos. Populações de abelhas selvagens ou com manejo menos intenso mostram redes de haplótipos mais coerentes com a localização geográfica de coleta (Brito & Arias, 2010; Brito *et al.*, 2013; Bonatti *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2016, 2017; Francisco *et al.*, 2017).

Os testes de estruturação e a árvore de haplótipos reforçam que as colônias manejadas do sul do Brasil possuem diversidade genética distinta das demais regiões brasileiras. Os haplótipos encontrados no Rio Grande do Sul são aqueles mais frequentes de Santa Catarina, resultado esse já esperado devido aos relatos de transporte dos produtores. Estes dados já haviam sido obtidos com a análise de poucas colônias de *M. quadrifasciata* do sul do Brasil (Batalha-Filho *et al.*, 2010). Uma exceção foi encontrada: as amostras MQA se agrupam com amostras provenientes de Minas Gerais e Bahia, regiões onde a subespécie é nativa.

Estes dados, juntamente com Batalha-Filho *et al.* (2010), mostram a região sul do Brasil como portadora de uma diversidade genética exclusiva, que pode representar o resultado da seleção local de traços adaptados ao ambiente (Jensen *et al.*, 2005; de La Rúa *et al.*, 2009; Crispo *et al.*, 2011; Oleksa *et al.*, 2011). Dentro dos estados de Santa Catarina e Paraná, há grande mistura de haplótipos, entretanto, há distinção das outras regiões do Brasil, com excessão das perturbações causadas pela introdução de colônias com origem MQA.

5.6. Atribuição de origem e migrantes

Os testes de atribuição de origem e de detecção de migrantes não foram concordantes em quais indivíduos estariam fora do seu local de origem, e ambos apontaram menos indivíduos exógenos do que indica o histórico das colônias obtido com os produtores. Resultados ambíguos de atribuição e exclusão de origem podem ser causados por quatro principais fatores, os dois primeiros já descritos como esperado pelo método: 1) falhar em rejeitar a hipótese que um indivíduo é um migrante pela falta

de amostragem em populações apropriadas para a comparação; 2) um indivíduo aparecer como originário de um lugar incorretamente devido similaridades na frequência alélica, e fluxo gênico histórico entre populações não amostradas (Rannala & Mountain, 1997); 3) número limitado de marcadores utilizados; 4) intrínseco deste estudo, fluxo gênico intenso relatado pelos produtores, que homogeneíza as frequências alélicas.

Por exemplo, todos os indivíduos amostrados em SAP-PR e Cam-PR são originários de Cur-PR, e a maioria dos indivíduos de RDSAur-SC são provenientes de SRL-SC Aur-SC. Desta forma, não há como o algoritmo estabelecer com segurança qual das duas localidades é a fonte. Apesar destas limitações, a abordagem forense não é descartada na atribuição de origem das colônias e pode ser um importante aliado no controle de migração de populações controladas.

A PCoA com os indivíduos mostra dois grupos coincidentes com a estruturação proposta por Structure. Os indivíduos de ‘alta altitude’ 89.Xan, 92.CMa, 93.CMa, 94.CMa e 105.PBr foram agrupados com o de ‘baixa altitude’, enquanto que os de ‘baixa altitude’ 12.RNeSBS, 17.Arm e 102.Mor foram agrupados com os de ‘alta altitude’, porém, nenhuma delas tem histórico de migração. O teste de atribuição de origem e migrantes indicou que: 89.Xan, 92.CMa e 105PBr são respectivamente, do norte paranaense, oeste paranaense, e região metropolitana de Curitiba, ambas regiões altas, e desta forma não concordando com a PCoA; 93.CMa e 94.CMa provém do sul catarinense, região de exportação de colônias e corroborando com a PCoA; 12.RNeSBS, 17.Arm e 102.Mor provém, respectivamente, da região metropolitana de Curitiba, sudeste e sudoeste do Paraná, ambas regiões ‘altas’ e de acordo com o previsto pela PCoA.

Duas hipóteses não mutualmente exclusivas podem ser consideradas: 1) o histórico de transporte foi perdido pelos produtores ao longo dos anos; 2) estes indivíduos são oriundos de cruzamentos entre rainhas locais e machos de colônias introduzidas.

Algumas colônias que foram identificadas como híbridas de MQQ com MQA pelos produtores não apresentavam indivíduos com listas abdominais interrompidas (19.Arm, 20.Arm, 27.Maf), e foram agrupadas com os indivíduos identificadas como os de “baixa altitude” pelos microsatélites. Com o gene COI, apenas o haplótipo do

indivíduo 19.Arm foi identificado como MQA. É esperado que, havendo a morte da rainha MQA original, sua filha tenha cruzado com um macho MQQ, explicando assim o haplótipo MQA e a mistura nuclear obtida com os microssatélites. Porém, houve substituição do haplótipo MQA por um MQQ em pelo menos duas colônias.

Uma possível explicação é a invasão de princesas MQQ recém-fertilizadas (provindas das outras colônias do meliponário) em ninhos órfãos de MQA, que morreram e ainda não haviam sido substituídas por uma princesa-filha. Este é um fenômeno já descrito e considerado comum (ocorre em 25% das substituições das rainhas) para *M. scutellaris* (Wenseleers *et al.*, 2011) e é possível pelo número de rainhas virgens que são produzidas e desaparecem das colônias de *M. quadrifasciata* (da Silva *et al.*, 1972). Os produtores não relataram a prática de oferecer novos discos de larvas em colônias debilitadas, o que poderia substituir o genoma mitocondrial da colônia por outro de origem desconhecida.

6. CONCLUSÕES

Observamos que 1) a diversidade genética pode ser considerada alta, porém mal distribuída, com número efetivo populacional e número efetivos de alelos baixos. Não é possível encontrar estruturação populacional na área estudada pelo gene mtCOI e marcadores de microssatélite. Porém, uma clina genética foi encontrada com os marcadores de microssatélites, e o mtCOI mostra que rainhas foram deslocadas de suas populações originais e há introdução de haplótipos MQA no sul do Brasil. Apesar da mistura encontrada dentro da região sul do Brasil, as amostras MQQ deste estudo formam apenas um grupo quando comparadas com amostras do restante do país, mostrando diversidade genética distinta; 2) há alelos de origens distantes em meliponários que realizam a compra de colônias, causando aumento da diversidade, mas descaracterizando a diversidade local e dificultando a identificação correta de migrantes; 3) há sinais claros de endogamia em meliponários que se dedicam à reprodução de colônias para o comércio e em meliponários dedicados ao *hobby*. A proximidade ao ambiente natural, onde há estoque de machos, pode diminuir os efeitos do fluxo gênico restrito.

A diferenciação populacional e o IBD encontrados aqui não são fortes o suficiente para classificar populações ou MUs (Waples & Gaggiotti, 2006; Palsbøll *et al.*, 2007). Apesar dos desafios e da delimitação discreta das bordas das populações para a criação de planos de manejo, essas ferramentas podem ser usadas no futuro para criação de MU delimitadas para manter os padrões de fluxo gênico entre habitats antropicamente perturbados e para prevenir a perda de conectividade genética e identidade genética que podem não ser restauradas facilmente (Priadka *et al.*, 2018).

Na ausência de dados populacionais, é preferível usar unidades de gerenciamento menores do que as unidades evolutivas, e desta maneira, as legislações estaduais que se encarregam da meliponicultura e restringem o transporte interestadual são um passo importante e de abrangência geográfica adequada para esta região do país. Uma sugestão é a utilização de delimitações políticas como macrorregiões, que se mostram mais adequadas para a determinação de origem de colônias e de migrantes. Macrorregiões refletem cenários sociopolíticos e geográficos, já utilizadas em planos ambientais como os de comitês de bacia hidrográfica.

O fortalecimento da meliponicultura, juntamente a melhores orientações de manejo e manutenção da diversidade podem transformar a atividade em aliada do desenvolvimento sustentável, gerando renda à pequenos produtores familiares, enquanto atua na conservação das abelhas, assim como a conservação da qualidade dos ambientes naturais dos quais as abelhas são dependentes e oferecem os serviços de polinização.

7. REFERÊNCIAS

- Aidar DS. 1996.** *A Mandaçaia: Biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de Melipona quadrifasciata Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae).* Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 104 p.
- Aidar DS & Campos LAO. 1998.** Manejo e manipulação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Apidae: Meliponinae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* **27**: 157–159.
- Alacs EA, Georges A, FitzSimmons NN, et al. 2010.** DNA detective: A review of molecular approaches to wildlife forensics. *Forensic Science, Medicine, and Pathology* **6**: 180–194.
- Alattal Y, Al-Ghamdi A & Alsharhi M. 2014.** Population structure of the Yemeni honey bee (*Apis mellifera jemenitica*) entails an urgent conservation strategy in Saudi Arabia. *Journal of Entomology* **11**: 164–169.
- Almeida-Muradian LB, Stramm KM, Horita A, et al. 2013.** Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. *International Journal of Food Science and Technology* **48**: 1698–1706.
- Alves DA, Imperatriz-Fonseca VL, Franco TM, et al. 2011.** Successful maintenance of a stingless bee population despite a severe genetic bottleneck. *Conservation Genetics* **12**: 647–658.
- Alvez RMO, Viana JL, Sousa HAC, et al. 2018.** Physico-chemical parameters of honey from *Melipona mondury* Smith, 1863 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Journal of Agricultural Science* **10**: 196–205.
- Amazonas. 2017.** Resolução CEMAAM nº22 de 02 de mar. de 2017. Estabelece normas para a criação, manejo, transporte e comercialização de abelhas sem ferrão (meliponídeos) e seus produtos e subprodutos no Estado do Amazonas e dá outras providências. Diário Oficial do Estado, Manaus, AM, 20 de abril de 2017.
- Araujo ED, Oliveira RG, Calazans HCM, et al. 2016.** Risk of local extinction and genetic diversity of *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) in a possible northeastern limit of its distribution in Brazil. *Sociobiology* **63**: 804–812.
- Associação Papa-Mel de Apicultores de Rolante. 2006.** Projeto Manduri - Sustentabilidade sócio-ambiental e conservação da Mata Atlântica - Ficha Projeto nº 237.
- Athayde S, Stepp JR & Ballester WC. 2016.** Engaging indigenous and academic knowledge on bees in the Amazon: Implications for environmental management and transdisciplinary research. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* **12**: 1–19.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, et al. 1987.** Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 489–522.
- Avise JC. 2009.** Phylogeography: Retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* **36**: 3–15.
- Bahia. 2014.** Portaria ADAB Nº 207 de 21 de nov. de 2014. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel de Abelha social sem ferrão, gênero *Melipona*, conforme anexo a esta Portaria, com aplicação em todos os estabelecimentos de produtos das abelhas e derivados registrados sob a égide do Serviço de Inspeção Estadual. Diário Oficial do Estado, Salvador, BA, 26 de novembro de 2014.

- Bahia. 2018.** Lei Nº. 13.905 de 29 de jan. de 2018. Dispõe sobre a criação, o comércio, a conservação e o transporte de Abelhas Nativas sem Ferrão (meliponíneos), no Estado da Bahia. Diário Oficial do Estado, Salvador, BA, 31 de janeiro de 2018.
- Barbiéri CJ. 2018.** Caracterização da meliponicultura e do perfil do meliponicultor no estado de São Paulo: ameaças e estratégias de conservação de abelhas sem ferrão. Dissertação (Mestrado em Ciências). São Paulo: Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo. 102 p.
- Batalha-Filho H, Waldschmidt AM, Campos LAO, et al. 2010.** Phylogeography and historical demography of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie* **41**: 534–547.
- Bergamo LW, Fresia P, Lyra ML, et al. 2018.** High genetic diversity and no population structure of the new world screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) on a microgeographic scale: Implications for management units. *Journal of Economic Entomology* **111**: 1–7.
- Biluca FC, Braghini F, Gonzaga LV, et al. 2016.** Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (Meliponinae). *Journal of Food Composition and Analysis* **50**: 61–69.
- Bischof R, Brøseth H & Gimenez O. 2016.** Wildlife in a politically divided world: Insularism inflates estimates of brown bear abundance. *Conservation Letters* **9**: 122–130.
- Bispo dos Santos SA, Roselino AC, Hrnecir M, et al. 2009.** Pollination of tomatoes by the stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Genetics and molecular research* **8**: 751–757.
- Boff S, Soro A, Paxton RJ, et al. 2014.** Island isolation reduces genetic diversity and connectivity but does not significantly elevate diploid male production in a neotropical orchid bee. *Conservation Genetics* **15**: 1123–1135.
- Bonatti V, Simões ZLP, Franco FF, et al. 2014.** Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. *Naturwissenschaften* **101**: 17–24.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, et al. 1980.** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* **32**: 314–331.
- Bourgeois L & Beaman L. 2017.** Tracking the genetic stability of a honey bee (Hymenoptera: Apidae) breeding program with genetic markers. *Journal of Economic Entomology* **110**: 1419–1423.
- Brasil. 1952.** Decreto da Presidência da República Nº 30.691 de 29 de mar. de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União, Rio de Janeiro, RJ, 7 de julho de 1952. p. 10785.
- Brasil. 1988.** Constituição (1988). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado Federal: Centro Gráfico, 1988. 292 p.
- Brasil. 1997a.** Portaria IBAMA Nº 117 de 15 de out. de 1997. Dispões sobre a comercialização de animais vivos, abatidos, partes e produtos da fauna silvestre. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção I, 16 de outubro 1997. p. 23.489/490.
- Brasil. 1997b.** Portaria do Ministério do Meio Ambiente Nº188-N de 15 de out. de 1997. O Presidente do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, usando das atribuições que lhe são conferidas pela Lei nº 7.735, de 22 de fevereiro de 1989, tendo em vista o disposto no art. 6º, letra "b", da Lei nº 5.197, de 03 de janeiro de 1967; Lei nº 6938/81 e o que consta no Processo IBAMA nº 02001.002877/96-94. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 de novembro de 1997.

- Brasil. 2000.** *Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa N° 11, de 20 de out. de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel.* Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 de outubro de 2000.
- Brasil. 2004.** *Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA N°346 de 16 de ago. de 2004. Disciplina a utilização das abelhas silvestres nativas, bem como a implantação de meliponários.* Diário Oficial da União, Brasília, DF, de 17 de agosto de 2004. Seção 1.
- Brasil. 2008.** *Instrução Normativa do Ministério do Meio Ambiente N° 169 de 20 fev. de 2008. Aprova a Estrutura Regimental do Ibama.* Diário Oficial da União, Brasília, DF, de 21 de fevereiro de 2008. n° 35, Seção 1, pág. 57.
- Brasil. 2011.** *Lei Complementar N° 140, de 8 de dez. de 2011. Fixa normas, nos termos dos incisos III, VI e VII do caput e do parágrafo único do art. 23 da Constituição Federal, para a cooperação entre a União, os Estados, o Distrito Federal e os Municípios nas ações administrativas decorrentes do exercício da competência comum relativas à proteção das paisagens naturais notáveis, à proteção do meio ambiente, ao combate à poluição em qualquer de suas formas e à preservação das florestas, da fauna e da flora; e altera a Lei no 6.938, de 31 de agosto de 1981.* Diário Oficial da União, Brasília, DF, 9 de dezembro de 2011.
- Brasil. 2014.** *Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçada de Extinção. Portaria n° 444, de 17 de dezembro de 2014.* Ministério do Meio Ambiente. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 de dezembro de 2014.
- Brasil. 2015.** *Instrução Normativa do IBAMA N° 7 de 30 de abr de 2015. Institui e normatiza as categorias de uso e manejo da fauna silvestre em cativeiro, e define, no âmbito do Ibama, os procedimentos autorizativos para as categorias estabelecidas.* Diário Oficial da União, Brasília, DF, 06 de maio 2015. Retificada em 11 de maio de 2015.
- Brasil. 2017.** *Decreto da Presidência da República N° 9.013, de 29 de mar. de 2017. Regulamenta a Lei n° 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei n° 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal.* Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 de março de 2017.
- Brito RM, Francisco F de O, Françoso E, et al. 2013.** Very low mitochondrial variability in a stingless bee endemic to cerrado. *Genetics and Molecular Biology* **36**: 124–128.
- Brito RM & Arias MC. 2010.** Genetic structure of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) from Neotropical Atlantic rainforest. *Insectes Sociaux* **57**: 413–419.
- Bruening H. 2001.** *Abelha Jandaíra.* 2° ed. Mossoró: Fundação Guimarães Duque Fundação Vingt-Un Rosado. 148 p.
- Bruford MW, Bradley DG & Luikart G. 2003.** DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature reviews. Genetics* **4**: 900–910.
- Buchmann SL. 1974.** Buzz pollination of *Cassia quiedondilla* (Leguminosae) by bees of the genera *Centris* and *Melipona*. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences* **73**: 171–173.
- Buchmann SL. 1983.** Buzz pollination in angiosperms. In: *Handbook of Experimental Pollination Biology.*, 73–113.
- Byatt MA, Chapman NC, Latty T, et al. 2016.** The genetic consequences of the anthropogenic movement of social bees. *Insectes Sociaux* **63**: 15–24.
- Camargo RCR, Oliveira KL & Berto MI. 2017.** Stingless bee honey: technical regulation proposal. *Brazilian Journal of Food Technology* **20**: 1–6.
- Camargo JMF & Pedro SRM. 2013.** Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. In: *Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J.*

S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs).

Carvalho GA. 2001. The number of sex alleles (CSD) in a bee population and its practical importance (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Hymenoptera Research* **10**: 10–15.

Carvalho RMA, Martins CF, Nóbrega Alves RR, et al. 2018. Do emotions influence the motivations and preferences of keepers of stingless bees? *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* **14**: 1–11.

Carvalho-Zilse GA, Costa-Pinto MF, Nunes-Silva CG, et al. 2009. Does beekeeping reduce genetic variability in *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini)? *Genetics and Molecular Research* **8**: 758–765.

Carvalho-Zilse GA & Kerr WE. 2006. Utilização de marcadores microsatélites para estudos populacionais em *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). *Magistra* **18**: 213–220.

Chahbar N, Muñoz I, Dall’Olio R, et al. 2013. Population structure of North African honey bees is influenced by both biological and anthropogenic factors. *Journal of Insect Conservation* **17**: 385–392.

Chanthayod S, Zhang W & Chen J. 2017. People’s perceptions of the benefits of natural beekeeping and its positive outcomes for forest conservation: A case study in Northern Lao PDR. *Tropical Conservation Science* **10**: 1–11.

Chapman NC, Byatt M, Cocenza RDS, et al. 2018. Anthropogenic hive movements are changing the genetic structure of a stingless bee (*Tetragonula carbonaria*) population along the east coast of Australia. *Conservation Genetics* **19**: 619–627.

Chapman NC, Lim J & Oldroyd BP. 2008. Population genetics of commercial and feral honey bees in western Australia. *Journal of economic entomology* **101**: 272–277.

Christie MR, Marine ML, French RA, et al. 2012. Genetic adaptation to captivity can occur in a single generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 238–42.

Clement M, Posada D & Crandall KA. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**: 1657–1659.

Contrera FAL, Menezes C & Venturieri GC. 2011. New horizons on stingless beekeeping (Apidae, Meliponini). *Revista Brasileira de Zootecnia* **40**: 48–51.

Corander J, Marttinen P, Sirén J, et al. 2008. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC bioinformatics* **9**: 539.

Cornuet JM, Piry S, Luikart G, et al. 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* **153**: 1989–2000.

Cortopassi-Laurino M, Imperatriz-fonseca VL, Roubik DW, et al. 2006. Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie* **37**: 275–292.

Costa Pinto MFF. 2007. Caracterização de locos microsatélites em duas de abelhas espécies da região amazônica: *Melipona compressipes* e *Melipona seminigra* (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Manaus: INPA-UFAM. 69 p.

Crispo E, Moore JS, Lee-Yaw JA, et al. 2011. Broken barriers: Human-induced changes to gene flow and introgression in animals: An examination of the ways in which humans increase genetic exchange among populations and species and the consequences for biodiversity. *BioEssays* **33**: 508–518.

Crow JF & Kimura M. 1970. *An Introduction to Population Genetics Theory*. New York, Evanston and London: Harper & Row. 591 p.

Cushman SA, Wasserman TN, Landguth EL, et al. 2013. Re-Evaluating causal modeling with Mantel tests in landscape genetics. *Diversity* **5**: 51–72.

- Dakin EE & Avise JC. 2004.** Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* **93**: 504–509.
- Delaney DA, Meixner MD, Schiff NM, et al. 2009.** Genetic characterization of commercial honey bee (Hymenoptera: Apidae) populations in the United States by using mitochondrial and microsatellite markers. *Ann. Entomol. Soc. Am* **102**: 666–673.
- De Keyzer EL, De Corte Z, Van Steenberge M, et al. 2019.** First genomic study on Lake Tanganyika sprat *Stolothrissa tanganyicae*: a lack of population structure calls for integrated management of this important fisheries target species. *BMC Evolutionary Biology* **19**: 6.
- Díaz S, Urbano SS, Caesar L, et al., 2017.** Report on the microbiota of *Melipona quadrifasciata* affected by a recurrent disease. *Journal of Invertebrate Pathology* **143**: 35–39.
- Dreier S, Redhead JW, Warren IA, et al. 2014.** Fine-scale spatial genetic structure of common and declining bumble bees across an agricultural landscape. *Molecular Ecology* **23**: 3384–3395.
- Duarte AWF, Vasconcelos MRS, Oda-Souza M, et al. 2018.** Honey and bee pollen produced by Meliponini (Apidae) in Alagoas, Brazil: multivariate analysis of physicochemical and antioxidant profiles. *Food Science and Technology* **2061**: 1–11.
- Duarte OMP, Gaiotto FA & Costa MA. 2014.** Genetic differentiation in the stingless bee *Scaptotrigona xanthotricha* Moure, 1950 (Apidae, Meliponini): a species with wide geographic distribution in the Atlantic rainforest. *Journal of Heredity* **105**: 477–484.
- Earl DA & VonHoldt BM. 2012.** Structure Harvester: A website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**: 359–361.
- Earnhardt JM. 2010.** The Role of Captive Population in Reintroduction Programmes. In: *Wild Mammals in Captivity: Principles and Techniques for Zoo Management. 2nd Edition*. Chicago: University of Chicago Press. p (2010): 268–280.
- Eisen JA. 1999.** Mechanistic basis for microsatellite instability. In: *Microsatellites : Evolution and Applications*. Oxford University Press, 34–48.
- Excoffier L & Lischer HEL. 2010.** Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**: 564–567.
- Falconer DS. 1987.** *Introdução à genética quantitativa*. 1º ed. Viçosa: UFV. 279 p.
- Féral JP. 2002.** How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **268**: 121–145.
- Fisher RA. 1930.** *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press: Oxford.
- Fox G, Darolti J, Hibbitt JD, et al. 2018.** Conservation and maintain heterozygosity in non-model species. *Journal of European Association of Zoos and Aquaria* **6**: 50–56.
- Francini IB, Sforça DA, Sousa ACB, et al. 2009.** Microsatellite loci for an endemic stingless bee *Melipona seminigra merrillae* (Apidae, Meliponini) from Amazon. *Conservation Genetics Resources* **1**: 487–490.
- Francini IB, Sousa ACB, Sforça DA, et al. 2010.** Isolation and characterization of microsatellite loci in the stingless bee *Melipona interrupta manausensis* (Apidae: Meliponini). *Conservation Genetics Resources* **2**: 27–30.
- Francini IB, Nunes-Silva CG & Carvalho-Zilse GA. 2012.** Diploid male production of two amazonian *Melipona* bees (Hymenoptera: Apidae). *Psyche* **2012**.
- Francisco FO, Santiago LR, Brito RM, et al. 2014.** Hybridization and asymmetric introgression between *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi*. *Apidologie* **45**: 1–9.

- Francisco FO, Santiago LR, Mizusawa YM, et al. 2017.** Population structuring of the ubiquitous stingless bee *Tetragonisca angustula* in southern Brazil as revealed by microsatellite and mitochondrial markers. *Insect Science* **24**: 877–890.
- Francisco FO & Arias MC. 2009.** Inferences of evolutionary and ecological events that influenced the population structure of *Plebeia remota*, a stingless bee from Brazil. *Apidologie* **41**: 216–224.
- Francisco FO, Santiago LR & Arias MC. 2013.** Molecular genetic diversity in populations of the stingless bee *Plebeia remota*: A case study. *Genetics and Molecular Biology* **36**: 118–123.
- Frankham R, Bradshaw CJA & Brook BW. 2014.** Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation* **170**: 56–63.
- Franklin IR & Frankham R. 1998.** How large must populations be to retain evolutionary potential? *Animal Conservation* **1**: 69–73.
- Frantz AC, Cellina S, Krier A, et al. 2009.** Using spatial Bayesian methods to determine the genetic structure of a continuously distributed population: Clusters or isolation by distance? *Journal of Applied Ecology* **46**: 493–505.
- Gehrck R. 2010.** Meliponicultura: O caso dos criadores de abelhas nativas sem ferrão no Vale do Rio Rolante (RS). Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Rural). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 214 p.
- Giannini TC, Boff S, Cordeiro GD, et al. 2015.** Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie* **46**: 209–223.
- Goiás. 2017.** Resolução N°007/2017-CESMARH de 05 de dez. de 2017. Institui a normatização e cadastramento obrigatório para todos os criadores de abelhas silvestres nativas, no âmbito do Estado de Goiás e define os procedimentos de uso e manejo, autorizações e demais providências que couber. Diário Oficial do Estado, Goiânia, GO, de 2 de janeiro de 2018.
- Goldstein DB & Schlötterer C. 1999.** *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford: Oxford University Press. 368 p.
- Gröning J & Hochkirch A. 2008.** Reproductive interference between animal species. *The Quarterly review of biology* **83**: 257–282.
- Harpur BA, Minaei S, Kent CF, et al. 2012.** Management increases genetic diversity of honey bees via admixture. *Molecular Ecology* **21**: 4414–4421.
- Hasselmann M & Beye M. 2004.** Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 4888–93.
- Hearne CM, Ghosh S & Todd JA. 1992.** Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genetics* **8**: 288–294.
- Hoelzel AR. 2009.** Evolution of population genetic structure in marine mammal species. In: *Population Genetics for Animal Conservation*. Cambridge University Press, 294–318.
- Holsinger KE & Weir BS. 2009.** Genetics in geographically structured populations: Defining, estimating and interpreting FST. *Nature Reviews Genetics* **10**: 639–650.
- Imperatriz-Fonseca VL, Saraiva AM & Gonçalves L. 2007.** A iniciativa brasileira de polinizadores e os avanços para a compreensão do papel dos polinizadores como produtores de serviços ambientais. *Bioscience Journal* **23**: 100–106.
- Jaeger P, Moura MCO, Van Den Berg E, et al. 2007.** Caracterização genética de populações naturais de *Xylopia emarginata* Mart. (Annonaceae). *Scientia Forestalis*: 91–99.
- Jaffé R, Dietemann V, Allsopp MH, et al. 2010.** Estimating the density of honeybee

- colonies across their natural range to fill the gap in pollinator decline censuses. *Conservation Biology* **24**: 583–593.
- Jaffé R, Pioker-Hara FC, Dos Santos CF, et al. 2014.** Monogamy in large bee societies: A stingless paradox. *Naturwissenschaften* **101**: 261–264.
- Jaffé R, Pope N, Carvalho AT, et al. 2015.** Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize stingless beekeeping. *PLoS ONE* **10**: 1–21.
- Jaffé R, Pope N, Acosta AL, et al. 2016.** Beekeeping practices and geographic distance, not land use, drive gene flow across tropical bees. *Molecular ecology* **25**: 5345–5358.
- Jensen AB, Palmer KA, Boomsma JJ, et al. 2005.** Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. *Molecular Ecology* **14**: 93–106.
- Jones OR & Wang J. 2010.** COLONY: A program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* **10**: 551–555.
- Kadwell M, Fernandez M, Stanley HF, et al. 2001.** Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **268**: 2575–84.
- Kalinowski ST. 2004.** Counting alleles with rarefactions: private alleles and hierarchical sampling design. *Conservation Genetics* **5**: 539–543.
- Kalinowski ST. 2005.** HP-RARE 1.0: A computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes* **5**: 187–189.
- Kalinowski ST, Taper ML & Marshall TC. 2007.** Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* **16**: 1099–1106.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. 2012.** Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**: 1647–1649.
- Kerr WE. 1976.** Population genetic studies in bees. 2. Sex-Limited genes. *Evolution* **30**: 94–99.
- Kerr WE, Carvalho-Zilse GA & Nascimento VA. 1996.** *Abelha Uruçu: Biologia, Manejo E Conservação*. Belo Horizonte: Acangaú. 143 p.
- Koeniger N & Koeniger G. 2000.** Reproductive isolation among species of the genus *Apis*. *Apidologie* **31**: 313–339.
- Kolbe JJ, Larson A, Losos JB, et al. 2008.** Admixture determines genetic diversity and population differentiation in the biological invasion of a lizard species. *Biology Letters* **4**: 434–437.
- Koser JR, Francisco FO & Moretto G. 2014.** Genetic variability of stingless bees *Melipona mondury* Smith and *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae) from a meliponary. *Sociobiology* **61**: 313–317.
- Kumar S & Stecher G. 2015.** MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**: 1870–1874.
- Lapointe FJ & Rissler LJ. 2005.** Congruence, consensus, and the comparative phylogeography of codistributed species in California. *The American naturalist* **166**: 290–299.
- de La Rúa P, Hernández-García R, Pedersen B V, et al. 2004.** Molecular diversity of honeybee *Apis mellifera iberica* L. (Hymenoptera: Apidae) from western Andalusia. *Archivos de zootecnia* **53**: 195–203.
- de La Rúa P, Jaffé R, Dall'Olio R, et al. 2009.** Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie* **40**: 263–284.
- de La Rúa P, Jaffé R, Muñoz I, et al. 2013.** Conserving genetic diversity in the

- honeybee: Comments on Harpur et al. (2012). *Molecular Ecology* **22**: 3208–3210.
- Lacy RC. 2013.** Achieving true sustainability of zoo populations. *Zoo Biology* **32**: 19–26.
- Laikre L. 2010.** Genetic diversity is overlooked in international conservation policy implementation. *Conservation Genetics* **11**: 349–354.
- Levinson G & Gutman GA. 1987.** Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular biology and evolution* **4**: 203–221.
- Lewis PO & Zaykin D. 2001.** Genetic Data Analysis: computer program for the analysis of allelic data, Version 1.0. *University of Connecticut, Storrs*. <http://phylogeny.uconn.edu/software/>.
- Linnell JDC, Andersen R, Kvam T, et al. 2001.** Home range size and choice of management strategy for lynx in Scandinavia. *Environmental Management* **27**: 869–879.
- Linnell JDC. 2005.** *Spatial aspects of managing natural resources and conserving biodiversity. Integrating the global and the local*. Trondheim: Norsk Institutt for Naturforskning Report 62. 38 p.
- Loftus RT, MacHugh DE, Bradley DG, et al. 1994.** Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 2757–2761.
- Loman J, Madsen T, Håkansson T, et al. 1988.** Increased fitness from multiple matings, and genetic heterogeneity: A model of a possible mechanism. *Oikos* **52**: 69–72.
- Lopes DM, Silva FO, Fernandes-Salomão TM, et al. 2009.** Microsatellite loci for the stingless bee *Melipona rufiventris* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology Resources* **9**: 923–925.
- Lopes DM, Silva FO, Fernandes-Salomão TM, et al. 2010.** A scientific note on the characterization of microsatellite loci for *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* **41**: 138–140.
- López-Uribe MM, Appler RH, Youngsteadt E, et al. 2017a.** Higher immunocompetence is associated with higher genetic diversity in feral honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Conservation Genetics* **18**: 659–666.
- López-Uribe MM, Soro A & Jha S. 2017b.** Conservation genetics of bees: advances in the application of molecular tools to guide bee pollinator conservation. *Conservation Genetics* **18**: 501–506.
- Luikart G & Cornuet JM. 1998.** Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* **12**: 228–237.
- Lynch M & Lande R. 1998.** The critical effective size for a genetically secure population. *Animal Conservation* **1**: S136794309822110X.
- Mace GM & Lande R. 1991.** Assessing extinction threats: Toward a reevaluation of IUCN threatened species categories. *Conservation Biology* **5**: 148–157.
- MacHugh DE, Shriver MD, Loftus RT, et al. 1997.** Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* **146**: 1071–1086.
- Maderson S & Wynne-Jones S. 2016.** Beekeepers' knowledges and participation in pollinator conservation policy. *Journal of Rural Studies* **45**: 88–98.
- Manel S, Berthier P, Luikart G, et al. 2002.** Society for conservation biology detecting wildlife poaching: Identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multilocus genotypes. *Conservation Biology* **16**: 650–659.
- Marques AAB, Fontana CS, Bencke GA, et al. 2003.** *Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul*. Decreto n° 41.672, de 11 de junho de

2002. Porto Alegre: FZB/MCT–PUCRS/PANGAEA. 52 p.
- Mather WB. 1994.** *Princípios de Genética Quantitativa*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética.
- Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, et al. 2002.** A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 6080–6084.
- Mattila HR & Seeley TD. 2007.** Genetic diversity in honey bee colonies enhances productivity and fitness. *Science* **317**: 362–364.
- Maudet C, Luikart G, Taberlet P, et al. 2002.** Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *Journal of Animal Science* **80**: 942–950.
- May-Itzá WJ, Quezada-Euán JJG, Medina Medina LA, et al. 2010.** Morphometric and genetic differentiation in isolated populations of the endangered Mesoamerican stingless bee *Melipona yucatanica* (Hymenoptera: Apoidea) suggest the existence of a two species complex. *Conservation Genetics* **11**: 2079–2084.
- McGregor SE. 1976.** Insect pollination of cultivated crop plants. *Usda*: 849.
- Meirmans PG. 2012.** The trouble with isolation by distance. *Molecular Ecology* **21**: 2839–2846.
- Meixner MD, Costa C, Kryger P, et al. 2010.** Conserving diversity and vitality for honey bee breeding. *Journal of Apicultural Research* **49**: 85–92.
- Meixner MD, Kryger P & Costa C. 2015.** Effects of genotype, environment, and their interactions on honey bee health in Europe. *Current Opinion in Insect Science* **10**: 177–184.
- Mercês MD, Peralta ED, Trovatti AP, et al. 2013.** Antimicrobial activity of honey from five species of Brazilian stingless bees. *Ciência Rural, Santa Maria* **43**: 672–675.
- Minas Gerais. 2014.** Projeto de Lei de 28 de Fevereiro de 2014. *Dispõe sobre a criação, o comércio e o transporte de abelhas sem ferrão (meliponíneas) no Estado de Minas Gerais*.
- Miranda EA, Batalha-Filho H, Oliveira PS, et al. 2012.** Genetic diversity of *Melipona mandacaia* SMITH 1863 (Hymenoptera, Apidae), an endemic bee species from Brazilian Caatinga, using ISSR. *Psyche: A Journal of Entomology* **2012**: 1–6.
- Miranda EA, Batalha-Filho H, Congrains C, et al. 2016.** Phylogeography of *Partamona rustica* (Hymenoptera, Apidae), an endemic stingless bee from the neotropical dry forest diagonal. *PLoS ONE* **11**: 1–19.
- Miranda EA, Ferreira KM, Carvalho AT, et al. 2017.** Pleistocene climate changes shaped the population structure of *Partamona seridoensis* (Apidae, Meliponini), an endemic stingless bee from the Neotropical dry forest. *PLoS ONE* **12**: 1–13.
- Moretto G & Arias MC. 2005.** Systematics, morphology and physiology. Detection of mitochondrial DNA restriction site differences between the subspecies of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Neotropical Entomology* **34**: 381–385.
- Moritz C. 1995.** Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **349**: 113–118.
- Muñoz I, Dall’olio R, Lodesani M, et al. 2014a.** Estimating introgression in *Apis mellifera siciliana* populations: Are the conservation islands really effective? *Insect Conservation and Diversity* **7**: 563–571.
- Muñoz I, Pinto MA & De la Rúa P. 2014b.** Effects of queen importation on the genetic diversity of Macaronesian island honey bee populations (*Apis mellifera* Linnaeus 1758). *Journal of Apicultural Research* **53**: 296–302.
- Nascimento MA, Batalha-Filho H, Waldschmidt AM, et al. 2010.** Variation and

genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern. *Genetics and Molecular Biology* **33**: 394–397.

Nazareno AG & dos Reis MS. 2014. Where did they come from? Genetic diversity and forensic investigation of the threatened palm species *Butia eriospatha*. *Conservation Genetics* **15**: 441–452.

Negrín Muñoz E. 2016. Mujeres mayas, abejas mayas. *GeoGraphos. Revista Digital para Estudiantes de Geografía y Ciencias Sociales* **7**: 1–12.

Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia university press.

Nogueira J, Ramos JC, Benevenuto J, et al. 2014. Conservation study of an endangered stingless bee (*Melipona capixaba* - Hymenoptera: Apidae) with restricted distribution in Brazil. *Journal of Insect Conservation* **18**: 317–326.

Nogueira-Neto P, Imperatriz-Fonseca VL, Kleinert-Giovannini A, et al. 1986. *Biologia e manejo das abelhas sem ferrão*. São Paulo: Tecnapis. 54 p.

Nomura T. 2008. Estimation of effective number of breeders from molecular coancestry of single cohort sample. *Evolutionary Applications* **1**: 462–474.

Nunes-Silva N, Hrnir M & Imperatriz-Fonseca VL. 2010. A polinização por vibração. *Oecologia Australis* **14**: 140–151.

Ogden R, Dawnay N & McEwing R. 2009. Wildlife DNA forensics - Bridging the gap between conservation genetics and law enforcement. *Endangered Species Research* **9**: 179–195.

Oldroyd BP. 2007. What's killing American honey bees? *PLoS Biology* **5**: 1195–1199.

Oldroyd BP & Fewell JH. 2007. Genetic diversity promotes homeostasis in insect colonies. *Trends in Ecology and Evolution* **22**: 408–413.

Oleksa A, Chybicki I, Tofilski A, et al. 2011. Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland. *Journal of Apicultural Research* **50**: 116–129.

Oxley PR & Oldroyd BP. 2009. Mitochondrial sequencing reveals five separate origins of 'black' *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in eastern Australian commercial colonies. *Journal of economic entomology* **102**: 480–4.

Paetkau D, Slade R, Burden M, et al. 2004. Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* **13**: 55–65.

Page RE. 1980. The evolution of multiple mating behavior by honey bee queens (*Apis mellifera* L.). *Genetics* **96**: 263–273.

Page RE & Kerr WE. 1990. The evolution of monandry and queen replacement in *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Revista Brasileira de Genética* **13**: 209–229.

Palazuelos Ballivián J. 2008. *Abelhas Nativas sem Ferrão - Mýg*. São Leopoldo: Oikos. 128 p.

Palmer KA, Oldroyd BP, Quezada-Euan JJG, et al. 2002. Paternity frequency and maternity of males in some stingless bee species. *Molecular Ecology* **11**: 2107–2113.

Palsbøll PJ, Bérubé M & Allendorf FW. 2007. Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution* **22**: 11–16.

Paraná. 2017. Lei N° 19152 de 02 de out. de 2017. Dispõe sobre a criação, o manejo, o comércio e o transporte de abelhas sociais nativas (meliponíneos). *Diário Oficial do Estado, Curitiba, PR, 03 de outubro de 2017*.

Parker HG, Kim L V, Sutter NB, et al. 2004. Genetic structure of the purebred domestic dog heidi. *Science* **304**: 1160–1163.

Peakall RS. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* **28**: 2537–2539.

Perez MF, Franco FF, Bombonato JR, et al. 2018. Assessing population structure in

the face of isolation by distance: Are we neglecting the problem? *Diversity and Distributions*: 1–7.

Peters JM, Queller DC, Imperatriz-Fonseca VL, et al. 1998. Microsatellite loci for stingless bees. *Molecular Ecology* **7**: 783–792.

Peters JM, Queller DC, Imperatriz-Fonseca VL, et al. 1999. Mate number, kin selection and social conflicts in stingless bees and honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **266**: 379–384.

Pirk CWW, Crewe RM & Moritz RFA. 2017. Risks and benefits of the biological interface between managed and wild bee pollinators. *Functional Ecology* **31**: 47–55.

Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, et al. 2004. GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* **95**: 536–539.

Potts SG, Roberts SPM, Dean R, et al. 2010. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research* **49**: 21–8839.

Priadka P, Manseau M, Trottier T, et al. 2018. Partitioning drivers of spatial genetic variation for a continuously-distributed population of boreal caribou: implications for management unit delineation. *Ecology and Evolution*: 1–13.

Price MR & Hadfield MG. 2014. Population genetics and the effects of a severe bottleneck in an ex situ population of critically endangered hawaiian tree snails. *PLoS ONE* **9**: e114377.

Pritchard JK, Stephens M & Donnelly M. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945–59.

Quezada-Euan JJG, Paxton RJ, Palmer KA, et al. 2007. Morphological and molecular characters reveal differentiation in a neotropical social bee, *Melipona Beecheii* (Apidae : Meliponini). *Apidologie* **38**: 247–258.

Quezada-Euán JJG, May-Itzá WJ, Rincón M, et al. 2012. Genetic and phenotypic differentiation in endemic *Scaptotrigona hellwegeri* (Apidae: Meliponini): implications for the conservation of stingless bee populations in contrasting environments. *Insect Conservation and Diversity* **5**: 433–443.

Rafalski JA, Tingey S V & Williams JGK. 1991. RAPD markers - a new technology for genetic mapping and plant breeding. *TAgBiotech News and Information* **3**: 645–648.

Rannala B & Mountain JL. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 9197–9201.

Reed DH & Frankham R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* **17**: 230–237.

Remnant EJ, Koetz A, Tan K, et al. 2014. Reproductive interference between honeybee species in artificial sympatry. *Molecular Ecology* **23**: 1096–1107.

Rio Grande do Sul. 2014a. Decreto N°51.797 de 8 de set. de 2014. Declara as Espécies da Fauna Silvestre Ameaçadas de Extinção no Estado do Rio Grande do Sul. Diário Oficial do Estado, Porto Alegre, RS, 09 de setembro de 2014.

Rio Grande do Sul. 2014b. Instrução Normativa SEMA N° 3 de out. de 2014. Institui e normatiza a criação e conservação de meliponíneos nativos (abelhas sem ferrão), no Estado do Rio Grande do Sul. Diário Oficial do Estado, Porto Alegre, RS, 01 de outubro de 2014.

Rio Grande do Sul. 2015. Lei N° 14763 de 23 de Nov. de 2015. Dispõe sobre a criação, o comércio e o transporte de abelhas sem ferrão - meliponíneas - no Estado do Rio Grande do Sul. Diário Oficial do Estado, Porto Alegre, RS, 24 de novembro de 2015.

Rius M & Darling JA. 2014. How important is intraspecific genetic admixture to the success of colonising populations? *Trends in Ecology and Evolution* **29**: 233–242.

Roubik DW. 2006. Stingless bee nesting biology. *Apidologie* **37**: 124–143.

- Roubik DW. 2018.** *The pollination of cultivated plants: a compendium for practitioners*. 2º ed. Balboa: Food And Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 324 p.
- Santa Catarina. 2013.** *Lei Nº 16171 de 14 de Nov. de 2013. Dispõe sobre a criação, o comércio e o transporte de abelhas-sem-ferrão (meliponíneas) no estado de Santa Catarina*. Diário Oficial do Estado, Florianópolis, SC, 18 de novembro de 2013.
- Santa Catarina. 2015.** *Decreto Nº 178 de 22 de mai. de 2015. Regulamenta a Lei nº 16.171, de 2013, que dispõe sobre a criação, o comércio e o transporte de abelhas-sem-ferrão (meliponíneas) no Estado de Santa Catarina*. Diário Oficial do Estado, Florianópolis, SC, 25 de maio de 2015.
- Santiago LR. 2013.** Variabilidade Genética de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) de Meliponários. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, 119 p.
- Santiago LR, Francisco FO, Jaffé R, et al. 2016.** Genetic variability in captive populations of the stingless bee *Tetragonisca angustula*. *Genetica* **144**: 397–405.
- da Silva GR, Pereira FM, Souza, BA, Lopes MTR & Diniz, FM. 2019.** Pesquisas com abelhas-sem-ferrão (Hymenoptera: Meliponini) e aplicabilidade dos marcadores moleculares: Uma revisão sistemática da literatura. *PUBVET Medicina Veterinária e Zootecnia* **13**:1-19.
- dos Santos CF, Otesbelgue A & Blochtein B. 2018.** The dilemma of agricultural pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. *PLoS ONE* **13**: 1–13.
- São Paulo. 2017.** *Resolução SAA-52 de 03 de out. de 2017. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Padrão do mel elaborado pelas abelhas da subfamília Meliponinae (Hymenoptera, Apidae), conhecidas por Abelhas sem Ferrão-ASF e os requisitos de processamento e segurança*. Diário Oficial do Estado, São Paulo, SP, 17 de outubro de 2017.
- São Paulo. 2018.** *Plano de Fortalecimento da Cadeia Produtiva da Apicultura e da Meliponicultura do Estado. Secretaria de Agricultura e Abastecimento*. <https://www.agricultura.sp.gov.br/media/13377-plano-de-fortalecimento-da-cadeia-da-apicultura-e-meliponicultura-10-dez-2018.pdf>. Acesso em 2 de janeiro de 2019.
- del Sarto MCL, Peruquetti RC & Campos LAO. 2005.** Evaluation of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) as pollinator of greenhouse tomatoes. *Journal of economic entomology* **98**: 260–266.
- Schenekar T, Lerceteau-Khler E & Weiss S. 2014.** Fine-scale phylogeographic contact zone in Austrian brown trout *Salmo trutta* reveals multiple waves of post-glacial colonization and a pre-dominance of natural versus anthropogenic admixture. *Conservation Genetics* **15**: 561–572.
- Schiff NM & Sheppard WS. 1996.** Genetic differentiation in the queen breeding population of the western United States. *Apidologie* **27**: 77–86.
- Schiff NM, Sheppard WS & Loper GM. 1994.** Genetic diversity of feral honey bee (Hymenoptera : Apidae) populations in the southern United States. *Ann. Entomol. Soc. Am* **87**: 842–848.
- Schuelke M. 2000.** An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology* **18**: 233–234.
- Schwartz MK, Luikart G & Waples RS. 2007.** Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology and Evolution* **22**: 25–33.
- Schwarz HF. 1948.** Stingless bees of the western hemisphere. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **90**: 1–546.
- Seeley T & Tarpy D. 2007.** Queen promiscuity lowers disease within honeybee colonies. *Proceedings of the Royal* **274**: 67–72.

- Seide VE, Bernardes RC, Pereira EJJ, et al. 2018.** Glyphosate is lethal and cry toxins alter the development of the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Environmental Pollution* **243**: 1854–1860.
- Sequeira F, Alexandrino J, Weiss S, et al. 2008.** Documenting the advantages and limitations of different classes of molecular markers in a well-established phylogeographic context: Lessons from the Iberian endemic Golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Caudata: Salamandridae). *Biological Journal of the Linnean Society* **95**: 371–387.
- Silva GR, Pereira FM, Souza BA, et al. 2014.** Aspectos bioecológicos e genético-comportamentais envolvidos na conservação da abelha Jandaíra, *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini), e o uso de ferramentas moleculares nos estudos de diversidade. *Arquivos do Instituto Biológico* **81**: 299–308.
- Silva GR, Souza IGB, Pereira FM, et al. 2018.** Genome-wide discovery and characterization of microsatellite markers from *Melipona fasciculata* (Hymenoptera: Apidae), cross-amplification and a snapshot assessment of the genetic diversity in two stingless bee populations. *European Journal of Entomology* **115**: 614–619.
- da Silva FM, Miño CI, Izbicki R, et al. 2018.** Considerations for monitoring population trends of colonial waterbirds using the effective number of breeders and census estimates. *Ecology and Evolution*: 8088–8101.
- da Silva DLN, Zucchi R & Kerr WE. 1972.** Biological and behavioural aspects of the reproduction in some species of *Melipona* (hymenoptera, apidae, meliponinae). *Animal Behaviour* **20**: 123–132.
- Silveira FA, Pinheiro-Machado C, Alves-dos-Santos I, et al. 2002.** Taxonomic constraints for the conservation and sustainable use of wild pollinators - The Brazilian wild Bees. In *Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.
- Souza RO, Moretto G, Arias MC, et al. 2008.** Differentiation of *Melipona quadrifasciata* L. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) subspecies using cytochrome b PCR-RFLP patterns. *Genetics and Molecular Biology* **31**: 445–450.
- Souza FS, Angélica M, Carvalho P De, et al. 2018.** Genetic variability of *Melipona subnitida* (Hymenoptera: Apidae) in introduced and native populations. *Journal of Insect Science* **18**: 1–6.
- Strange JP, Delaney DA, Tarpy DR, et al. 2017.** Novel microsatellite loci reveal high genetic diversity yet low population structure for alfalfa leafcutting bees in North America. *Conservation Genetics* **18**: 679–687.
- Strange JP, Garnery L & Sheppard WS. 2008.** Morphological and molecular characterization of the Landes honey bee (*Apis mellifera* L.) ecotype for genetic conservation. *Journal of Insect Conservation* **12**: 527–537.
- Suni SS, Bronstein JL & Brosi BJ. 2014.** Spatio-temporal genetic structure of a tropical bee species suggests high dispersal over a fragmented landscape. *Biotropica* **46**: 202–209.
- Takezaki N & Nei M. 1996.** Genetic distances and the setting of conservation priorities. *Biological Conservation* **75**: 311.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. 2011.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731–2739.
- Tarpy DR, Vanengelsdorp D & Pettis JS. 2013.** Genetic diversity affects colony survivorship in commercial honey bee colonies. *Naturwissenschaften* **100**: 723–728.
- Tavares MG, Dias LAS, Borges AA, et al. 2007.** Genetic divergence between populations of the stingless bee urucu amarela (*Melipona rufiventris* group,

- Hymenoptera, Meliponini): is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais? *Genetics and Molecular Biology* **30**: 667–675.
- Tavares MGM, Pietrani NTN, Durvale MDCM, et al. 2013.** Genetic divergence between *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations. *Genetics and Molecular Biology* **36**: 111–117.
- Teixeira LV & Campos FNM. 2005.** Início da atividade de vôo em abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae): influência do tamanho da abelha e da temperatura ambiente. *Revista Brasileira de Zoociências* **7**: 195–202.
- Teixeira KO, Silveira TCL & Harter-Marques B. 2018.** Different responses in geographic range shifts and increase of niche overlap in future. *Sociobiology* **65**: 630–639.
- Templeton, AR. (1998).** Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, **7**:381-397.
- Thummajitsakul S, Klinbunga S & Sittipraneed S. 2011.** Genetic differentiation of the stingless bee *Tetragonula pagdeni* in Thailand using SSCP analysis of a large subunit of mitochondrial ribosomal DNA. *Biochemical Genetics* **49**: 499–510.
- Toledo JAM, Junqueira CN, Augusto SC, et al. 2017.** Accessing the genetic content of *Xylocopa frontalis* bees (Apidae, Xylocopini) for sustainable management in pollination services of passion fruit. *Apidologie* **48**: 795-805.
- Tsuchida K, Ito Kondo N, Inoue MN, et al. 2010.** Reproductive disturbance risks to indigenous Japanese bumblebees from introduced *Bombus terrestris*. *Applied Entomology and Zoology* **45**: 49–58.
- vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, et al. 2009.** Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS ONE* **4** (8): e6481.
- vanEngelsdorp D, Hayes J, Underwood RM, et al. 2010.** A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *Journal of Apicultural Research* **49**: 7–14.
- vanEngelsdorp D & Meixner MMD. 2010.** A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**: S80–S95.
- Van Veen JW & Sommeijer MJ. 2000.** Colony reproduction in *Tetragonisca angustula* (Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux* **47**: 70–75.
- Velthuis HHW, Koedam D & Imperatriz-Fonseca VL. 2005.** The males of *Melipona* and other stingless bees, and their mothers. *Apidologie* **36**: 169–185.
- Venturieri GC. 2008.** *Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão*. 2° ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 60 p.
- Viana LS. 2011.** Expressão dos genes feminizantes fem e vitelogenina durante as fases de desenvolvimento da abelha sem ferrão *Melipona interrupta* (Hymenoptera: Apidae). Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. 40 p.
- Viana BF, Gabriel J, Garibaldi LA, et al. 2014.** Stingless bees further improve apple pollination and production. *Journal of Pollination Ecology* **14**: 261–269.
- Villas-Bôas J. 2012.** *Manual Tecnológico: Mel de abelhas sem ferrão*. 1° ed. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN). 96 p.
- VonHoldt BM, Cahill JA, Fan Z, et al. 2016.** Whole-genome sequence analysis shows that two endemic species of North American Wolf are admixtures of the coyote and gray Wolf. *Science Advances* **2**: e1501714.
- Waldschmidt AM, Marco Junior P, Barros EG de, et al. 2002.** Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* LEP. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. *Brazilian Journal of Biology* **62**: 923–928.

- Waldschmidt AM, Barros EG & Campos LAO. 2000.** A molecular marker distinguishes the subspecies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Genetics and Molecular Biology* **23**: 609–611.
- Walsh PS, Metzger DA & Higuchi R. 2013.** Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* **54**: 506–513.
- Wang J. 2009.** A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. *Molecular Ecology* **18**: 2148–2164.
- Wang J. 2016.** A comparison of single-sample estimators of effective population sizes from genetic marker data. *Molecular ecology* **25**: 4692–4711.
- Waples RS & Gaggiotti O. 2006.** What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology* **15**: 1419–1439.
- Wasser SK, Clark WJ, Drori O, et al. 2008.** Combating the illegal trade in African elephant ivory with DNA forensics. *Conservation Biology* **22**: 1065–1071.
- Wenseleers T, Alves DA, Franco TM, et al. 2011.** Intraspecific queen parasitism in a highly eusocial bee. *Animal Behaviour*: 173–176.
- Willoughby JR, Fernandez NB, Lamb MC, et al. 2015.** The impacts of inbreeding, drift and selection on genetic diversity in captive breeding populations. *Molecular Ecology* **24**: 98–110.
- Witter S & Blochtein B. 2008.** *Espécies de abelhas sem ferrão de ocorrência no Rio Grande do Sul*. 1º ed. Porto Alegre: Versátil Artes Gráficas. 70 p.
- Witzenberger KA & Hochkirch A. 2011.** Ex situ conservation genetics: a review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species. *Biodiversity and Conservation* **20**: 1843–1861.
- Wright S. 1931.** Evolution in Mendelian populations. *Genetics* **16**: 97–159.
- Zayed A. 2004.** Effective population size in Hymenoptera with complementary sex determination. *Heredity* **93**: 627–630.
- Zayed A. 2009.** Bee genetics and conservation. *Apidologie* **40**: 237–262.
- Zayed A & Packer L. 2005.** Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 10742–6.
- Zayed A, Roubik DW & Packer L. 2004.** Use of diploid male frequency data as an indicator of pollinator decline. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **271** Suppl: S9–12.
- Zeder MA, Emshwiller E, Smith BD, et al. 2006.** Documenting domestication: The intersection of genetics and archaeology. *Trends in Genetics* **22**: 139–155.
- Zink RM. 2002.** Methods in comparative phylogeography, and their application to studying evolution in the north american aridlands. *Integrative and comparative biology* **42**: 953–959.

8. APÊNDICE

Tabela 1: Características individuais das amostras de *Melipona quadrifasciata* analisadas quanto o gene MtCOI e para os marcadores de microssatélites Mq4, Mq6, Mq7, Mq19, Mq20. O padrão de listras abdominais foi coletado para possível identificação de cruzamentos interespecíficos.

ID amostra	ID Meliponário	COI	Genotipagem (Mq...)	Padrão abdominal	Origem conhecida
1	SRL1	X	4, 6, 19,20	Contínua	Rio do meio
2	SRL2	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	
3	SRL2	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	
4	SRL3	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	SRL
5	SRL3		4, 6, 7, 19,20	Contínua	SRL
6	SRL4	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	SRL
7	SRL5	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	SRL
8	SRL8		4, 6, 7, 19,20	Contínua	Tronco de SRL
9	SRL8		4, 6, 7, 19,20	Contínua	Rio do Sul
10	SRL11		4, 6, 7, 19,20	Interrupta	MQA - Machado - MG
11	RNe1	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	Antiga de RNE
12	RNe1		4, 19,20	Contínua	Antiga de RNE
13	RNe1		4, 6, 19,20	Contínua	Antiga de RNE
14	RNe1		4, 6, 7, 19,20	Contínua	Enxameação RNE
15	RNe1		4, 6, 7, 19,20	Contínua	Antiga de RNE
16	RNe1		4, 6, 19,20	Contínua	Antiga de RNE
17	Arm1	X	4, 7, 19	Contínua	São Bonifácio
18	Arm1	X	6, 7, 19,20	Interrupta	Provável Híbrida com MQA
19	Arm1	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	São José dos Campos provável Híbrida com MQA
20	Arm1		4, 6, 19,20	Contínua	São José dos Campos provável Híbrida com MQA
21	Maf1	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	Maf
22	Maf1	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	Maf
23	Maf1		4, 6, 7, 19,20	Contínua	Maf
24	Maf1		4, 6, 7, 19,20	Interrupta	Maf Provável híbrida
25	Maf1		4, 6, 7, 19,20	Contínua	Maf
26	Maf1		4, 6, 19,20	Contínua	Maf
27	Maf1	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	MQA híbrida com MQQ
28	Maf1		4, 7, 19,20	Contínua	Maf
29	Maf1		4, 6, 19,20	Contínua	Maf
30	Maf1	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	Maf
31	JDS1		4, 6, 19, 20	Contínua	Criciúma
32	JDS1		4, 6, 7, 19, 20	Contínua	JDS
33	JDS1		6, 7, 19, 20	Contínua	RS
34	JDS1	X	6, 7, 20	Contínua	Criciúma
35	JDS1		6, 7, 19, 20	Contínua	SBS
36	JDS1	X	4, 6, 7, 20	Contínua	JDS
37	JDS1		4, 6, 7, 20	Contínua	JDS
38	Gua1		4, 6, 7, 19, 20	Contínua	Agrolândia
39	Gua1	X	6, 7, 19	Contínua	Gua ou Blu
40	Gua1		6, 7, 19, 20	Contínua	São Francisco

Continuação. Tabela 1: Características individuais das amostras de *Melipona quadrifasciata* analisadas quanto o gene MtCOI e para os marcadores de microsatélites Mq4, Mq6, Mq7, Mq19, Mq20. O padrão de listras abdominais foi coletado para possível identificação de cruzamentos interespecíficos.

41	CAI1		6, 7, 19,20	Contínua	Ninho natural de Cal
42	CAI1	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	CAI
43	CAI1		4, 6, 7, 19,20	Contínua	CAI
44	CAI1	X	6, 7, 19,20	Contínua	Divisão de CAI
45	CAI1	X	4, 19,20	Contínua	Corupá
46	CAI1		4, 7, 19,20	Contínua	Divisão de CAI
47	CAI1		4, 6, 19,20	Contínua	
48	CAI1		6, 7,20	Contínua	CAI
49	CAI1		4, 6, 7, 19,20	Contínua	Maf
50	CAI1	X	6, 7,20	Contínua	Divisão de CAI
51	SBS1	X	4, 6, 19, 20	Contínua	Corupá
52	SBS1		4, 6, 7, 20	Contínua	Corupá
53	SBS1		6, 7, 19	Contínua	
54	SBS1		4, 6, 7, 19,20	Contínua	
55	SBS1		6, 7, 19,20	Contínua	
56	SBS1		6, 7, 20	Contínua	Enxameação de SBS
57	HDO1	X	6, 7, 20	Contínua	Enxameação de HDO
58	HDO1	X	6, 7, 19, 20	Contínua	Balneário Rincão
59	HDO1	X	6, 7, 19, 20	Interrupta	Ribeirão Preto - MQA híbrida com MQQ
60	HDO1		6, 7, 19, 20	Contínua	Balneário Rincão
61	HDO1		6, 20	Contínua	
62	Luz1	X	4, 6, 19, 20	Contínua	Natural de Canoinhas
63	Luz1	X	4, 6, 7, 19, 20	Contínua	Natural de Canoinhas
64	Luz1		4, 6, 7, 20	Contínua	
65	Luz1	X	4, 6, 7, 19, 20	Contínua	
66	Luz1	X	4, 6, 7, 19, 20	Contínua	
67	RDS1		4, 6, 7, 19,20	Contínua	Taió ou SRL
68	RDS2		4, 6, 7, 19,20	Contínua	
69	RDS2	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	
70	Aur1		4, 6, 7, 19,20	Contínua	Taió ou SRL
71	Aur1		4, 7, 19,20	Contínua	Taió ou SRL
72	Aur1	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	Taió ou SRL
73	Aur1	X	6, 7, 19,20	Contínua	Taió ou SRL
74	Aur1		6, 7, 19,20	Contínua	Taió ou SRL
75	Aur1	X	6, 7, 19,20	Contínua	Taió ou SRL
76	Aur1		6, 7, 19,20	Contínua	Taió ou SRL
77	Blu1	X	6, 7, 19,20	Contínua	Enxameação de Angelina
78	Blu1	X	6, 7, 19,20	Contínua	Angelina
79	Blu1		6, 7, 19,20	Contínua	Angelina
80	Blu2	X	6, 7, 19,20	Contínua	
81	Blu2		6, 19,20	Contínua	
82	Blu2		6, 7, 19,20	Contínua	
83	Blu3		4, 6, 7, 19,20	Contínua	
84	Blu3		6, 7	Contínua	
85	Blu3		4, 6, 7, 19,20	Contínua	

Continuação. Tabela 1: Características individuais das amostras de *Melipona quadrifasciata* analisadas quanto o gene MtCOI e para os marcadores de microssatélites Mq4, Mq6, Mq7, Mq19, Mq20. O padrão de listras abdominais foi coletado para possível identificação de cruzamentos interespecíficos.

86	Blu3		4, 6, 7, 19,20	Contínua	
87	Xan1	X	6, 7, 19,20	Contínua	Chapecó
88	Xan1	X	7, 19,20	Contínua	Rio Grande do Sul
89	Xan1		6, 7, 19,20	Contínua	Xan
90	Xan1	X	6, 7, 19,20	Contínua	
92	CMa1		4, 6, 7, 19,20	Contínua	Natural de CMa
93	CMa1	X	6, 7,20	Contínua	Natural de CMa
94	CMa1	X	6, 7, 19,20	Contínua	Natural de CMa
95	Mor1		7, 19, 20	Contínua	Antonina
96	Mor1	X	4, 7, 19,20	Contínua	
97	Mor1	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	
98	Mor1		4, 7, 19,20	Contínua	
99	Mor1	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	Santa Catarina
100	Mor1	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	
101	Mor1		4, 6, 7, 19,20	Contínua	
102	Mor1	X	4, 7, 19,20	Contínua	
103	Mor1	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	
104	Mor1	X	4, 6, 7, 19,20	Contínua	Enxameação em Mor
105	PBr1		4, 6, 7, 19,20	Contínua	
106	PBr1		4, 7, 19,20	Descontínua	MG
107	PBr1		4, 7, 19,20	Contínua	
108	PBr1		4, 7, 19,20	Contínua	
109	PBr1		4, 7, 20	Contínua	
110	Pru1		4, 7, 19,20	Contínua	
111	Pru1		4, 7, 19,20	Contínua	
112	Pru1	X	4, 7, 19,20	Contínua	Cur
113	Pru1	X	4, 7, 19,20	Contínua	
114	Pru1	X	4, 7, 19,20	Contínua	
115	Pru1	X	4, 7, 19,20	Contínua	
116	Pru1	X	4, 7, 19,20	Descontínua	Cur, Provável híbrida
117	Pru1		4, 7, 19,20	Contínua	
118	Pru1	X	4, 7, 19,20	Contínua	
119	Pru1	X	4, 7, 19,20	Contínua	Pru
120	SAP1		4, 7, 19,20	Descontínua	Cur
121	SAP1		4, 7, 19,20	Contínua	Cur
122	SAP1		4, 7, 19,20	Contínua	Cur
123	SAP1		4, 7, 19,20	Descontínua	Cur
124	SAP1		4, 7, 19,20	Contínua	Cur
125	Cam1		4, 7, 19,20	Contínua	SRL
126	Cam1		4, 7, 20	Contínua	SRL
127	Cam1		4, 7, 20	Descontínua	Cam
128	Cam1		4, 7, 19,20	Descontínua	Cam
129	Cam1		4, 7, 19,20	Descontínua	Provável híbrida
130	Man2	X	4, 7, 19, 20	Contínua	Man
131	Man2	X	4, 19, 20	Contínua	
132	Man2	X	4, 19, 20	Contínua	

Continuação. Tabela 1: Características individuais das amostras de *Melipona quadrifasciata* analisadas quanto o gene MtCOI e para os marcadores de microssatélites Mq4, Mq6, Mq7, Mq19, Mq20. O padrão de listras abdominais foi coletado para possível identificação de cruzamentos interespecíficos.

133	Man2	X	4, 19, 20	Contínua	
134	Man3	X	4, 19, 20	Contínua	Man
135	Man3	X	4, 19, 20	Contínua	Man
136	Man3	X	4, 19, 20	Descontínua	Man. Provável híbrida
137	Man3		4, 19, 20	Contínua	Man
138	Man3	X	4, 7, 19, 20	Contínua	Man
139	Man3		4, 19, 20	Contínua	Man
140	QBa1	X	4, 7, 19,20	Contínua	PR
141	QBa1	X	4, 7, 19,20	Contínua	PR
142	QBa1	X	4, 7, 19,20	Contínua	
143	QBa1	X	4, 7, 19,20	Contínua	
144	QBa1		4, 7, 19,20	Contínua	
145	QBa1	X	4, 7, 19,20	Contínua	
146	QBa1		4, 7, 19,20	Contínua	
147	QBa1	X	4, 7, 19,20	Contínua	
148	QBa1	X	4, 7, 19,20	Contínua	
149	QBa1	X	4, 7, 19,20	Contínua	
150	Cur2	X	4, 7, 19, 20	Contínua	
151	Cur2	X	4, 19, 20	Contínua	
152	Cur2	X	4, 7, 20	Contínua	
153	Cur2	X	4, 19, 20	Contínua	
154	Cur2	X	4, 7, 19, 20	Contínua	
155	Cur3	X	4, 7, 19, 20	Contínua	
156	Cur3	X	4, 19, 20	Descontínua	Provável híbrida
157	Cur3	X	4, 19, 20	Contínua	
158	Cur3	X	4, 19, 20	Contínua	
159	Cur3	X	4, 19, 20	Descontínua	

ID: Identificação da amostra e do meliponário.

Tabela 2: Genótipos obtidos para cada um dos marcadores de microssatélites utilizados indivíduos de *Melipona quadrifasciata* do sul do Brasil.

Locus		Mq4		Mq6		Mq7		Mq19		Mq20	
ID	Localidade	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
001	SRL1	128	128	101	140	0	0	192	192	179	179
002	SRL2	128	128	101	101	120	120	192	192	179	189
003	SRL2	128	128	101	101	120	120	192	192	189	189
004	SRL3	128	128	101	140	120	120	192	192	189	189
005	SRL3	128	128	101	101	100	102	192	192	179	179
006	SRL4	128	128	101	101	134	134	192	192	189	189
007	SRL5	128	128	101	101	196	196	192	192	179	189
008	SRL8	128	128	101	101	120	120	192	192	189	189
009	SRL8	128	128	101	101	120	120	192	192	189	189
010	SRL11	128	128	101	101	120	120	192	192	189	189
011	RNe1	130	130	192	192	120	120	192	192	189	189
012	RNe1	130	130	0	0	0	0	192	192	179	189

Continuação. Tabela 2: Genótipos obtidos para cada um dos marcadores de microssatélites utilizados indivíduos de *Melipona quadrifasciata* do sul do Brasil.

013	RNe1	128	128	192	192	0	0	192	192	189	189
014	RNe1	128	128	192	192	104	142	192	192	189	189
015	RNe1	128	128	192	192	120	120	192	192	189	189
016	RNe1	128	128	192	192	0	0	192	192	189	189
017	Arm1	128	128	0	0	122	122	192	192	0	0
018	Arm1	0	0	192	192	120	120	192	192	189	189
019	Arm1	128	128	192	192	132	132	192	192	189	189
020	Arm1	128	128	192	192	0	0	192	192	189	189
021	Maf1	128	128	192	192	132	132	192	192	189	189
022	Maf1	128	128	192	192	120	120	192	192	179	189
023	Maf1	128	128	192	192	120	120	192	192	189	189
024	Maf1	128	128	192	192	132	132	192	192	189	189
025	Maf1	128	128	192	192	102	120	192	192	189	189
026	Maf1	128	128	192	192	0	0	192	192	189	189
027	Maf1	128	128	192	192	146	146	192	192	189	189
028	Maf1	128	128	0	0	120	120	190	192	189	189
029	Maf1	128	128	192	192	0	0	192	192	189	189
030	Maf1	128	128	192	192	100	120	192	192	189	189
031	JDS1	128	128	192	192	0	0	192	192	179	189
032	JDS1	128	128	192	192	120	120	192	192	189	189
033	JDS1	0	0	192	192	120	140	192	192	179	179
034	JDS1	0	0	192	192	120	120	0	0	179	179
035	JDS1	0	0	192	192	120	120	192	192	179	179
036	JDS1	118	128	192	192	120	120	0	0	179	179
037	JDS1	118	128	192	192	120	120	0	0	179	189
038	Gua1	128	160	192	192	120	120	192	192	189	189
039	Gua1	0	0	192	195	120	120	192	192	0	0
040	Gua1	0	0	192	192	120	140	0	0	189	189
041	CAI1	0	0	192	192	120	120	192	192	189	189
042	CAI1	128	198	192	192	120	120	192	192	189	189
043	CAI1	128	198	192	192	120	120	192	192	189	189
044	CAI1	128	140	192	192	120	120	0	0	179	189
045	CAI1	128	128	0	0	0	0	192	192	189	189
046	CAI1	110	128	0	0	120	120	192	192	189	189
047	CAI1	118	128	192	192	0	0	192	192	189	189
048	CAI1	0	0	192	192	122	122	0	0	189	189
049	CAI1	128	140	192	192	120	120	192	194	189	189
050	CAI1	0	0	192	195	120	140	0	0	189	189
051	SBS1	128	140	192	195	0	0	192	192	189	189
052	SBS1	118	128	192	192	120	120	0	0	189	189
053	SBS1	0	0	192	192	122	122	192	192	0	0
054	SBS1	128	128	192	192	122	128	192	192	189	189
055	SBS1	0	0	192	192	106	106	192	192	189	189
056	SBS1	0	0	192	192	106	120	0	0	179	179
057	HDO1	0	0	192	192	120	120	0	0	179	179
058	HDO1	0	0	192	192	120	120	192	192	179	189
059	HDO1	0	0	192	192	122	122	192	192	189	189

Continuação. Tabela 2: Genótipos obtidos para cada um dos marcadores de microssatélites utilizados indivíduos de *Melipona quadrifasciata* do sul do Brasil.

060	HDO1	0	0	192	192	120	140	192	192	189	189
061	HDO1	0	0	192	192	0	0	0	0	179	179
062	Luz1	128	140	192	195	0	0	192	192	189	189
063	Luz1	118	128	192	195	120	120	192	192	189	189
064	Luz1	128	128	192	192	120	120	0	0	179	189
065	Luz1	128	128	192	192	120	128	192	192	179	179
066	Luz1	128	198	192	192	120	120	192	192	179	189
067	RDS1	128	140	192	192	120	120	192	192	179	179
068	RDS2	122	128	192	192	120	120	192	192	179	179
069	RDS2	122	128	192	192	120	120	192	192	169	189
070	Aur1	128	198	192	192	120	120	192	192	179	189
071	Aur1	128	140	0	0	120	120	192	192	179	189
072	Aur1	122	128	192	195	120	120	190	192	179	189
073	Aur1	0	0	192	192	120	120	190	192	179	184
074	Aur1	0	0	192	192	120	120	190	192	189	189
075	Aur1	0	0	192	192	120	120	190	192	179	179
076	Aur1	0	0	192	192	120	120	192	200	189	189
077	Blu1	0	0	192	192	120	120	192	200	199	199
078	Blu1	0	0	192	192	120	120	192	192	189	189
079	Blu1	0	0	192	192	120	120	192	192	179	189
080	Blu2	0	0	192	192	120	120	192	192	189	189
081	Blu2	0	0	192	192	0	0	192	192	179	189
082	Blu2	0	0	192	195	120	120	192	192	189	189
083	Blu3	128	140	192	192	120	120	192	192	189	189
084	Blu3	0	0	192	192	120	120	0	0	0	0
085	Blu3	128	140	192	192	120	120	192	192	179	179
086	Blu3	128	140	192	192	120	120	192	192	189	189
087	Xan1	0	0	192	192	128	140	192	192	189	189
088	Xan1	0	0	0	0	128	140	192	192	189	189
089	Xan1	0	0	192	192	128	140	192	192	189	189
090	Xan1	0	0	192	192	116	128	192	192	179	189
092	CMa1	128	140	192	192	128	128	192	192	189	189
093	CMa1	0	0	192	192	128	128	0	0	189	189
094	CMa1	0	0	192	192	120	120	192	192	189	189
095	Mor1	0	0	0	0	120	130	192	192	189	189
096	Mor1	130	140	0	0	120	120	192	192	189	189
097	Mor1	130	140	192	192	120	130	192	192	189	189
098	Mor1	130	140	0	0	120	130	192	192	189	189
099	Mor1	128	140	192	192	120	130	192	192	189	189
100	Mor1	140	140	192	192	120	130	192	192	189	189
101	Mor1	130	140	192	192	128	128	192	192	189	189
102	Mor1	140	140	0	0	128	140	192	192	189	189
103	Mor1	140	140	192	192	130	172	192	192	179	189
104	Mor1	128	128	192	192	128	128	192	192	179	189
105	PBr1	140	140	192	192	130	172	192	192	179	179
106	PBr1	128	140	0	0	130	140	192	192	189	189
107	PBr1	128	140	0	0	106	106	192	192	179	189

Continuação. Tabela 2: Genótipos obtidos para cada um dos marcadores de microssatélites utilizados indivíduos de *Melipona quadrifasciata* do sul do Brasil.

108	PBr1	128	140	0	0	128	128	192	192	179	189
109	PBr1	128	198	0	0	122	122	0	0	179	189
110	Pru1	122	128	0	0	122	122	192	192	189	189
111	Pru1	122	128	0	0	128	140	192	192	189	189
112	Pru1	128	128	0	0	122	122	192	192	189	189
113	Pru1	128	128	0	0	128	128	192	192	189	189
114	Pru1	122	128	0	0	122	134	192	192	179	189
115	Pru1	128	198	0	0	130	134	192	192	189	189
116	Pru1	128	140	0	0	114	134	192	192	179	189
117	Pru1	128	198	0	0	128	140	192	192	179	179
118	Pru1	122	128	0	0	128	140	190	192	189	189
119	Pru1	122	128	0	0	122	122	190	192	179	189
120	SAP1	128	128	0	0	128	140	192	194	189	189
121	SAP1	128	128	0	0	128	140	192	192	189	199
122	SAP1	128	152	0	0	128	128	192	192	189	199
123	SAP1	128	198	0	0	0	0	192	192	189	189
124	SAP1	128	140	0	0	122	122	192	192	189	199
125	Cam1	128	128	0	0	128	128	192	192	189	189
126	Cam1	128	128	0	0	128	128	0	0	189	189
127	Cam1	128	128	0	0	128	128	0	0	179	189
128	Cam1	128	128	0	0	122	198	192	192	189	189
129	Cam1	128	128	0	0	198	152	192	192	189	189
130	Man2	128	128	0	0	122	122	190	192	179	189
131	Man2	128	234	0	0	0	0	192	194	189	189
132	Man2	128	198	0	0	0	0	192	194	179	189
133	Man2	128	128	0	0	0	0	192	192	189	189
134	Man3	128	140	0	0	0	0	192	192	179	189
135	Man3	128	128	0	0	0	0	192	192	179	189
136	Man3	128	140	0	0	0	0	192	192	179	189
137	Man3	122	128	0	0	0	0	192	192	179	189
138	Man3	128	140	0	0	122	122	192	192	189	189
139	Man3	128	140	0	0	0	0	192	192	189	189
140	QBa1	122	128	0	0	114	122	128	192	189	189
141	QBa1	128	140	0	0	134	170	192	192	189	189
142	QBa1	128	128	0	0	0	0	192	192	189	189
143	QBa1	110	128	0	0	0	0	192	194	189	189
144	QBa1	128	128	0	0	0	0	192	194	189	189
145	QBa1	128	140	0	0	0	0	190	192	189	189
146	QBa1	118	128	0	0	0	0	192	192	189	189
147	QBa1	128	128	0	0	122	122	192	192	189	189
148	QBa1	128	128	0	0	100	100	192	192	179	179
149	QBa1	128	160	0	0	0	0	192	192	189	189
150	Cur2	128	140	0	0	122	122	192	192	189	189
151	Cur2	122	128	0	0	0	0	192	192	189	189
152	Cur2	128	140	0	0	134	102	0	0	189	189
153	Cur2	128	140	0	0	0	0	192	194	189	189
154	Cur2	128	140	0	0	122	122	192	192	189	189

Continuação. Tabela 2: Genótipos obtidos para cada um dos marcadores de microssatélites utilizados indivíduos de *Melipona quadrifasciata* do sul do Brasil.

155	Cur3	128	128	0	0	122	122	192	192	189	189
156	Cur3	128	140	0	0	0	0	192	192	189	189
157	Cur3	128	198	0	0	0	0	192	192	189	189
158	Cur3	128	128	0	0	0	0	192	192	179	189
159	Cur3	128	128	0	0	0	0	192	192	179	189

Tabela 3: Localidades e as respectivas altitudes dos meliponários usadas para o teste de correlação de Pearson entre a porcentagem de mistura entre as duas populações sugeridas pela análise de estruturação usando os marcadores de microssatélites.

População	% pop vermelha	% pop verde	Altitude média das localidades, em metros
Blu	0,085	0,915	28
CurCMA	0,681	0,319	932
HDOLuz	0,237	0,763	712
JDSGua	0,104	0,896	111
Man	0,607	0,393	871
Mor	0,316	0,684	14
PBr	0,554	0,446	828
Pru	0,891	0,109	768
Qba	0,591	0,409	992
RDSAur	0,039	0,961	339
Maf	0,447	0,553	862
RNeSBS	0,432	0,568	828
CAI	0,235	0,765	931
SAPCam	0,921	0,079	477
SRLArm	0,302	0,698	290
Xan	0,953	0,047	784

Tabela 4: Lista de populações de *Melipona quadrifasciata* com resultados positivos para desequilíbrio de ligação entre os loci de microssatélites, sendo considerado valor de significância quando $p < 5\%$.

Loci	Mq4	Mq6	Mq7	Mq19
Mq6	Amostra total			
	RNeSBS			
Mq7	Pru	SRLArm		
Mq19			Cur	
Mq20	RNeSBS	JDSGua	QBa SRL	Blu

Tabela 5: Atribuição das amostras de *Melipona quadrifasciata* em macrorregiões. As duas localidades com maior probabilidade de atribuição são mostradas.

Amostra testada	Rank 1	Score %	Rank 2	Score %
Vale do Itajai/77 Blu	Vale do Itajai	87,1	Oeste catarinense	10,2
Vale do Itajai/78 Blu	Norte catarinense	49,4	Vale do Itajai	28,5
Vale do Itajai/79 Blu	Vale do Itajai	49,7	Norte catarinense	27,3
Vale do Itajai/80 Blu	Norte catarinense	49,4	Vale do Itajai	28,5
Vale do Itajai/81 Blu	Oeste catarinense	23,4	Norte catarinense	18,0
Vale do Itajai/82 Blu	Norte catarinense	45,9	Oeste catarinense	29,1
Vale do Itajai/83 Blu	Vale do Itajai	47,6	Norte catarinense	27,5
Vale do Itajai/84 Blu	Vale do Itajai	55,7	Norte catarinense	27,0
Vale do Itajai/85 Blu	Vale do Itajai	77,1	Oeste catarinense	16,1
Vale do Itajai/86 Blu	Vale do Itajai	47,6	Norte catarinense	27,5
Vale do Itajai/67 RDS	Vale do Itajai	77,1	Oeste catarinense	16,1
Vale do Itajai/68 RDS	Vale do Itajai	95,5	Oeste catarinense	3,5
Vale do Itajai/69 RDS	Vale do Itajai	92,7	Oeste catarinense	4,6
Vale do Itajai/70 Aur	Oeste catarinense	58,3	Norte catarinense	33,5
Vale do Itajai/71 Aur	Vale do Itajai	68,3	Oeste catarinense	15,6
Vale do Itajai/72 Aur	Vale do Itajai	98,8	Oeste catarinense	0,8
Vale do Itajai/73 Aur	Vale do Itajai	93,7	Oeste catarinense	3,2
Vale do Itajai/74 Aur	Vale do Itajai	71,7	Norte catarinense	21,6
Vale do Itajai/75 Aur	Vale do Itajai	93,2	Norte catarinense	3,5
Vale do Itajai/76 Aur	Vale do Itajai	78,4	Norte catarinense	10,5
Sul catarinense/1 SRL	Sul catarinense	77,4	Sudoeste do Parana	13,4
Sul catarinense/2 SRL	Sul catarinense	99,9	Oeste catarinense	0,1
Sul catarinense/3 SRL	Sul catarinense	99,9	Oeste catarinense	0,0
Sul catarinense/4 SRL	Sul catarinense	99,8	Oeste catarinense	0,1
Sul catarinense/5 SRL	Sul catarinense	71,1	Sudoeste do Parana	19,8
Sul catarinense/6 SRL	Sudeste paranaense	81,9	Sul catarinense	16,5
Sul catarinense/7 SRL	Sul catarinense	91,7	Sudoeste do Parana	4,7
Sul catarinense/8 SRL	Sul catarinense	99,9	Oeste catarinense	0,0

Continuação. Tabela 5: Atribuição das amostras de *Melipona quadrifasciata* em macrorregiões. As duas localidades com maior probabilidade de atribuição são mostradas.

Sul catarinense/9 SRL	Sul catarinense	99,9	Oeste catarinense	0,0
Sul catarinense/10 SRL	Sul catarinense	99,9	Oeste catarinense	0,0
Sul catarinense/17 Arm	Sudeste paranaense	38,6	Metropolitana de Curitiba	23,6
Sul catarinense/18 Arm	Norte catarinense	48,0	Vale do Itajai	31,6
Sul catarinense/19 Arm	Norte catarinense	95,6	Norte pioneiro paranaense	1,9
Sul catarinense/20 Arm	Norte catarinense	31,8	Norte pioneiro paranaense	20,7
Oeste catarinense/87 Xan	Norte pioneiro paranaense	45,8	Sudeste paranaense	23,4
Oeste catarinense/88 Xan	Norte pioneiro paranaense	49,1	Sudeste paranaense	25,1
Oeste catarinense/89 Xan	Norte pioneiro paranaense	45,8	Sudeste paranaense	23,4
Oeste catarinense/90 Xan	Sudoeste do Parana	35,7	Oeste catarinense	24,9
Oeste catarinense/57 HDO	Vale do Itajai	77,8	Oeste catarinense	10,9
Oeste catarinense/58 HDO	Vale do Itajai	53,1	Norte catarinense	27,6
Oeste catarinense/59 HDO	Metropolitana de Curitiba	46,9	Sudeste paranaense	32,3
Oeste catarinense/60 HDO	Oeste catarinense	47,1	Norte catarinense	45,2
Oeste catarinense/61 HDO	Sudoeste do Parana	33,0	Vale do Itajai	26,6
Oeste catarinense/62 Luz	Sudoeste do Parana	24,4	Vale do Itajai	19,3
Oeste catarinense/63 Luz	Norte catarinense	91,4	Vale do Itajai	4,2
Oeste catarinense/64 Luz	Vale do Itajai	42,8	Norte catarinense	38,6
Oeste catarinense/65 Luz	Oeste catarinense	83,9	Norte catarinense	7,2
Oeste catarinense/66 Luz	Vale do Itajai	63,1	Norte catarinense	30,6
Norte catarinense/31 JDS	Oeste catarinense	27,6	Norte catarinense	25,8
Norte catarinense/32 JDS	Norte catarinense	58,9	Vale do Itajai	17,9
Norte catarinense/33 JDS	Oeste catarinense	91,0	Norte catarinense	6,2
Norte catarinense/34 JDS	Vale do Itajai	74,5	Oeste catarinense	16,8
Norte catarinense/35 JDS	Vale do Itajai	68,4	Oeste catarinense	21,0
Norte catarinense/36 JDS	Oeste catarinense	68,2	Norte catarinense	19,1
Norte catarinense/37 JDS	Oeste catarinense	49,9	Norte catarinense	41,9
Norte catarinense/38 Gua	Oeste catarinense	32,0	Vale do Itajai	30,1
Norte catarinense/39 Gua	Vale do Itajai	54,6	Oeste catarinense	26,1

Continuação. Tabela 5: Atribuição das amostras de *Melipona quadrifasciata* em macrorregiões. As duas localidades com maior probabilidade de atribuição são mostradas.

Norte catarinense/40 Gua	Oeste catarinense	61,4	Norte catarinense	30,0
Norte catarinense/21 Maf	Norte catarinense	54,9	Sul catarinense	37,3
Norte catarinense/22 Maf	Norte catarinense	37,6	Vale do Itajai	34,1
Norte catarinense/23 Maf	Norte catarinense	58,9	Vale do Itajai	17,9
Norte catarinense/24 Maf	Norte catarinense	54,9	Sul catarinense	37,3
Norte catarinense/25 Maf	Sul catarinense	40,6	Metropolitana de Curitiba	40,4
Norte catarinense/26 Maf	Norte catarinense	30,5	Norte pioneiro paranaense	20,7
Norte catarinense/27 Maf	Norte pioneiro paranaense	41,1	Oeste catarinense	16,0
Norte catarinense/28 Maf	Vale do Itajai	72,3	Sul catarinense	14,7
Norte catarinense/29 Maf	Norte catarinense	30,5	Norte pioneiro paranaense	20,7
Norte catarinense/30 Maf	Metropolitana de Curitiba	57,0	Sul catarinense	29,3
Norte catarinense/11 RNe	Norte catarinense	68,7	Metropolitana de Curitiba	12,2
Norte catarinense/12 RNe	Metropolitana de Curitiba	31,9	Norte catarinense	24,4
Norte catarinense/13 RNe	Norte catarinense	30,5	Norte pioneiro paranaense	20,7
Norte catarinense/14 RNe	Norte pioneiro paranaense	41,1	Oeste catarinense	16,0
Norte catarinense/15 RNe	Norte catarinense	58,9	Vale do Itajai	17,9
Norte catarinense/16 RNe	Norte catarinense	30,5	Norte pioneiro paranaense	20,7
Norte catarinense/51 SBS	Oeste catarinense	21,9	Sudoeste do Parana	20,8
Norte catarinense/52 SBS	Norte catarinense	63,0	Oeste catarinense	31,7
Norte catarinense/53 SBS	Metropolitana de Curitiba	36,0	Sudeste paranaense	33,9
Norte catarinense/54 SBS	Norte pioneiro paranaense	47,4	Metropolitana de Curitiba	25,1
Norte catarinense/55 SBS	Sudoeste do Parana	94,0	Norte catarinense	4,2
Norte catarinense/56 SBS	Norte catarinense	59,9	Vale do Itajai	15,9
Norte catarinense/41 CAI	Norte catarinense	46,2	Vale do Itajai	32,0
Norte catarinense/42 CAI	Oeste catarinense	36,9	Vale do Itajai	34,7
Norte catarinense/43 CAI	Oeste catarinense	36,9	Vale do Itajai	34,7
Norte catarinense/44 CAI	Vale do Itajai	80,2	Oeste catarinense	10,7
Norte catarinense/45 CAI	Sul catarinense	29,4	Norte pioneiro paranaense	19,1
Norte catarinense/46 CAI	Sul catarinense	30,2	Oeste catarinense	24,5

Continuação. Tabela 5: Atribuição das amostras de *Melipona quadrifasciata* em macrorregiões. As duas localidades com maior probabilidade de atribuição são mostradas.

Norte catarinense/47 CAI	Norte catarinense	45,0	Oeste catarinense	40,3
Norte catarinense/48 CAI	Metropolitana de Curitiba	46,1	Sudeste paranaense	33,6
Norte catarinense/49 CAI	Metropolitana de Curitiba	57,5	Vale do Itajai	28,4
Norte catarinense/50 CAI	Oeste catarinense	82,8	Norte catarinense	14,3
Sudoeste do Parana/105 PBr	Metropolitana de Curitiba	70,1	Sudoeste do Parana	29,2
Sudoeste do Parana/106 PBr	Metropolitana de Curitiba	70,9	Sudeste paranaense	22,7
Sudoeste do Parana/107 PBr	Norte catarinense	46,7	Sudoeste do Parana	44,7
Sudoeste do Parana/108 PBr	Metropolitana de Curitiba	32,4	Oeste catarinense	30,7
Sudoeste do Parana/109 PBr	Sudeste paranaense	77,2	Metropolitana de Curitiba	8,9
Metropolitana de Curitiba/150 Cur	Norte pioneiro paranaense	44,2	Metropolitana de Curitiba	27,4
Metropolitana de Curitiba/151 Cur	Norte pioneiro paranaense	63,3	Sudeste paranaense	12,7
Metropolitana de Curitiba/152 Cur	Norte catarinense	48,2	Vale do Itajai	31,7
Metropolitana de Curitiba/153 Cur	Metropolitana de Curitiba	58,3	Sudoeste do Parana	16,1
Metropolitana de Curitiba/154 Cur	Sudeste paranaense	64,8	Vale do Itajai	16,8
Metropolitana de Curitiba/155 Cur	Sul catarinense	41,5	Sudeste paranaense	32,5
Metropolitana de Curitiba/156 Cur	Metropolitana de Curitiba	62,5	Norte pioneiro paranaense	18,1
Metropolitana de Curitiba/157 Cur	Metropolitana de Curitiba	58,3	Sudoeste do Parana	16,1
Metropolitana de Curitiba/158 Cur	Sudeste paranaense	35,1	Metropolitana de Curitiba	22,0
Metropolitana de Curitiba/159 Cur	Metropolitana de Curitiba	39,6	Sudoeste do Parana	14,8
Metropolitana de Curitiba/92 CMa	Oeste catarinense	22,9	Sudeste paranaense	22,9
Metropolitana de Curitiba/93 CMa	Sul catarinense	31,8	Oeste catarinense	18,8
Metropolitana de Curitiba/94 CMa	Sul catarinense	31,8	Oeste catarinense	18,8
Metropolitana de Curitiba/130 Man	Sudeste paranaense	87,3	Sudoeste do Parana	3,9
Metropolitana de Curitiba/131 Man	Norte pioneiro paranaense	58,8	Metropolitana de Curitiba	10,1
Metropolitana de Curitiba/132 Man	Sudoeste do Parana	24,1	Norte pioneiro paranaense	19,3
Metropolitana de Curitiba/133 Man	Sul catarinense	29,4	Norte catarinense	19,7
Metropolitana de Curitiba/134 Man	Sudoeste do Parana	34,7	Vale do Itajai	19,6
Metropolitana de Curitiba/135 Man	Sul catarinense	31,8	Oeste catarinense	18,8
Metropolitana de Curitiba/136 Man	Sudoeste do Parana	34,7	Vale do Itajai	19,6

Continuação. Tabela 5: Atribuição das amostras de *Melipona quadrifasciata* em macrorregiões. As duas localidades com maior probabilidade de atribuição são mostradas.

Metropolitana de Curitiba/137 Man	Sudeste paranaense	57,0	Vale do Itajai	30,8
Metropolitana de Curitiba/138 Man	Metropolitana de Curitiba	58,3	Sudoeste do Parana	16,1
Metropolitana de Curitiba/139 Man	Metropolitana de Curitiba	39,6	Sudoeste do Parana	14,8
Metropolitana de Curitiba/140 Qba	Sudeste paranaense	99,7	Sudoeste do Parana	0,1
Metropolitana de Curitiba/141 Qba	Sudeste paranaense	53,2	Metropolitana de Curitiba	30,5
Metropolitana de Curitiba/142 Qba	Sul catarinense	29,4	Norte catarinense	19,7
Metropolitana de Curitiba/143 Qba	Norte catarinense	39,8	Norte pioneiro paranaense	37,5
Metropolitana de Curitiba/144 Qba	Norte pioneiro paranaense	51,1	Metropolitana de Curitiba	20,4
Metropolitana de Curitiba/145 Qba	Vale do Itajai	40,2	Metropolitana de Curitiba	19,9
Metropolitana de Curitiba/146 Qba	Norte catarinense	50,2	Oeste catarinense	38,9
Metropolitana de Curitiba/147 Qba	Sudeste paranaense	35,1	Metropolitana de Curitiba	22,0
Metropolitana de Curitiba/148 Qba	Sul catarinense	85,4	Sudoeste do Parana	6,4
Metropolitana de Curitiba/149 Qba	Norte catarinense	48,3	Oeste catarinense	12,7
Metropolitana de Curitiba/95 Mor	Metropolitana de Curitiba	87,2	Sul catarinense	4,5
Metropolitana de Curitiba/96 Mor	Norte catarinense	62,6	Vale do Itajai	18,4
Metropolitana de Curitiba/97 Mor	Metropolitana de Curitiba	98,5	Norte catarinense	0,7
Metropolitana de Curitiba/98 Mor	Metropolitana de Curitiba	98,3	Norte catarinense	0,7
Metropolitana de Curitiba/99 Mor	Metropolitana de Curitiba	95,9	Vale do Itajai	1,5
Metropolitana de Curitiba/100 Mor	Metropolitana de Curitiba	94,4	Sudoeste do Parana	2,8
Metropolitana de Curitiba/101 Mor	Metropolitana de Curitiba	72,3	Sudoeste do Parana	10,5
Metropolitana de Curitiba/102 Mor	Sudoeste do Parana	65,5	Oeste catarinense	17,2
Metropolitana de Curitiba/103 Mor	Sudoeste do Parana	99,8	Metropolitana de Curitiba	0,2
Metropolitana de Curitiba/104 Mor	Norte pioneiro paranaense	38,1	Oeste catarinense	31,2
Norte pioneiro paranaense/120 SAP	Metropolitana de Curitiba	32,7	Oeste catarinense	24,9
Norte pioneiro paranaense/121 SAP	Norte pioneiro paranaense	91,3	Sudeste paranaense	3,8
Norte pioneiro paranaense/122 SAP	Norte pioneiro paranaense	96,0	Oeste catarinense	1,4
Norte pioneiro paranaense/123 SAP	Oeste catarinense	26,8	Sudeste paranaense	26,8
Norte pioneiro paranaense/124 SAP	Sudoeste do Parana	54,2	Metropolitana de Curitiba	21,1
Norte pioneiro paranaense/125 Cam	Norte pioneiro paranaense	72,5	Sudeste paranaense	9,8

Continuação. Tabela 5: Atribuição das amostras de *Melipona quadrifasciata* em macrorregiões. As duas localidades com maior probabilidade de atribuição são mostradas.

Norte pioneiro paranaense/126 Cam	Norte pioneiro paranaense	73,5	Sudeste paranaense	10,3
Norte pioneiro paranaense/127 Cam	Oeste catarinense	35,0	Sudeste paranaense	31,1
Norte pioneiro paranaense/128 Cam	Norte pioneiro paranaense	86,8	Sudeste paranaense	4,6
Norte pioneiro paranaense/129 Cam	Norte pioneiro paranaense	91,8	Sul catarinense	3,6
Sudeste paranaense/110 Pru	Metropolitana de Curitiba	59,3	Sudeste paranaense	35,8
Sudeste paranaense/111 Pru	Sudeste paranaense	81,0	Norte pioneiro paranaense	8,3
Sudeste paranaense/112 Pru	Metropolitana de Curitiba	32,6	Norte pioneiro paranaense	24,3
Sudeste paranaense/113 Pru	Norte pioneiro paranaense	82,7	Oeste catarinense	6,7
Sudeste paranaense/114 Pru	Sudeste paranaense	94,3	Metropolitana de Curitiba	4,8
Sudeste paranaense/115 Pru	Metropolitana de Curitiba	83,1	Sudoeste do Parana	10,1
Sudeste paranaense/116 Pru	Metropolitana de Curitiba	94,7	Sudoeste do Parana	3,5
Sudeste paranaense/117 Pru	Oeste catarinense	61,3	Sudoeste do Parana	30,7
Sudeste paranaense/118 Pru	Sudeste paranaense	95,3	Metropolitana de Curitiba	2,0
Sudeste paranaense/119 Pru	Sudeste paranaense	93,8	Metropolitana de Curitiba	5,3

Tabela 6: Teste de exclusão de atribuição de origem de cada uma das amostras de *Melipona quadrifasciata* contra cada uma das macrorregiões. Origens excluídas ($p < 0,001$) em cinza. *** Migrante de primeira geração, assim como a localidade provável de origem.

Atribuição da amostra	Vale do Itajai	Sul catarinense	Oeste catarinense	Norte catarinense	Sudoeste do Paraná	Metropolitana de Curitiba	Norte pioneiro paranaense	Sudeste paranaense
Vale do Itajai/77 Blu	0,0095	0,0095	0,0048	0,0129	0,0031	0,1192	0,0168	0
Vale do Itajai/78 Blu	0,9207	0,7106	0,9996	10000	0,4993	10000	0,6307	0,3164
Vale do Itajai/79 Blu	0,9926	0,6372	0,9995	0,9972	0,6053	10000	0,2736	0,2474
Vale do Itajai/80 Blu	0,919	0,7261	0,999	10000	0,5102	10000	0,6329	0,3148
Vale do Itajai/81 Blu	0,9727	0,2415	0,9973	0,8391	10000	10000	0,9998	10000
Vale do Itajai/82 Blu	0,4587	0,3833	0,8443	0,9216	0,2983	0,9951	0,2836	0,1364
Vale do Itajai/83 Blu	10000	0,2364	0,9999	0,9835	0,616	10000	0,4164	0,2474

Continuação. Tabela 6: Teste de exclusão de atribuição de origem de cada uma das amostras de *Melipona quadrifasciata* contra cada uma das macrorregiões. Origens excluídas ($p < 0,001$) em cinza. *** Migrante de primeira geração, assim como a localidade provável de origem.

Vale do Itajai/84 Blu	0,943	0,6672	0,9772	10000	0,3719	10000	0,2007	0,1504
Vale do Itajai/85 Blu	0,9988	0,1115	0,9968	0,9077	0,616	0,9993	0,0524	0,105
Vale do Itajai/86 Blu	10000	0,2364	0,9999	0,9835	0,616	10000	0,4164	0,2474
Vale do Itajai/67 RDS	0,9989	0,1115	0,9968	0,9077	0,616	0,9993	0,0524	0,105
Vale do Itajai/68 RDS	0,9815	0,1115	0,9241	0,6759	0,1725	0,9835	0,0143	0,2048
Vale do Itajai/69 RDS	0,7231	0,0445	0,6168	0,48	0,0513	0,9461	0,0246	0,0998
Vale do Itajai/70 Aur ***	0,8556	0,1994	0,9999 ***	0,9679	0,4846	0,9994	0,2089	0,2654
Vale do Itajai/71 Aur	10000	0,2486	0,9997	0,961	0,3025	0,9579	0,0152	0,0235
Vale do Itajai/72 Aur	0,7175	0,0063	0,368	0,3565	0,0193	0,8167	0,0021	0,0969
Vale do Itajai/73 Aur	0,1029	0,0342	0,0564	0,2272	0,0272	0,6689	0,0012	0,0039
Vale do Itajai/74 Aur	0,6045	0,2501	0,483	0,8882	0,1456	0,9993	0,142	0,1584
Vale do Itajai/75 Aur	0,5104	0,1118	0,3291	0,6116	0,1507	0,9251	0,0064	0,0448
Vale do Itajai/76 Aur	0,4687	0,2439	0,4811	0,6947	0,1471	0,9696	0,1275	0,0316
Sul catarinense/1 SRL	0,1209	0,1526	0,1044	0,1008	0,4432	0,2705	0,2933	0,4457
Sul catarinense/2 SRL	0,3088	0,9509	0,6231	0,4832	0,2311	0,915	0,1294	0,1175
Sul catarinense/3 SRL	0,2791	0,9918	0,6159	0,5431	0,1828	0,9506	0,2998	0,1428
Sul catarinense/4 SRL	0,1971	0,7974	0,4912	0,4709	0,1198	0,9255	0,2098	0,0947
Sul catarinense/5 SRL	0	0,0119	3	0,0317	0,067	0,4223	0,0061	0,0194
Sul catarinense/6 SRL	5	0,1534	0,0144	0,0203	0,1828	0,8112	0,2998	0,8859
Sul catarinense/7 SRL	7	0,1267	0,0149	0,0127	0,2311	0,2398	0,1294	0,1175
Sul catarinense/8 SRL	0,2791	0,991	0,6159	0,5431	0,1828	0,9506	0,2998	0,1428
Sul catarinense/9 SRL	0,2791	0,9894	0,6159	0,5431	0,1828	0,9506	0,2998	0,1428
Sul catarinense/10 SRL	0,2791	0,9934	0,6159	0,5431	0,1828	0,9506	0,2998	0,1428
Sul catarinense/17 Arm ***	0,0345	0,0084	0,9811	0,913	0,7694	10000	0,8017	0,8801 ***
Sul catarinense/18 Arm	0,934	0,6301	0,9991	10000	0,5051	10000	0,6239	0,3148
Sul catarinense/19 Arm ***	0,1347	0,0486	0,5578	0,9303***	0,524	0,9414	0,7256	0,4634
Sul catarinense/20 Arm ***	0,9996	0,3667	10000	10000***	0,9983	10000	10000	10000
Oeste catarinense/87 Xan	0,001	0,02	0,8584	0,6452	0,9941	10000	10000	10000

Continuação. Tabela 6: Teste de exclusão de atribuição de origem de cada uma das amostras de *Melipona quadrifasciata* contra cada uma das macrorregiões. Origens excluídas ($p < 0,001$) em cinza. *** Migrante de primeira geração, assim como a localidade provável de origem.

Oeste catarinense/88 Xan	5	0,0117	0,7728	0,5448	0,7443	0,8786	0,9475	0,7008
Oeste catarinense/89 Xan	8	0,0214	0,8592	0,646	0,9946	10000	10000	10000
Oeste catarinense/90 Xan	0,001	0,0149	0,2532	0,1882	0,8261	0,9461	0,8294	0,7275
Oeste catarinense/57 HDO	0,6036	0,4189	0,707	0,7508	0,3771	0,9922	0,0179	0,0967
Oeste catarinense/58 HDO	0,9939	0,6402	0,9989	0,9976	0,5968	10000	0,2667	0,2467
Oeste catarinense/59 HDO ***	0,0096	0,3175	0,0801	0,8461	0,9978	10000***	10000	10000
Oeste catarinense/60 HDO	0,1109	0,1908	0,9729	0,9296	0,6303	10000	0,8687	0,7167
Oeste catarinense/61 HDO	0,5163	0,1573	0,3178	0,3117	0,9997	0,9692	0,7533	0,9997
Oeste catarinense/62 Luz	0,9524	0,0056	0,6686	0,7157	0,9714	0,9941	0,9908	0,9768
Oeste catarinense/63 Luz	0,5299	0,0938	0,8701	0,9421	0,0796	0,9581	0,0643	0,0391
Oeste catarinense/64 Luz	10000	0,721	10000	0,9978	0,4542	10000	0,2512	0,3209
Oeste catarinense/65 Luz	0,4585	0,1074	0,9999	0,8414	0,71	0,9996	0,4669	0,5012
Oeste catarinense/66 Luz	0,9911	0,1994	0,9951	0,9679	0,4846	0,9994	0,2089	0,2654
Norte catarinense/31 JDS	10000	0,3628	10000	0,9943	0,9995	10000	10000	10000
Norte catarinense/32 JDS	10000	0,7927	10000	10000	0,524	10000	0,7256	0,4634
Norte catarinense/33 JDS	0,0835	0,0869	0,8534	0,681	0,6349	0,975	0,1553	0,2708
Norte catarinense/34 JDS	0,6039	0,4251	0,7658	0,7314	0,3834	0,9915	0,0214	0,0953
Norte catarinense/35 JDS	0,7257	0,4241	0,921	0,8986	0,5131	0,9953	0,0738	0,1216
Norte catarinense/36 JDS	0,6632	0,1135	0,986	0,7836	0,1046	0,9573	0,0055	0,0291
Norte catarinense/37 JDS	0,7915	0,1938	0,9976	0,9438	0,1277	0,9966	0,0267	0,0577
Norte catarinense/38 Gua	0,8018	0,2364	0,9812	0,8748	0,1725	0,9996	0,1727	0,0902
Norte catarinense/39 Gua	0,4384	0,2945	0,826	0,8817	0,2983	0,9928	0,1783	0,1098
Norte catarinense/40 Gua	0,0297	0,1856	0,9048	0,7943	0,4247	10000	0,6167	0,6414
Norte catarinense/21 Maf	0,1347	0,381	0,5578	0,8553	0,524	0,9414	0,7256	0,4634
Norte catarinense/22 Maf	10000	0,7307	10000	10000	0,5889	10000	0,434	0,3925
Norte catarinense/23 Maf	10000	0,7927	10000	10000	0,524	10000	0,7256	0,4634
Norte catarinense/24 Maf	0,1347	0,381	0,5578	0,8474	0,524	0,9414	0,7256	0,4634
Norte catarinense/25 Maf	0,5395	0,5257	0,9204	0,8405	0,2639	10000	0,3879	0,1985

Continuação. Tabela 6: Teste de exclusão de atribuição de origem de cada uma das amostras de *Melipona quadrifasciata* contra cada uma das macrorregiões. Origens excluídas ($p < 0,001$) em cinza. *** Migrante de primeira geração, assim como a localidade provável de origem.

Norte catarinense/26 Maf	10000	0,416	10000	10000	0,9968	10000	10000	10000
Norte catarinense/27 Maf	0,1347	0,0628	0,5578	0,4856	0,524	0,9414	0,7256	0,4634
Norte catarinense/28 Maf	0,9742	0,3678	0,9466	0,85	0,0349	0,8507	0,0196	0,0382
Norte catarinense/29 Maf	10000	0,4199	10000	10000	0,9972	10000	10000	10000
Norte catarinense/30 Maf	0,5395	0,5257	0,9204	0,8421	0,2639	10000	0,3879	0,1985
Norte catarinense/11 RNe	0,4495	0,0474	0,7938	0,8449	0,0748	0,9949	0,0294	0,0222
Norte catarinense/12 RNe	0,3303	0	0,3744	0,4551	0,0457	0,1496	0,0093	0,0081
Norte catarinense/13 RNe	10000	0,4061	10000	10000	0,9967	10000	10000	10000
Norte catarinense/14 RNe	0,0444	0,0227	0,2643	0,2895	0,2639	0,8056	0,3879	0,1985
Norte catarinense/15 RNe	10000	0,7927	10000	10000	0,524	10000	0,7256	0,4634
Norte catarinense/16 RNe	10000	0,419	10000	10000	0,9974	10000	10000	10000
Norte catarinense/51 SBS	0,9544	0,0066	0,9843	0,6405	0,9692	0,9951	0,9879	0,9803
Norte catarinense/52 SBS	0,7463	0,2347	0,9989	0,9702	0,0978	0,9996	0,0831	0,0691
Norte catarinense/53 SBS	3	0,2065	0,623	0,592	0,9989	10000	10000	10000
Norte catarinense/54 SBS	0,0444	0,1228	0,9985	0,6626	0,9941	10000	10000	10000
Norte catarinense/55 SBS	0,0071	0,0501	0,0819	0,562	0,9982	0,899	0,631	0,3072
Norte catarinense/56 SBS	0,0163	0,0886	0,0693	0,4116	0,5435	0,7765	0,0034	0,0111
Norte catarinense/41 CAI	0,9387	0,7065	0,9984	10000	0,5051	10000	0,6216	0,3162
Norte catarinense/42 CAI	0,9837	0,2364	0,9999	0,9727	0,4225	0,9999	0,4164	0,3074
Norte catarinense/43 CAI	0,9837	0,2364	0,9999	0,9718	0,4225	0,9999	0,4164	0,3074
Norte catarinense/44 CAI	10000	0,1906	0,9979	0,9318	0,5404	10000	0,1025	0,1712
Norte catarinense/45 CAI	10000	0,9715	10000	10000	0,6357	0,9719	0,972	0,8758
Norte catarinense/46 CAI	0,7132	0,3021	0,9693	0,8182	0,0314	0,8245	0,0119	0,007
Norte catarinense/47 CAI	0,7669	0,0359	0,9996	0,828	0,6197	0,9982	0,9701	0,9421
Norte catarinense/48 CAI	0	0,3255	0,3676	0,432	0,9973	10000	0,9999	10000
Norte catarinense/49 CAI	0,7488	0,0397	0,8838	0,7603	0,2531	10000	0,2158	0,0456
Norte catarinense/50 CAI	0,0015	0,0712	0,5386	0,4233	0,2466	0,9601	0,2567	0,2074
Sudoeste do Parana/105 PBR	0,013	0	0,0243	0,0141	0,3703	0,9565	0,0022	0,0475

Continuação. Tabela 6: Teste de exclusão de atribuição de origem de cada uma das amostras de *Melipona quadrifasciata* contra cada uma das macrorregiões. Origens excluídas ($p < 0,001$) em cinza. *** Migrante de primeira geração, assim como a localidade provável de origem.

Sudoeste do Parana/106 PBR	0,0364	1	0,5461	0,3557	0,2546	0,9341	0,1047	0,2575
Sudoeste do Parana/107 PBR	0,1207	0,0022	0,2629	0,6295	0,2833	0,2055	0,0158	0,0225
Sudoeste do Parana/108 PBR	0,1179	0,0017	0,9901	0,4596	0,284	0,9672	0,5484	0,3762
Sudoeste do Parana/109 PBR ***	0,0089	0,0388	0,7936	0,4751	0,0043	0,8139	0,1357	0,5172***
Metropolitana de Curitiba/150 Cur	0,1352	0,0052	0,9933	0,6134	0,9968	10000	10000	0,9978
Metropolitana de Curitiba/151 Cur	0	0,0527	0,6629	0,2916	0,996	10000	10000	10000
Metropolitana de Curitiba/152 Cur	0,9266	0,7083	0,9987	10000	0,5045	10000	0,6255	0,3029
Metropolitana de Curitiba/153 Cur	0,1097	0,0608	0,9087	0,7758	0,8471	10000	0,5207	0,5502
Metropolitana de Curitiba/154 Cur	0,9981	0,0208	0,8747	0,498	0,1285	0,4867	0,2521	0,7922
Metropolitana de Curitiba/155 Cur	0,0017	0,045	0,0199	0,0908	0,032	0,2367	0,0051	0,0544
Metropolitana de Curitiba/156 Cur	0,6127	0	0,6252	0,5249	0,1793	0,5135	0,308	0,0338
Metropolitana de Curitiba/157 Cur	0,1131	0,0572	0,913	0,7688	0,8512	10000	0,5053	0,5624
Metropolitana de Curitiba/158 Cur	0,107	0,463	0,9826	0,923	0,7516	0,9994	0,8529	0,9125
Metropolitana de Curitiba/159 Cur	0,9996	0,0212	0,9994	0,7666	0,8409	0,97	0,5949	0,3539
Metropolitana de Curitiba/92 CMa	0,9643	0,0214	0,9995	0,7424	0,4279	0,4077	0,6074	0,4851
Metropolitana de Curitiba/93 CMa	10000	0,6372	10000	0,9814	0,7731	0,6918	0,63	0,7089
Metropolitana de Curitiba/94 CMa	10000	0,6419	10000	0,966	0,7799	0,7023	0,6374	0,719
Metropolitana de Curitiba/130 Man	0,0581	0,0632	0,5454	0,589	0,4118	0,701	0,1323	0,5219
Metropolitana de Curitiba/131 Man	0,181	0	0,246	0,2109	0,0139	0,0582	0,0912	0,0048
Metropolitana de Curitiba/132 Man	0,4063	0	0,6562	0,4575	0,1117	0,1102	0,1219	0,0425
Metropolitana de Curitiba/133 Man	10000	0,9592	10000	10000	0,6265	0,9704	0,9714	0,8663
Metropolitana de Curitiba/134 Man	10000	0,0089	0,9996	0,7396	0,9538	0,6903	0,2993	0,2811
Metropolitana de Curitiba/135 Man	10000	0,6379	10000	0,974	0,7785	0,7002	0,6288	0,7302
Metropolitana de Curitiba/136 Man	10000	0,0081	0,9998	0,7364	0,9574	0,6963	0,2961	0,2774
Metropolitana de Curitiba/137 Man	0,9995	0,0102	0,8829	0,4724	0,1581	0,3234	0,0937	0,6325
Metropolitana de Curitiba/138 Man	0,1105	0,0622	0,914	0,7783	0,8419	10000	0,5151	0,5495
Metropolitana de Curitiba/139 Man	0,9997	0,0199	0,9989	0,7737	0,8357	0,9658	0,5966	0,3497
Metropolitana de Curitiba/140 Qba	0,0012	0	0,0145	0,0177	0,0128	0,0505	0,0035	0,1401

Continuação. Tabela 6: Teste de exclusão de atribuição de origem de cada uma das amostras de *Melipona quadrifasciata* contra cada uma das macrorregiões. Origens excluídas ($p < 0,001$) em cinza. *** Migrante de primeira geração, assim como a localidade provável de origem.

Metropolitana de Curitiba/141 Qba	0,0371	0,0046	0,0887	0,0947	0,0829	0,3745	0,0145	0,0653
Metropolitana de Curitiba/142 Qba	0,9998	0,9611	10000	10000	0,6269	0,9621	0,9693	0,8705
Metropolitana de Curitiba/143 Qba	0,1826	0	0,2564	0,4695	0,0129	0,0561	0,099	0,0056
Metropolitana de Curitiba/144 Qba	0,6036	0,0252	0,819	0,7073	0,1422	0,4999	0,6479	0,1291
Metropolitana de Curitiba/145 Qba	0,9722	0	0,6387	0,5172	0,1832	0,3434	0,1358	0,1691
Metropolitana de Curitiba/146 Qba	0,6768	0,0205	0,9992	0,7906	0,1265	0,1629	0,2521	0,0991
Metropolitana de Curitiba/147 Qba	0,1129	0,4558	0,9862	0,9175	0,7526	10000	0,8622	0,9103
Metropolitana de Curitiba/148 Qba	0,0696	0,1237	0,2701	0,4539	0,1626	0,0678	0,0105	0,0259
Metropolitana de Curitiba/149 Qba	0,6706	0,0214	0,8688	0,7148	0,1312	0,15	0,25	0,1051
Metropolitana de Curitiba/95 Mor	0,0701	0,2399	0,2438	0,5015	0,3021	0,99	0,0137	0,0292
Metropolitana de Curitiba/96 Mor	0,6466	0,0158	0,8026	0,9001	0,0354	0,8238	0,0017	0,0016
Metropolitana de Curitiba/97 Mor	0,1233	0,0012	0,2568	0,4789	0,3389	10000	0,0096	0,0419
Metropolitana de Curitiba/98 Mor	0,1029	2	0,1782	0,3615	0,083	0,8816	4	0,0025
Metropolitana de Curitiba/99 Mor	0,5409	0,0301	0,8037	0,6951	0,8001	10000	0,1762	0,3121
Metropolitana de Curitiba/100 Mor	0,4115	0,0025	0,5454	0,4207	0,7619	10000	0,0418	0,1214
Metropolitana de Curitiba/101 Mor	0,0119	0	0,6648	0,4182	0,7619	10000	0,7912	0,4296
Metropolitana de Curitiba/102 Mor	0,0197	0	0,9053	0,3403	0,7534	0,4559	0,3184	0,1784
Metropolitana de Curitiba/103 Mor	0,0282	0	0,0543	0,0432	0,9961	0,9395	0,0133	0,0988
Metropolitana de Curitiba/104 Mor	0,15	0,0456	0,9993	0,741	0,9961	10000	10000	0,9999
Norte pioneiro paranaense/120 SAP	0,0036	0,0016	0,8801	0,5975	0,6954	0,9993	0,8935	0,9096
Norte pioneiro paranaense/121 SAP	0,0128	4	0,8484	0,3453	0,3652	0,3694	0,7639	0,2262
Norte pioneiro paranaense/122 SAP	0,0057	0	0,2658	0,033	0,097	0,0891	0,3054	0,0346
Norte pioneiro paranaense/123 SAP	0,9606	0,0227	0,9996	0,75	0,4238	0,4813	0,2371	0,4967
Norte pioneiro paranaense/124 SAP	0,0494	0,003	0,3704	0,315	0,4715	0,6653	0,0393	0,1434
Norte pioneiro paranaense/125 Cam	0,1032	0,0667	0,9985	0,7284	0,7477	0,9964	0,9998	0,8037
Norte pioneiro paranaense/126 Cam	0,0308	0,0665	0,9919	0,5398	0,5876	0,995	0,9697	0,7546
Norte pioneiro paranaense/127 Cam	0,0339	0,0414	0,9939	0,4388	0,6787	0,9556	0,3435	0,6241
Norte pioneiro paranaense/128 Cam	0,0341	0,1268	0,6578	0,5932	0,3148	0,6987	0,7358	0,2197

Continuação. Tabela 6: Teste de exclusão de atribuição de origem de cada uma das amostras de *Melipona quadrifasciata* contra cada uma das macrorregiões. Origens excluídas ($p < 0,001$) em cinza. *** Migrante de primeira geração, assim como a localidade provável de origem.

Norte pioneiro paranaense/129 Cam	0,0359	0,0147	0,1806	0,2043	0,0582	0,1304	0,1997	0,0218
Sudeste paranaense/110 Pru	0,1048	0,0575	0,7013	0,5498	0,7331	10000	0,8656	10000
Sudeste paranaense/111 Pru	0,0275	3	0,864	0,3234	0,2987	0,7616	0,3576	0,6226
Sudeste paranaense/112 Pru	0,1108	0,4676	0,9848	0,9165	0,7536	10000	0,8424	0,8589
Sudeste paranaense/113 Pru	0,1111	0,0654	0,9988	0,7304	0,7559	0,9962	0,9969	0,6356
Sudeste paranaense/114 Pru	0,0289	0,0504	0,1797	0,1179	0,0926	0,7486	0,0102	0,6069
Sudeste paranaense/115 Pru	0,0127	0,0062	0,0892	0,0782	0,2193	0,7433	0,0127	0,0513
Sudeste paranaense/116 Pru ***	0,0394	0,0028	0,0925	0,0766	0,1004	0,7031***	0,0023	0,0049
Sudeste paranaense/117 Pru	0,0104	0	0,9643	0,3389	0,5805	0,2974	0,1503	0,1332
Sudeste paranaense/118 Pru	0,0099	0	0,2832	0,1129	0,0702	0,4186	0,0593	0,2977
Sudeste paranaense/119 Pru	0,0519	0,0023	0,1379	0,1519	0,0999	0,5575	0,0104	0,3079

Tabela 7: Haplótipos encontrados e frequência em populações de *Melipona quadrifasciata*. As amostras estão identificadas pelo número e pela sigla da localidade, conforme tabela 1.

Haplótipo	Freq%	Amostras
H1	27,16	51.SBS; 30.Maf; 39.Gua; 44.CAl; 73.Aur; 75.Aur; 80.Blu; 100.Mor; 131.Man; 132.Man; 140.QBa; 141.QBa; 142.QBa; 143.QBa; 145.QBa; 147.QBa; 148.QBa; 149.QBa; 150.Cur; 153.Cur; 154.Cur; 155.Cur
H2	25,92	1.SRL; 2.SRL; 3.SRL; 4.SRL; 6.SRL; 7.SRL; 17.Arm; 19.Arm; 11.RNe; 34.JDS; 58.HDO; 72.Aur; 87.Xan; 88.Xan; 90.Xan; 96.Mor; 97.Mor; 99.Mor; 102.Mor; 103.Mor; 130.Man
H3	4,93	151.Cur; 157.Cur; 158.Cur; 159.Cur
H4 *	4,93	113.Pru; 114.Pru; 115.Pru; 118.Pru
H5	3,7	104.Mor; 112.Pru; 116.Pru
H6	3,7	135.Man; 93.CMa; 94.CMa
H7	2,46	18.Arm; 156.Cur
H8 *	2,46	21.Maf; 22.Maf
H9	2,46	45.CAl; 133.Man
H10	2,46	50.CAl; 69.RDS
H11	2,46	57.HDO; 152.Cur
H12*	2,46	62.Luz; 66.Luz
H13 *	2,46	77.Blu; 78.Blu
H14 *	1,23	27.Maf
H15 *	1,23	36.JDS
H16 *	1,23	42.Cal
H17 *	1,23	59.HDO
H18 *	1,23	63.Luz
H19 *	1,23	65.Luz
H20 *	1,23	119.Pru
H21 *	1,23	134.Man
H22 *	1,23	136.Man
H23 *	1,23	138.Man

* Haplótipos exclusivos.

9. ANEXO

Artigo “Beekeeping practices affect the population structure of *Melipona quadrifasciata* (Apidae, Meliponini) in southern Brazil” submetido na revista “Biological Journal of the Linnean Society” em 17 de Janeiro de 2019.

Beekeeping practices affect the population structure of *Melipona quadrifasciata* (Apidae, Meliponini) in southern Brazil

Journal:	<i>Biological Journal of the Linnean Society</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	koser, jaqueline; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto, Genética; Francoy, Tiago; Universidade de Sao Paulo Escola de Artes Ciencias e Humanidades
Keywords:	Conservation, Genetic diversity, Management Units, Population structure, Stingless bees

SCHOLARONE™
Manuscripts

Abstract

Social stingless bees management practices include artificial colony division/multiplication and nest transport. We evaluated the effects of common management practices on the genetic diversity of *Melipona quadrifasciata* within its native range in southern Brazil. The hypotheses are: Genetic diversity in meliponaries reflects natural variation and population genetic structuring; Migrant nests can be identified; Meliponaries in which colonies are artificially divided suffer from inbreeding. We employed microsatellite and mitochondrial DNA markers to test these hypotheses. The genetic diversity in our sample was heterogeneously distributed. We observed that meliponaries subjected to intensive colony multiplication exhibited signs of inbreeding. We also found introduced haplotypes, which affected local diversity and resulted in the homogenization of allele frequencies in various regions. Although no genetic structuring was observed, a clinal genetic differentiation was found based on microsatellite markers. The mtDNA analyses showed the introduction of haplotypes from the southeastern region of the country. Population differentiation and isolation by distance could not be used to effectively delimit management units based on natural gene flow. We suggest that efforts to preserve genetic diversity should focus on regulating management practices, allowing gene flow via natural vegetation fragments, and that diversity management should focus on local regions.

Keywords: Conservation - Genetic diversity - Management Units - Population structure - Stingless bees.

Introduction

Social stingless bees are an important part of the sociocultural history in the Americas; these native bees have been managed since the pre-European civilization era (Palazuelos Ballivián, 2008; Negrín Muñoz, 2016). It is estimated that approximately 5,000 stingless bee beekeepers are registered in Brazil alone (Velthuis, Koedam, & Imperatriz-Fonseca, 2005; Gehrke, 2010; Jaffé *et al.*, 2015; Barbiéri, 2018).

Among the different management practices, two non-mutually exclusive activities drive genetic diversity in meliponaries: colony multiplication and transport of colonies. Consequently, though the people who keep these bees generally avoid using wild colonies, except for rescuing them when they are threatened by development of natural areas, the ecological role of meliponaries remains controversial. There currently is no consensus regarding whether the artificial maintenance of bees reduces local genetic diversity, or whether it could help sustain or even increase genetic diversity (Harpur *et al.*, 2012; De La Rúa *et al.*, 2013). In stingless bees, nest transport has been responsible for the production of hybrids, including bees belonging to the genera *Melipona* (Nogueira *et al.*, 2014) and *Tetragonisca* (Francisco *et al.*, 2014). However, it has been reported that nest transport also helps maintain and even increases the genetic diversity

of local populations of *Apis mellifera* (Chapman, Lim, & Oldroyd, 2008; Delaney *et al.*, 2009; Oxley & Oldroyd, 2009; Harpur *et al.*, 2012).

Selecting certain traits for reproduction can result in the loss of genetic lineages that possess unique or rare alleles and local adaptation traits (Jensen *et al.*, 2005; De La Rúa *et al.*, 2009; Crispo *et al.*, 2011; Oleksa *et al.*, 2011). Some studies have suggested that domestication is one of the causes of low genetic diversity in honey bees, and that it may also be partly responsible for overall bee population decline (Schiff, Sheppard, & Loper, 1994; Schiff & Sheppard, 1996; Oldroyd, 2007; vanEngelsdorp *et al.*, 2009, 2010; Jaffé *et al.*, 2010; Meixner *et al.*, 2010; Potts *et al.*, 2010; vanEngelsdorp & Meixner, 2010). Studies that compare managed stingless bees to feral populations have confirmed this disturbance in genetic constitution due to management practices (Carvalho-Zilse & Kerr, 2006; Costa Pinto, 2007; Francini *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2014; Santiago *et al.*, 2016).

Moreover, there are major concerns for Hymenoptera regarding genetic diversity and sexual alleles (*complementary sex determiner gene* – *CSD*) loss due to inbreeding. Inbreeding reduces heterozygosity and the number of rare alleles that remain from generation to generation (Witzenberger & Hochkirch, 2011; Price & Hadfield, 2014; Willoughby *et al.*, 2015), which makes haplodiploid organisms more vulnerable to extinction than other organisms (Hasselmann & Beye, 2004; Zayed, 2004; Zayed & Packer, 2005; Delaney *et al.*, 2009). Though there is still no direct way to monitor *CSD* alleles in stingless bees, an investigation of the genetic variability of artificial and feral populations can be used as a signal of ecosystem and pollination services health (Carvalho, 2001; Zayed, 2004, 2009; Zayed, Roubik, & Packer, 2004; Zayed & Packer, 2005; Carvalho-Zilse *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2011; Francini, Nunes-Silva, & Carvalho-Zilse, 2012; Boff *et al.*, 2014).

The maintenance of natural diversity in man-managed colonies should be a priority for beekeepers in order to ensure population survival and preserve rare and restricted single-site genotypes that can harbor traits molded by natural selection (De La Rúa *et al.*, 2009; Tarpy, Vanengelsdorp, & Pettis, 2013). One solution to monitor feral and commercial genetic diversity is to delimit management units. It is recommended that species management planning be made at the lowest practicable level (Linnell, 2005) and that it respect the natural species gene flow (Palsbøll, Bérubé, & Allendorf, 2007; Wasser *et al.*, 2008; Ogden, Dawnay, & McEwing, 2009; Alacs *et al.*, 2010; López-Uribe, Soro, & Jha, 2017).

The stingless bee *Melipona (Melipona) quadrifasciata* Lepeletier, 1836 is one of the most widely cultivated bees in Brazil (Gehrke, 2010; Barbiéri, 2018). It is especially valuable for the pollination of crops such as tomato, pumpkin, pitanga, coffee, acai and guava (del Sarto, Peruquetti, & Campos, 2005; Bispo dos Santos *et al.*, 2009; Giannini *et al.*, 2015) and apples, in association with *A. mellifera* (Viana *et al.*, 2014); this species also produces honey and propolis (Mercês *et al.*, 2013; Giannini *et al.*, 2015).

Traditionally, *M. quadrifasciata* is divided into two subspecies based on the pattern of its metassomal stripes. There is strong population structuring and a low degree of sharing of mitochondrial haplotypes between *M. quadrifasciata quadrifasciata* (Lepetier) (MQQ) and *M. quadrifasciata antidioides* (Lepetier) (MQA) (Batalha-Filho *et al.*, 2010). *M. quadrifasciata antidioides* occurs from northern São Paulo state to the Brazilian northeast. It can be identified by its interrupted stripes in the 2nd through the 5th metassomal segments (Schwarz, 1948). *M. quadrifasciata quadrifasciata*, characterized by continuous stripes, is found in the colder regions of Brazil. In Minas Gerais and São Paulo states, there is a hybrid region where individuals with an intermediate pattern can be found (Kerr, 1976; Page & Kerr, 1990; Silveira *et al.*, 2002; Camargo & Pedro, 2013; Tavares *et al.*, 2013). *Melipona quadrifasciata* is considered to be endangered in Rio Grande do Sul, the southernmost state in Brazil (Marques *et al.*, 2003; Rio Grande do Sul, 2014).

Nest losses of this species have occurred due to new pathogens (Díaz *et al.*, 2017), and threats to the species include agrochemicals (Seide *et al.*, 2018), climate change (Teixeira, Silveira, & Harter-Marques, 2018) and, as for other bees, habitat loss due to deforestation (Araujo *et al.*, 2016).

Considering these factors, we propose the following hypotheses: 1) Meliponaries reflect genetic diversity in the feral gene pool and the population structure of the local geographic region; 2) Migrant colonies can be identified; 3) Meliponaries in which colony multiplication occurs suffer from inbreeding. It is expected that the data will be helpful for the development of a management plan for *M. quadrifasciata* in southern Brazil, using a man-controlled gene pool as an ally in conservation restoration projects.

Materials and Methods

Samples, DNA extraction

For this research, 42 meliponaries were visited, located in nine municipalities throughout Paraná state and 15 municipalities throughout Santa Catarina state (Figure 1, Table 1). A total of 159 workers (one per nest) were collected. The individual history of each meliponary and nest was also recorded, when known. Bees were preserved in 96% ethanol, and one leg was used for DNA extraction with Chelex® 100 (Walsh, Metzger, & Higuchi, 2013).

All individuals were genotyped at five nuclear microsatellite loci: Mqua4, Mqua6, Mqua7, Mqua19 and Mqua20. PCR components and conditions were as indicated by Tavares *et al.* (2013), and DNA was subsequently tagged with fluorochrome following the M13 guideline (Schuelke, 2000).

The cytochrome oxidase I (COI) gene was partially amplified from 89 individuals from 14 collection sites. The COI mitochondrial gene was amplified by PCR using the primers COX2 and COX4, in accordance with Batalha-Filho *et al.* (2010). We purified

the PCR products using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), and then submitted them to sequencing using the same primers.

The automatic sequencer ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) at Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' (Jaboticabal, São Paulo, Brazil) was used to analyze STRs and for MtCOI sequencing. The program *Geneious* 7.1.3 (Kearse *et al.*, 2012) was used to check for scoring errors in STRs, in addition to DNA alignment and edition. All new COI sequences were deposited in GenBank (MK425767 - MK425847).

Data analysis

Microsatellites

For each STR loci, the mean number of alleles, expected (H_e) and observed (H_o) Heterozygosity, Hardy-Weinberg (HW) equilibrium and null allele frequency (F_{eqNull}) were calculated by Cervus (Kalinowski, Taper, & Marshall, 2007). The allelic Fixation Index (F_{is}) was calculated by GDA (Lewis & Zaykin, 2001). For each locality, the allele richness was standardized by rarefaction (A_r) using HP Rare software. Moreover, expected heterozygosity (H_e), observed heterozygosity (H_o), Hardy-Weinberg equilibrium (HW), linkage disequilibrium (LD), and the intra-population allelic fixation coefficient (F_{is}) were calculated by Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) with 1,023 permutations. The effective population size (N_e) of each site was calculated using the Sibship Frequency (SF) Full Likelihood method (Wang, 2009), implemented by Colony 2.0.6.5 (Jones & Wang, 2010), with a 95% confidence interval (CI), the options chosen were haplodiploid species, both sexes monogamous, allowing inbreeding. Three long-chain runs were performed, with prior optimal calculation to N_e , assuming random mating.

The genetic differentiation coefficients (F_{st}) were calculated at 1,023 permutations by Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). The Isolation By Distance (IBD) was tested using Mantel, with $\alpha = 0.001$ to avoid Type I errors (Cushman *et al.*, 2013). The IBD and principal coordinate analysis (PCoA) were performed by Genalex 6.5 (Peakall, 2012).

The population structure and the number of subpopulations (K) in our collection were estimated using Structure 2.3.4 (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000). We assumed a correlated allele frequency and *admixture* model. We performed 10 runs with 10^6 permutations and 10% initial burn-in. We ran K between 1 and 10, among which the optimum number for K was chosen using the Evanno method (Earl & VonHoldt, 2012). To test the structure of the groups proposed by Structure and the PCoA, a Molecular Variance Analysis (AMOVA) with 1,000 permutations was also performed using the Arlequin 3.5 program (Excoffier & Lischer, 2010).

For forensic investigations, we used an exclusion-simulation method of assignment to determine the likely origin of each nest. To identify a possible population source for *M.*

quadrifasciata specimens, individual assignment tests were performed using a Bayesian multilocus-approach (Rannala & Mountain, 1997), implemented in Gene-Class 2.0 (Piry *et al.*, 2004). GeneClass2 does not require structured genetic populations to perform attribution and exclusion tests, although the populations must have distinguishable allelic frequencies. In our analysis, the genotypes were generated by MCMC simulations of 10,000 individuals for each *M. quadrifasciata* population. To exclude an individual from all but the true population of origin, a strict criterion was applied (p value of 0.001). Using GeneClass2.0, we also performed an exclusion test based on allele frequencies to calculate likelihoods (Paetkau *et al.*, 2004) to determine the most likely candidate population from the non-excluded populations, following the forensic standards assessment procedure for wildlife (Manel *et al.*, 2002).

MtCOI

Haplotype (Hd) and nucleotide (π) diversity were calculated using the Arlequin 3.5 program (Excoffier & Lischer, 2010) with 1000 simulations. The haplotype network was produced by Haplotype Viewer (<http://www.cibiv.at/~greg/haploviewer>) from a tree created using the *Maximum Likelihood* algorithm implemented in MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011).

The genetic differentiation coefficient (Fst) was calculated at 1,023 permutations by Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Moreover, the IBD was tested using Mantel, with $\alpha = 0.001$ to avoid Type I errors (Cushman *et al.*, 2013). Subsequently, IBD and Principal Coordinates Analyses (PCoA) were performed using Genalex 6.5 (Peakall, 2012).

With the MtCOI, the inference of these units was made by BAPS 6 (Corander *et al.*, 2008) using the *admixture* model. We tested K from 1 to 10, with 10 runs for each K value. The proposed structure was tested using AMOVA from Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) with 1,000 permutations.

To compare and evaluate the genetic diversity in southern Brazilian and locate the probable origin of the exogenous haplotypes, analyses were performed using the COI sequences obtained by Batalha-Filho *et al.* (2010) from bees collected from several Brazilian states (GenBank access number: FJ975620 to FJ975764). The haplotype network was constructed by Haplotype Viewer (<http://www.cibiv.at/~greg/haploviewer>) from a tree constructed using the *Maximum Likelihood* algorithm in MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). Structure analyses were repeated with BAPS 6 (Corander *et al.*, 2008). The population structure proposal based on BAPS was tested by AMOVA with 1,023 permutations and the group Fst values were calculated with 10,000 permutations, both using Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

Results

Microsatellites

Homozygote excess was detected by examining Hardy-Weinberg Equilibrium deviation at all loci, except the Mq19 locus (Tables 1 and 2). The F_{st} between all populations was 0.127. Among the localities, the F_{st} was 0.047 (Maf-SC and SAPCam-PR) and 0.474 (JDSGua-SC and Maf-SC, JDSGua-SC and CAI-SC) (Table 3). The Mantel test indicated no correlation between genetic and geographic distance ($R^2 = 0.0067$, $p < 0.01$).

The most likely number of clusters is $K = 2$, with great miscegenation in most populations (Figure 2). The observed trend shows separation between the populations from Paraná (greater proportion of the 'red' cluster) and Santa Catarina (greater proportion of the 'green' cluster). The dispersion graph of the Principal Coordinate Analysis (PCoA) also reflects this separation trend between the two populations along the first axis.

The AMOVA was performed according to the separation proposed by Structure (Xan-SC grouped with the other samples of Paraná and Mor-PR with samples from Santa Catarina) and the separation shown by PCoA (Xan-SC and Mor-PR with samples from Santa Catarina). Neither approach confirmed a distinction between the two structured genetic populations (87% of variation was within the populations and $F_{st} = 0.12$ in both tests).

The origin attribution of individuals gave a quality index of 35.97%, and only 63 individuals (39.9%) were attributed to the collection region itself. The origin exclusion test gave a 17.20% quality index, with correct assignments (attribution to the collection site) of 43 individuals (27.2%). However, the test was unable to exclude all but one source region for any sample.

MtCOI

The F_{st} between all populations was 0.244. Among the localities, F_{st} values ranged from 0.178 (Man-PR and QBa-PR) to 1 (QBa-PR and Xan-SC) (Table 4). Moreover, Pru-PR was different from all others. The Mantel test indicated no significant correlation between genetic and geographical distances ($R^2 = 0.0009$, $p=0.1162$).

The most probable number of populations is $K = 4$ ($\log(\text{ml}) -299.9441$, $p=1$) (Figure 3). Group A is present in all localities, except Pru-PR. Group B consists of samples from Pru-PR. Group C is composed of colonies from northern Santa Catarina and the Cur-PR region, as well as samples collected from Pru-PR that originated in Cur-PR. Group D comprises colonies of individuals with interrupted abdomen stripes, with or without knowledge of hybridization by the beekeeper, and colonies with continuous stripes that coexist with *Melipona quadrifasciata antidioides* (MQA) colonies. These groupings are possibly indicative of nest origin.

An AMOVA was performed for each of the three groups proposed by BAPS (A, B and C). Group D was not used because it is composed of exogenous samples and is not a real population (Figure 4). The AMOVA results for the samples at their collection

locations indicate that the largest source of variation is within populations (75.57%). It suggests an absence of population structuring. However, when individuals are organized according to the BAPS proposal, in which the correct colony grouping is probably recovered, 75.88% of variability is found among populations. The PCoA recovered the BAPS results and segregated Group A as opposed to Group D samples, with Group B and C being intermediate. The consequences of organizing the samples from southern Brazil according to the structure proposed by BAPS were also observed in population differentiation analyses, evidenced by larger *Fst* values (Table 5).

When a haplotype network and BAPS were constructed with samples obtained from other locations in Brazil (Batalha-Filho *et al.*, 2010), four populations were found (Figure 5). The haplotypes from south Brazil are closely related, and the individuals from Santa Catarina collected by Batalha-Filho *et al.* (2010) were grouped with the other samples from Group A. The individuals that are most likely hybrids with MQA (Group D) were grouped with the Minas Gerais and Rio de Janeiro samples, where MQA is native. In addition, the Rio Grande do Sul samples were grouped with those from Santa Catarina, which makes sense given that the beekeepers indicated that they buy their colonies mainly from the southern part of the state. The *M. quadrifasciata* species distribution diversity variation was primarily within the groups (72.67%) proposed by the BAPS. All *Fst* values were high and significant among the four populations (Table 6).

Discussion

Three non-mutually exclusive factors have been observed in comparative studies between natural and meliponary stocks that should be considered when evaluating genetic diversity and the population structure of meliponaries; these are nest multiplication, nest transport and gene flow between beekeeper managed and wild colonies. These factors may be more important than natural landscape characteristics in cultivated species gene flow (Jaffé *et al.*, 2016). One limitation of the current study is that no natural populations of *M. quadrifasciata* were found, and therefore it was not possible to compare feral and managed stocks. However, evidence of diversity loss and population de-characterization was found in the historical data of the meliponaries, as well as in the genetic comparative analyses between the meliponaries themselves.

Diversity and Genetic Characterization

Even though we sampled *M. quadrifasciata* only in southern Brazil, we found a range of 4–20 alleles per microsatellite locus, which is similar to what was reported by Tavares *et al.* (2013; 3–15 alleles per loci). The allelic richness is also similar to that of other species within the genus, including *M. fasciculata* (Silva *et al.*, 2018), *M. rufiventris* (Lopes *et al.*, 2009), *M. seminigra merrillae* (Francini *et al.*, 2009), *M. interrupta manaosensis* (Francini *et al.*, 2010), *M. mondury* (Lopes *et al.*, 2010) and *M. yucatanica* (May-Itzá *et al.*, 2010).

Thus, MtCOI haplotype diversity can be considered high, in comparison with feral populations of *M. quadrifasciata* (Nascimento *et al.*, 2010). These values are also considered high when compared to other natural populations, such as *Partamona helleri* (Brito & Arias, 2010), *Tetragonisca angustula* (Francisco *et al.*, 2017) and *M. subnitida* (Souza *et al.*, 2018). However, although the diversity values found reflect haplotype number maintenance, this diversity was poorly distributed among the localities, varying from 0 to 1 between the municipalities.

Diversity reduction through nest multiplication

Microsatellites

Our results regarding the effective number of alleles, linkage disequilibrium, heterozygous deficits, high allelic fixation rates and low effective population size are interpreted together as genetic consequences derived from the foundation of populations with few colonies, and multiplication of certain selected colonies and consequent inbreeding. This is consistent with what has happened with other managed bee species (Muñoz, Pinto, & De la Rúa, 2014b; Chapman *et al.*, 2018).

Effective population size (N_e) and effective allele number reflect the distribution of diversity, and they call attention to CSD allele loss (Zayed, 2004) occurring in restricted-dispersion environments, such as the meliponaries we sampled. In feral populations, low levels of N_e may represent an extinction risk. In meliponaries, these values can be monitored and mitigated by the introduction of new colonies and the capture of wild swarms using bait-nests.

Moreover, H_o and H_e (0.246 and 0.287, respectively) are considered low when compared to those of other *Melipona*, such as *M. scutellaris* ($H_o = 0.31$ – 0.44 , $H_e 0.54$ – 0.57) (Carvalho-Zilse *et al.*, 2009) *M. fasciculata* (0.536 and 0.453) (Silva *et al.*, 2018), and *M. yucatanica* (Mexico: 0.38–0.39; Guatemala: 0.59–0.45) (May-Itzá *et al.*, 2010). Low H_o can be a consequence of null allele frequencies, also described for other managed species (Carvalho-Zilse *et al.*, 2009). An excess of homozygotes was found at all sites, with the exception of Blu-SC and Xan-SC. Low values of observed heterozygosity (H_o) along with high diversity indices indicate that there are few alleles with high frequency and many alleles with low frequency, as previously found for *M. scutellaris* in meliponaries (Carvalho-Zilse *et al.*, 2009). The Hardy-Weinberg deviance, in addition to heterozygote deficits, can be explained by inbreeding due to beekeeping practices (Carvalho-Zilse *et al.*, 2009; Jaffé *et al.*, 2015).

The inbreeding coefficient ($F_{is} = -0.022$ to 0.7) had a greater amplitude than that of other stingless bees, such as *Tetragonula carbonaria* (Chapman *et al.*, 2018), *M. scutellaris* (Carvalho-Zilse *et al.*, 2009) and *T. angustula* (Santiago *et al.*, 2016), likely due to differences in management among beekeepers. All Santa Catarina meliponaries and two from Paraná (QBa-PR and Pru-PR) presented positive values for allele fixation, as expected when there is little introduction of new colonies or when they come from nearby sites.

Human-induced genetic management reduces the effective population size (Bruford, Bradley, & Luikart, 2003; Zeder *et al.*, 2006; Meixner *et al.*, 2010; Byatt *et al.*, 2016). N_e values were similar to the number of colonies sampled, despite the high standard deviation. In total, N_e was much lower than the number of colonies, due to the homogeneity of the localities. SRLAur-SC is the locality with the most nests and more preponderant commercial activity (production of colonies for sale), with more than 500 colonies; Moreover, $N_e = 11$, indicating low genetic variability at this site. RNeSBS-SC, with 50 nests, presented $N_e = 21$. In addition to allele richness, genetic composition can also be altered by management. The mean number of private alleles was low, indicating similarities among the localities.

It is not possible to discard the influence of natural nest introgression in the meliponaries. Negative F_{is} values, which suggest no inbreeding, were obtained at sites in forest or rural environments. An absence of gene flow with feral colonies results in a strong reduction in the diversity indices in *M. subnitida* (Souza *et al.*, 2018) and *M. scutellaris* (Alves *et al.*, 2011). On the other hand, meliponaries in the forest can maintain nuclear diversity through gene flow from wild colonies (Santiago *et al.*, 2016).

MtCOI

Several sites presented only one haplotype, including QBa-PR and Xan-SC. Although the most nests were found in SRLArm-SC, H_d was 0.222, which is low. Thus, this site is considered an exporter of nests rather than an importer. Consequently, in SRLArm-SC we can observe the consequences of artificial colony multiplication and increased inbreeding.

Only two haplotypes were widely distributed and had a high frequency ($H_1 = 27.16\%$ and $H_2 = 25.92\%$). About 60.86% of haplotypes can be considered rare. Few haplotypes with a frequency greater than 5% can be a consequence of repeatedly dividing a few selected colonies. Few high-frequency haplotypes have also been found in managed *T. angustula* (Santiago *et al.*, 2016) and *T. carbonaria* (Chapman *et al.*, 2018).

Increasing diversity: nest transport

Microsatellites

It is expected that localities that imported nests will have excess heterozygotes and a high diversity index, which result from the introduction of new genotypes; They also exhibit a Hardy-Weinberg imbalance (Chahbar *et al.*, 2013). Accordingly, the site of greatest heterozygosity (H_o) was RDSAur-SC (0.422), where most of the nests came from other municipalities, especially SRLArm-SC.

This study did not sample natural populations. However, we cannot reject the hypothesis that males from meliponaries may cause genetic disturbances in the natural population. Nest transport played a role in forming the genetic diversity of *Apis m.*

sicilian, in which nuclear introgressions were found, resulting from the invasion of males from exogenous colonies of *A. m. ligustica* (Muñoz *et al.*, 2014a).

MtCOI

The introgression of new colonies as a result of small-scale transport by beekeepers only leaves as witnesses mitochondrial haplotypes (Chahbar *et al.*, 2013; Chapman *et al.*, 2018); we were able to identify these haplotypes. The most nucleotide diversity was found in HDOLuz-SC, Pru-PR and CAI-SC, which can be explained by the fact that the nests originated from at least four municipalities, including areas of MQA, leaving traces in the mitochondrial genome. The high diversity may be a reflection of colony admixture. The map and the haplotype network reveal haplotypes that are found in distant sites.

Absence of population structuring

Multiplication of colonies in managed populations strengthens local variation, leading to the differentiation of subpopulations and, consequently, population structuring (Quezada-Euan *et al.*, 2007; Bonatti *et al.*, 2014; Jaffé *et al.*, 2016; Santiago *et al.*, 2016). However, we did not find population structuring based on any of the markers, indicating that indiscriminate transport of colonies was able to undo the expected population differentiation between natural and managed populations. Genetic homogenization was also found in managed Australian stingless bees for the same reason (Chapman *et al.*, 2018), and it is occurring in North African *Apis* (Chahbar *et al.*, 2013).

Microsatellites

The F_{st} values, the structuring and clustering analyses, and the AMOVA values reinforce the hypothesis that population genetic structuring can be undone by nest transport.

The managed population's F_{st} was low (0.130) compared to the natural populations of *M. quadrifasciata* from Minas Gerais state (F_{st} of 0.59) (Nascimento *et al.*, 2010). Other feral populations of stingless bees also presented higher values, such as *M. rufiventris* (Tavares *et al.*, 2007), *M. mandacaia* (Miranda *et al.*, 2012) and *T. angustula* (Francisco *et al.*, 2017). Among the pairwise locations, SRLAur-SC and Xan-SC do not differ from any of the other populations.

The population structure revealed that two genetic lineages form a genetic cline, with individuals displaying admixture, while others were displaced from the population of origin (Figure 2). Continuous genetic gradients generally indicate strong IBD, which is responsible for the erroneous delimitation of population structure (Frantz *et al.*, 2009; Meirmans, 2012; Priadka *et al.*, 2018). As geographic distance is an important factor in stingless bee genetic differentiation, the absence of an IBD signal was not expected. Managed bees exhibit lower IBD values than wild species, since dispersion is not only mediated by males. Until now, studies have demonstrated higher IBD values in *M.*

quadrifasciata than for managed species (Jaffé *et al.*, 2016). Consequently, reproductive individuals seem to maintain unrestricted gene flow in heterogeneous and anthropic environments. Genetic homogenization as a result of mixing the source populations has already been described in *M. scutellaris* in a meliponary in northeast Brazil (Carvalho-Zilse *et al.*, 2009), *A. mellifera* in Europe (De La Rúa *et al.*, 2004), and in other animal groups, such as lizards (Kolbe *et al.*, 2008).

No structuring based on AMOVA was able to partition the diversity variance. Consequently, it is possible that the population differentiation has been disturbed through artificial nest transportation, which increases the variability within each locality and homogenizes the diversity among the localities. In the PCoA, the samples were divided between those from Santa Catarina and those from Paraná. This separation may be due to Santa Catarina laws, which restrict nest transportation within the borders of the state (Santa Catarina, 2013). However, SRLArm-SC is in an intermediate position. This site is not differentiated from any another site, although it is the largest commercial meliponary sampled, with routes to the entire sampling area and is a possible homogenizing center.

MtCOI

The genetic differentiation was greatest for the COI gene, although it still was not possible to establish structured populations. The groups formed by PCoA do not reflect the geographical proximity of the samples. Corroborating this result, the *Fst* value (0.244) was low when compared to that of feral populations of *M. subnitida* (Souza *et al.*, 2018), *T. angustula* (Francisco *et al.*, 2017) and *Partamona helleri* (Brito & Arias, 2010). The absence of IBD could not be ruled out by the Mantel test.

The scenario found based on MtCOI in *M. quadrifasciata* meliponaries indicates four genetic lineages, but without current geographic structure. When the nest history is examined, each of the four genetic lineages is associated with a geographic region of origin and likely reflects a genetic structure disturbed by nest transport, especially for MQA colonies, which were segregated from the other samples in the PCoA. This hypothesis is corroborated by the *Fst* values among these groups and by the AMOVA test values. The disturbance caused by nest transport is evidenced by the discrepancy in the origins of the haplotype networks, which shows distant haplotypes coexisting in the same locality. Moreover, the haplotype network constructed with the origin attributed by the structure analysis indicates origins consistent with historical data. Feral bees or populations with less intense management show haplotype networks more coherent with the collection site (Brito & Arias, 2010; Brito *et al.*, 2013; Bonatti *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2016, 2017; Francisco *et al.*, 2017).

The structural tests and the haplotype network reinforce the hypothesis that the managed colonies from southern Brazil are differ genetically from those of other Brazilian regions. The haplotypes found in Rio Grande do Sul are the most frequent in Santa Catarina, which was expected due to beekeepers' transport reports. The same result was obtained from an analysis of a few *M. quadrifasciata* colonies in southern Brazil

(Batalha-Filho *et al.*, 2010). There is an exception: We were able to identify exogenous colonies and their likely origins. The MQA samples were grouped with Minas Gerais and Bahia samples, as these were the subspecies' native regions.

This data, together with those of Batalha-Filho *et al.* (2010), indicates that Brazil's southern region has exclusive genetic diversity, which may a consequence of local selection of traits adapted to the environment (Jensen *et al.*, 2005; De La Rúa *et al.*, 2009; Crispo *et al.*, 2011; Oleksa *et al.*, 2011). Within Santa Catarina and Paraná states, there is a high degree of haplotype admixture. However, these are distinct from other regions of Brazil, except due to the disturbances caused by the introduction of colonies of MQA origin.

The origin attribution tests were not conclusive. Ambiguous results of origin attribution and exclusion can be caused by four major factors; the first two have previously been described as expected by the method, and the others are intrinsic to this study: 1) Failure to reject the hypothesis that an individual is a migrant by a lack of sampling from suitable populations for comparison; 2) An individual incorrectly appears to originate from a place due to similarities in allele frequency and historical gene flow among non-sampled populations (Rannala & Mountain, 1997); 3) Limited number of markers used; 4) Intense gene flow caused by the beekeepers, which homogenizes the allele frequencies. For example, all individuals sampled in SAPCam-PR are from CurCMA-PR, and most of the RDSAur-SC samples come from SRLArm-SC. Thus, it is not possible for the algorithm to safely establish the original source. Despite these limitations, a forensic approach is not discarded in nest origins assignments, and could be an important ally for controlling migration among populations.

Three colonies that were identified as MQQ hybrids with MQA by the producers did not present individuals with interrupted abdominal stripes. In the MtCOI gene, only one haplotype was identified as MQA. Probably, after the death of the original MQA queen her daughters crossed with a MQQ male, thus explaining the MQA haplotype and the nuclear admixture revealed by the microsatellites. However, the MQA haplotype was replaced by a MQQ haplotype in at least two colonies.

One hypothesis is that there was an invasion of newly fertilized MQQ virgin queens (from other colonies) into orphan MQA nests, in which the queen died and had not yet been replaced by a daughter. This is a phenomenon already described and considered common (occurs in 25% of queen substitutions) for *M. scutellaris* (Wenseleers *et al.*, 2011), and is due to the large number of virgin queens that are produced and are lost from colonies of *M. quadrifasciata* (da Silva, Zucchi, & Kerr, 1972). The beekeepers did not report the practice of offering new brood discs in weakened colonies, which could replace the mitochondrial genome of the colony by another of unknown origin, which would be another possibility.

Conclusions

We observed that: 1) genetic diversity was relatively high, although poorly distributed, with low effective population size and low effective numbers of alleles; Indeed, it was not possible to find population structure in study area by mtCOI gene or microsatellite markers. However, a genetic gradient cline was found with microsatellite markers, and the mtCOI shows that queens have been displaced from their original populations. Moreover, MQA haplotypes have been introduced into southern Brazil. Despite the mixture found in Brazil's southern region, the MQQ samples formed a single group when compared to samples from the rest of the country, demonstrating different genetic patterns; 2) Alleles of distant origins were found in meliponaries into which nests were transported, increasing diversity. However, these introduced alleles also distort local diversity, making it difficult to correctly identify migrants; 3) There were clear signs of inbreeding in meliponaries dedicated to colony reproduction for commerce. The proximity to a natural environment that provides feral males can decrease the effects of inbreeding.

Population differentiation and IBD were not strong enough to classify populations or management units (Waples & Gaggiotti, 2006; Palsbøll *et al.*, 2007). Despite the challenges and discreet population delimitation edges for the creation of management plans, forensic tools can be used in the future to create management unit boundaries to maintain gene flow patterns between anthropically disturbed habitats and to prevent genetic connectivity and genetic identity loss, which may not be easily restored (Priadka *et al.*, 2018).

In the absence of population data, it is preferable to use smaller management units than evolutionary units. For this reason, state legislations that handle beekeeping and restrict interstate transportation are an important and geographically appropriate step for the southern Brazilian region. The authors suggest the use of political delimitations in the macro regions, which are more suitable for determining nest origins and migrants. Macro regions reflect sociopolitical and geographic scenarios already used in environmental plans, such as river basin committees. Strengthening of beekeeping, together with better management guidelines and diversity maintenance, can transform beekeeping into a sustainable development ally, generating income for small family farmers, and working towards increasing bee conservation, as well as helping preserve the natural environment upon which the bees are dependent.

Acknowledgment

We thank Dr. David de Jong for reviewing the manuscript and helping.

References

Alacs EA, Georges A, FitzSimmons NN, *et al.* 2010. DNA detective: A review of molecular approaches to wildlife forensics. *Forensic Science, Medicine, and Pathology* **6**: 180–194.

- Alves DA, Imperatriz-Fonseca VL, Franco TM, et al. 2011.** Successful maintenance of a stingless bee population despite a severe genetic bottleneck. *Conservation Genetics* **12**: 647–658.
- Araujo ED, Oliveira RG, Calazans HCM, et al. 2016.** Risk of local extinction and genetic diversity of *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) in a possible northeastern limit of its distribution in Brazil. *Sociobiology* **63**: 804–812.
- Barbiéri CJ. 2018.** *Caracterização da meliponicultura e do perfil do meliponicultor no estado de São Paulo: ameaças e estratégias de conservação de abelhas sem ferrão*. Dissertation (Master Degree). São Paulo. Escola de Artes, Ciências e Humanidades. Universidade de São Paulo.
- Batalha-Filho H, Waldschmidt AM, Campos LAO, et al. 2010.** Phylogeography and historical demography of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie* **41**: 534–547.
- Bispo dos Santos SA, Roselino AC, Hrncir M, et al. 2009.** Pollination of tomatoes by the stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Genetics and molecular research : GMR* **8**: 751–757.
- Boff S, Soro A, Paxton RJ, et al. 2014.** Island isolation reduces genetic diversity and connectivity but does not significantly elevate diploid male production in a neotropical orchid bee. *Conservation Genetics* **15**: 1123–1135.
- Bonatti V, Simões ZLP, Franco FF, et al. 2014.** Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. *Naturwissenschaften* **101**: 17–24.
- Brito RM, Francisco F de O, Françoise E, et al. 2013.** Very low mitochondrial variability in a stingless bee endemic to cerrado. *Genetics and Molecular Biology* **36**: 124–128.
- Brito RM & Arias MC. 2010.** Genetic structure of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) from Neotropical Atlantic rainforest. *Insectes Sociaux* **57**: 413–419.
- Bruford MW, Bradley DG & Luikart G. 2003.** DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature reviews. Genetics* **4**: 900–910.
- Byatt MA, Chapman NC, Latty T, et al. 2016.** The genetic consequences of the anthropogenic movement of social bees. *Insectes Sociaux* **63**: 15–24.
- Camargo JMF & Pedro SRM. 2013.** Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. In: *Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs).*
- Carvalho GA. 2001.** The number of sex alleles (CSD) in a bee population and its practical importance (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Hymenoptera Research* **10**: 10–15.
- Carvalho-Zilse GA, Costa-Pinto MF, Nunes-Silva CG, et al. 2009.** Does beekeeping reduce genetic variability in *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini)? *Genetics and Molecular Research* **8**: 758–765.
- Carvalho-Zilse GA & Kerr WE. 2006.** Utilização de marcadores microsatélites para estudos populacionais em *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). *Magistra* **18**: 213–220.
- Chahbar N, Muñoz I, Dall'Olio R, et al. 2013.** Population structure of North African honey bees is influenced by both biological and anthropogenic factors. *Journal of Insect Conservation* **17**: 385–392.
- Chapman NC, Byatt M, Cocenza RDS, et al. 2018.** Anthropogenic hive movements are changing the genetic structure of a stingless bee (*Tetragonula carbonaria*) population along the east coast of Australia. *Conservation Genetics* **19**: 619–627.

- Chapman NC, Lim J & Oldroyd BP. 2008.** Population genetics of commercial and feral honey bees in Western Australia. *Journal of economic entomology* **101**: 272–277.
- Corander J, Marttinen P, Sirén J, et al. 2008.** Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC bioinformatics* **9**: 539.
- Costa Pinto MFF. 2007.** Caracterização de locos microssatélites em duas de abelhas espécies da região amazônica: *Melipona compressipes* e *Melipona seminigra* (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). Dissertation (Master Degree). Manaus. Universidade Federal do Amazonas.
- Crispo E, Moore JS, Lee-Yaw JA, et al. 2011.** Broken barriers: Human-induced changes to gene flow and introgression in animals: An examination of the ways in which humans increase genetic exchange among populations and species and the consequences for biodiversity. *BioEssays* **33**: 508–518.
- Cushman SA, Wasserman TN, Landguth EL, et al. 2013.** Re-Evaluating causal modeling with Mantel tests in landscape genetics. *Diversity* **5**: 51–72.
- Delaney DA, Meixner MD, Schiff NM, et al. 2009.** Genetic characterization of commercial honey bee (Hymenoptera: Apidae) populations in the United States by using mitochondrial and microsatellite markers. *Ann. Entomol. Soc. Am* **102**: 666–673.
- Díaz S, Urbano SS, Caesar L, et al. 2017.** Report on the microbiota of *Melipona quadrifasciata* affected by a recurrent disease. *Journal of Invertebrate Pathology* **143**: 35–39.
- Earl DA & VonHoldt BM. 2012.** Structure Harvester: A website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**: 359–361.
- Excoffier L & Lischer HEL. 2010.** Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**: 564–567.
- Fontana CS, Bencke GA & Reis RE. 2003.** *Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul*. Edipucrs.
- Francini IB, Sforça DA, Sousa ACB, et al. 2009.** Microsatellite loci for an endemic stingless bee *Melipona seminigra merrillae* (Apidae, Meliponini) from Amazon. *Conservation Genetics Resources* **1**: 487–490.
- Francini IB, Sousa ACB, Sforça DA, et al. 2010.** Isolation and characterization of microsatellite loci in the stingless bee *Melipona interrupta manaosensis* (Apidae: Meliponini). *Conservation Genetics Resources* **2**: 27–30.
- Francini IB, Nunes-Silva CG & Carvalho-Zilse GA. 2012.** Diploid male production of two amazonian melipona bees (Hymenoptera: Apidae). *Psyche* **2012**.
- Francisco FO, Santiago LR, Brito RM, et al. 2014.** Hybridization and asymmetric introgression between *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi*. *Apidologie* **45**: 1–9.
- Francisco FO, Santiago LR, Mizusawa YM, et al. 2017.** Population structuring of the ubiquitous stingless bee *Tetragonisca angustula* in southern Brazil as revealed by microsatellite and mitochondrial markers. *Insect Science* **24**: 877–890.
- Frantz AC, Cellina S, Krier A, et al. 2009.** Using spatial Bayesian methods to determine the genetic structure of a continuously distributed population: Clusters or isolation by distance? *Journal of Applied Ecology* **46**: 493–505.
- Gehrck R. 2010.** Meliponicultura: O caso dos criadores de abelhas nativas sem ferrão no Vale do Rio Rolante (RS). Dissertation (Master Degree). Porto Alegre. Faculdade de Ciências Econômicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Giannini TC, Boff S, Cordeiro GD, et al. 2015.** Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie* **46**: 209–223.

- Harpur BA, Minaei S, Kent CF, et al. 2012.** Management increases genetic diversity of honey bees via admixture. *Molecular Ecology* **21**: 4414–4421.
- Hasselmann M & Beye M. 2004.** Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 4888–93.
- Jaffé R, Dietemann V, Allsopp MH, et al. 2010.** Estimating the density of honeybee colonies across their natural range to fill the gap in pollinator decline censuses. *Conservation Biology* **24**: 583–593.
- Jaffé R, Pope N, Carvalho AT, et al. 2015.** Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize stingless beekeeping. *PLoS ONE* **10**: 1–21.
- Jaffé R, Pope N, Acosta AL, et al. 2016.** Beekeeping practices and geographic distance, not land use, drive gene flow across tropical bees. *Molecular ecology* **25**: 5345–5358.
- Jensen AB, Palmer KA, Boomsma JJ, et al. 2005.** Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. *Molecular Ecology* **14**: 93–106.
- Jones OR & Wang J. 2010.** COLONY: A program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* **10**: 551–555.
- Kalinowski ST, Taper ML & Marshall TC. 2007.** Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* **16**: 1099–1106.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. 2012.** Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**: 1647–1649.
- Kerr WE. 1976.** Population genetic studies in bees. 2. Sex-Limited genes. *Evolution* **30**: 94–99.
- Kolbe JJ, Larson A, Losos JB, et al. 2008.** Admixture determines genetic diversity and population differentiation in the biological invasion of a lizard species. *Biology Letters* **4**: 434–437.
- De La Rúa P, Hernández-García R, Pedersen B V, et al. 2004.** Molecular diversity of honeybee *Apis mellifera iberica* L. (Hymenoptera: Apidae) from western Andalusia. *Arch. Zootec* **53**: 195–203.
- De La Rúa P, Jaffé R, Dall’Olio R, et al. 2009.** Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie* **40**: 263–284.
- De La Rúa P, Jaffé R, Muñoz I, et al. 2013.** Conserving genetic diversity in the honeybee: Comments on Harpur et al. (2012). *Molecular Ecology* **22**: 3208–3210.
- Lewis PO & Zaykin D. 2001.** Genetic Data Analysis: computer program for the analysis of allelic data, Version 1.0. *University of Connecticut, Storrs*. <http://phylogeny.uconn.edu/software/>.
- Linnell JDC. 2005.** *Spatial aspects of managing natural resources and conserving biodiversity. Integrating the global and the local*. Norsk institutt for naturforskning.
- Lopes DM, Silva FO, Fernandes-Salomão TM, et al. 2009.** Microsatellite loci for the stingless bee *Melipona rufiventris* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology Resources* **9**: 923–925.
- Lopes DM, Silva FO, Fernandes-Salomão TM, et al. 2010.** A scientific note on the characterization of microsatellite loci for *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* **41**: 138–140.
- López-Urbe MM, Soro A & Jha S. 2017.** Conservation genetics of bees: advances in the application of molecular tools to guide bee pollinator conservation. *Conservation Genetics* **18**: 501–506.

- Manel S, Berthier P, Luikart G, et al. 2002.** Society for conservation biology detecting wildlife poaching: Identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multilocus genotypes. *Conservation Biology* **16**: 650–659.
- May-Itzá WJ, Quezada-Euán JJG, Medina Medina LA, et al. 2010.** Morphometric and genetic differentiation in isolated populations of the endangered Mesoamerican stingless bee *Melipona yucatanica* (Hymenoptera: Apoidea) suggest the existence of a two species complex. *Conservation Genetics* **11**: 2079–2084.
- Meirmans PG. 2012.** The trouble with isolation by distance. *Molecular Ecology* **21**: 2839–2846.
- Meixner MD, Costa C, Kryger P, et al. 2010.** Conserving diversity and vitality for honey bee breeding. *Journal of Apicultural Research* **49**: 85–92.
- Mercês MD, Peralta ED, Trovatti AP, et al. 2013.** Antimicrobial activity of honey from five species of Brazilian stingless bees. *Ciência Rural, Santa Maria* **43**: 672–675.
- Miranda EA, Batalha-Filho H, Oliveira PS, et al. 2012.** Genetic diversity of *Melipona mandacaia* SMITH 1863 (Hymenoptera, Apidae), an endemic bee species from brazilian Caatinga, using ISSR. *Psyche: A Journal of Entomology* **2012**: 1–6.
- Miranda EA, Batalha-Filho H, Congrains C, et al. 2016.** Phylogeography of *Partamona rustica* (Hymenoptera, Apidae), an endemic stingless bee from the neotropical dry forest diagonal. *PLoS ONE* **11**: 1–19.
- Miranda EA, Ferreira KM, Carvalho AT, et al. 2017.** Pleistocene climate changes shaped the population structure of *Partamona seridoensis* (Apidae, Meliponini), an endemic stingless bee from the Neotropical dry forest. *PLoS ONE* **12**: 1–13.
- Muñoz I, Dall’olio R, Lodesani M, et al. 2014a.** Estimating introgression in *Apis mellifera siciliana* populations: Are the conservation islands really effective? *Insect Conservation and Diversity* **7**: 563–571.
- Muñoz I, Pinto MA & De la Rúa P. 2014b.** Effects of queen importation on the genetic diversity of Macaronesian island honey bee populations (*Apis mellifera* Linnaeus 1758). *Journal of Apicultural Research* **53**: 296–302.
- Nascimento MA, Batalha-Filho H, Waldschmidt AM, et al. 2010.** Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern. *Genetics and Molecular Biology* **33**: 394–397.
- Negrín Muñoz E. 2016.** Mujeres mayas, abejas mayas. *GeoGraphos. Revista Digital para Estudiantes de Geografía y Ciencias Sociales* **7**: 1–12.
- Nogueira J, Ramos JC, Benevenuto J, et al. 2014.** Conservation study of an endangered stingless bee (*Melipona capixaba*-Hymenoptera: Apidae) with restricted distribution in Brazil. *Journal of Insect Conservation* **18**: 317–326.
- Ogden R, Dawnay N & McEwing R. 2009.** Wildlife DNA forensics - Bridging the gap between conservation genetics and law enforcement. *Endangered Species Research* **9**: 179–195.
- Oldroyd BP. 2007.** What’s killing American honey bees? *PLoS Biology* **5**: 1195–1199.
- Oleksa A, Chybicki I, Tofilski A, et al. 2011.** Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland. *Journal of Apicultural Research* **50**: 116–129.
- Oxley PR & Oldroyd BP. 2009.** Mitochondrial sequencing reveals five separate origins of ‘black’ *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in eastern Australian commercial colonies. *Journal of economic entomology* **102**: 480–4.
- Paetkau D, Slade R, Burden M, et al. 2004.** Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* **13**: 55–65.
- Page RE & Kerr WE. 1990.** The evolution of monandry and queen replacement in

- Melipona (Hymenoptera: Apidae). *Revista Brasileira de Genética* **13**: 209–229.
- Palazuelos Ballivián J. 2008.** *Abelhas Nativas sem Ferrão*. São Leopoldo.
- Palsbøll PJ, Bérubé M & Allendorf FW. 2007.** Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution* **22**: 11–16.
- Peakall RS. 2012.** GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* **28**: 2537–2539.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, et al. 2004.** GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* **95**: 536–539.
- Potts SG, Roberts SPM, Dean R, et al. 2010.** Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research* **49**: 21–8839.
- Priadka P, Manseau M, Trottier T, et al. 2018.** Partitioning drivers of spatial genetic variation for a continuously-distributed population of boreal caribou: implications for management unit delineation. *Ecology and Evolution*: 1–13.
- Price MR & Hadfield MG. 2014.** Population genetics and the effects of a severe bottleneck in an ex situ population of critically endangered Hawaiian tree snails (BS Yue, Ed.). *PLoS ONE* **9**: e114377.
- Pritchard JK, Stephens M & Donnelly M. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945–59.
- Quezada-Euan JJG, Paxton RJ, Palmer KA, et al. 2007.** Morphological and molecular characters reveal differentiation in a neotropical social bee, *Melipona beecheii* (Apidae : Meliponini). *Apidologie* **38**: 247–258.
- Rannala B & Mountain JL. 1997.** Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 9197–9201.
- Rio Grande do Sul. 2014.** Decreto N°51.797 de 8 de set. de 2014. Declara as Espécies da Fauna Silvestre Ameaçadas de Extinção no Estado do Rio Grande do Sul. Diário Oficial do Estado, Porto Alegre, RS, 09 de setembro de 2014.
- Santa Catarina. 2013.** Lei N° 16171 de 14 de Nov. de 2013. Dispõe sobre a criação, o comércio e o transporte de abelhas-sem-ferrão (meliponíneas) no estado de Santa Catarina. Diário Oficial do Estado, Florianópolis, SC, 18 de novembro de 2013.
- Santiago LR, Francisco FO, Jaffé R, et al. 2016.** Genetic variability in captive populations of the stingless bee *Tetragonisca angustula*. *Genetica* **144**: 397–405.
- del Sarto MCL, Peruquetti RC & Campos LAO. 2005.** Evaluation of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) as pollinator of greenhouse tomatoes. *Journal of economic entomology* **98**: 260–266.
- Schiff NM & Sheppard WS. 1996.** Genetic differentiation in the queen breeding population of the western United States. *Apidologie* **27**: 77–86.
- Schiff NM, Sheppard WS & Loper GM. 1994.** Genetic diversity of feral honey bee (Hymenoptera : Apidae) populations in the southern United States. *Ann. Entomol. Soc. Am* **87**: 842–848.
- Schuelke M. 2000.** An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology* **18**: 233–234.
- Schwarz HF. 1948.** Stingless bees of the western hemisphere. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **90**: 1–546.
- Seide VE, Bernardes RC, Pereira EJG, et al. 2018.** Glyphosate is lethal and cry toxins alter the development of the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Environmental Pollution* **243**: 1854–1860.
- Silva GR, Pereira FM, Souza BA, et al. 2014.** Aspectos bioecológicos e genético-comportamentais envolvidos na conservação da abelha Jandaíra, *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini), e o uso de ferramentas moleculares nos estudos de diversidade. *Arquivos do Instituto Biológico* **81**: 299–308.

- Silva GR, Souza IGB, Pereira FM, et al. 2018.** Genome-wide discovery and characterization of microsatellite markers from *Melipona fasciculata* (Hymenoptera: Apidae), cross-amplification and a snapshot assessment of the genetic diversity in two stingless bee populations. *European Journal of Entomology* **115**: 614–619.
- da Silva DLN, Zucchi R & Kerr WE. 1972.** Biological and behavioural aspects of the reproduction in some species of *Melipona* (hymenoptera, apidae, meliponinae). *Animal Behaviour* **20**: 123–132.
- Silveira FA, Pinheiro-Machado C, Alves-dos-Santos I, et al. 2002.** Taxonomic constraints for the conservation and sustainable use of wild pollinators - The Brazilian wild Bees. *Pollinating Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature*: 41–50.
- Souza FS, Angélica M, Carvalho P De, et al. 2018.** Genetic variability of *Melipona subnitida* (Hymenoptera: Apidae) in introduced and native populations. *Journal of Insect Science* **18**: 1–6.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. 2011.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731–2739.
- Tarpy DR, Vanengelsdorp D & Pettis JS. 2013.** Genetic diversity affects colony survivorship in commercial honey bee colonies. *Naturwissenschaften* **100**: 723–728.
- Tavares MG, Dias LAS, Borges AA, et al. 2007.** Genetic divergence between populations of the stingless bee urucu amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais? *Genetics and Molecular Biology* **30**: 667–675.
- Tavares MGM, Pietrani NTN, Durvale MDCM, et al. 2013.** Genetic divergence between *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations. *Genetics and Molecular Biology* **36**: 111–117.
- Teixeira KO, Silveira TCL & Harter-Marques B. 2018.** Different responses in geographic range shifts and increase of niche overlap in future. *Sociobiology* **65**: 630–639.
- vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, et al. 2009.** Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS ONE* **4**: e6481.
- vanEngelsdorp D, Hayes J, Underwood RM, et al. 2010.** A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *Journal of Apicultural Research* **49**: 7–14.
- vanEngelsdorp D & Meixner MMD. 2010.** A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**: S80–S95.
- Velthuis HHW, Koedam D & Imperatriz-Fonseca VL. 2005.** The males of *Melipona* and other stingless bees, and their mothers. *Apidologie* **36**: 169–185.
- Viana BF, Gabriel J, Garibaldi LA, et al. 2014.** Stingless bees further improve apple pollination and production. *Journal of Pollination Ecology* **14**: 261–269.
- Walsh PS, Metzger DA & Higuchi R. 2013.** Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* **54**: 506–513.
- Wang J. 2009.** A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. *Molecular Ecology* **18**: 2148–2164.
- Waples RS & Gaggiotti O. 2006.** What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology* **15**: 1419–1439.
- Wasser SK, Clark WJ, Drori O, et al. 2008.** Combating the illegal trade in African

- elephant ivory with DNA forensics. *Conservation Biology* **22**: 1065–1071.
- Wenseleers T, Alves DA, Franco TM, et al. 2011.** Intraspecific queen parasitism in a highly eusocial bee. *Animal Behaviour*: 173–176.
- Willoughby JR, Fernandez NB, Lamb MC, et al. 2015.** The impacts of inbreeding, drift and selection on genetic diversity in captive breeding populations. *Molecular Ecology* **24**: 98–110.
- Witzenberger KA & Hochkirch A. 2011.** Ex situ conservation genetics: a review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species. *Biodiversity and Conservation* **20**: 1843–1861.
- Zayed A. 2004.** Effective population size in Hymenoptera with complementary sex determination. *Heredity* **93**: 627–630.
- Zayed A. 2009.** Bee genetics and conservation. *Apidologie* **40**: 237–262.
- Zayed A & Packer L. 2005.** Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 10742–6.
- Zayed A, Roubik DW & Packer L. 2004.** Use of diploid male frequency data as an indicator of pollinator decline. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **271** Suppl: S9–12.
- Zeder MA, Emshwiller E, Smith BD, et al. 2006.** Documenting domestication: The intersection of genetics and archaeology. *Trends in Genetics* **22**: 139–155.

Tables

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1: *Melipona quadrifasciata* genetic diversity based on microsatellite and MtCOI data *per* locality. Pop: Sampled population. N(STR): sample size for STR data. Ar: allele effective number; Na: private allele frequency (SE); HO: observed heterozygosity (SE); HE: expected heterozygosity (SE); F: inbreeding coefficient; Ne: effective number size (CI). N(COI): sample size in MtCOI data; H: number of haplotypes; HD: haplotype diversity; π nucleotide diversity. Paraná: Santo Antônio da Platina and Cambará (SAPCAM); Pato Branco (PBr); Prudentópolis (Pru); Curitiba and Campo Magro (CurCma); Mandirituba (Man); Morretes (Mor) and Quatro Barras (QBa). Santa Catarina: Jaraguá do Sul and Guaramirim (JDSGua); Mafra (Maf); Campo Alegre (CAI); Rio Negrinho and São Bento do Sul (RNeSBS); Blumenau (Blu); Rio do Sul and Aurora (RDSAur); Santa Rosa de Lima and Armazém (SRLArm); Herval d'Oeste and Luzerna (HDOLuz) and Xanxerê (Xan).

State	Pop	N(STR)	Ar	Na (SE)	Ho (SE)	He (SE)	F	Ne (CI)	N (COI)	H	Hd	π
Paraná (PR)	SAPCam	10	4.4	1.35 (0.438)	0.254 (0.084)	0.287 (0.114)	-0.142	11 (5-33)	-	-	-	-
	PBr	5	2.6	2.387 (0.838)	0.36 (0.16)	0.422 (0.182)	-0.09	4 (2-20)	-	-	-	-
	Pru	10	4.4	1.875 (0.702)	0.38 (0.143)	0.397 (0.143)	0.25	9 (4-25)	7	3	0,666	0,0033
	CurCma	13	2.74	1.742 (0.452)	0.223 (0.129)	0.308 (0.146)	-0.043	13 (6-30)	12	5	0,803	0,0047
	Man	10	3.8	1.242 (0.363)	0.32 (0.146)	0.256 (0.113)	-0.384	13 (6-40)	8	7	0,964	0,0047
	Mor	10	2.4	1.802 (0.497)	0.291 (0.144)	0.306 (0.155)	-0.058	10 (5-28)	7	3	0,523	0,00151
	Qba	10	5	1.741 (0.652)	0.3 (0.126)	0.385 (0.146)	1	11 (5-30)	8	1	0	0
Santa Catarina (SC)	JDSGua	10	2	1.436 (0.2)	0.229 (0.102)	0.269 (0.107)	0.538	16 (8-42)	3	3	1	0,00193
	Maf	10	2.2	1.437 (0.386)	0.09 (0.046)	0.182 (0.134)	0	8 (4-23)	4	3	0,8333	0,00169
	CAI	10	2.8	1.502 (0.294)	0.27 (0.147)	0.276 (0.108)	0	10 (5-26)	4	4	1	0,00361
	RNeSBS	12	2.98	1.812 (0.493)	0.156 (0.065)	0.328 (0.143)	0.607	21 (10-50)	2	2	1	0,00145
	Blu	10	2	1.44 (0.225)	0.287 (0.182)	0.267 (0.122)	0.538	9 (4-26)	3	2	0,6667	0,00096
	RDSAur	10	2.8	1.812 (0.365)	0.422 (0.176)	0.371 (0.138)	0.196	8 (4-24)	4	3	0,8333	0,00169
	SRLArm	14	2.71	1.62 (0.314)	0.078 (0.034)	0.301 (0.131)	0.559	11 (6-28)	9	2	0,2222	0,00257
	HDOLuz	10	2.6	1.566 (0.195)	0.27 (0.097)	0.337 (0.105)	0.437	16 (7-44)	7	6	0,9523	0,00647
	Xan	4	5.4	1.148 (0.394)	0.25 (0.194)	0.186 (0.132)	0	5 (2-30)	3	1	0	0
	Total	158	3.1 (0.88)	1.571 (0.105)	0.246 (0.03)	0.287 (0.03)	0.25	48 (34-73)	81	23	0,856	0,0039

Bold values: $p \leq 0.05$.

Table 2: *Melipona quadrifasciata* genetic diversity based on microsatellite data per *locus*. N: sample size. A: allele richness; Ho: observed heterozygosity; He: expected heterozygosity; HW: Hardy-Weinberg deviation, with Bonferroni correction); FeqNull: Null Allele frequencies and F: inbreeding coefficient.

<i>Locus</i>	N	A	Ho	He	HW	FeqNull	F
Mq4	123	10	0.52	0.516	NS	-0.028	-0.008
Mq6	94	4	0.096	0.257	*	0.475	0.628
Mq7	124	20	0.298	0.73	*	0.439	0.59
Mq19	141	5	0.135	0.129	NS	-0.025	-0.045
Mq20	155	5	0.245	0.378	*	0.212	0.351
Mean (IC)		7.8	0.26 (0.12)	0.4 (0.17)		0.214 (0.193)	0.303 (0.263)

* $p \leq 0.05$. NS: Not Significant.

Table 3: Pairwise Fst genetic distances matrix of *Melipona quadrifasciata* populations from southern Brazil based on STRs. Paraná: Santo Antônio da Platina and Cambará (SAPCAM); Pato Branco (PBR); Prudentópolis (Pru); Curitiba and Campo Magro (CurCma); Mandirituba (Man); Morretes (Mor) and Quatro Barras (Qba). Santa Catarina: Jaraguá do Sul and Guarapirima (JDSGua); Mafra (Maf); Campo Alegre (CAI); Rio Negrinho and São Bento do Sul (RNeSBS); Blumenau (Blu); Rio do Sul and Aurora (RDSAur); Santa Rosa de Lima and Armazém (SRLArm); Herval d'Oeste and Luzerna (HDOLuz) and Xanxerê (Xan).

	SAPCam	PBR	Pru	CurCma	Man	Mor	Qba	JDSGua	Maf	CAI	RNeSBS	Blu	RDSAur	SRLArm	HDOLuz	Xan
SAPCam	0															
PBR	0.232	0														
Pru	0.036	0.061	0													
CurCma	0.036	0.387	0.069	0												
Man	0.065	0.009	-0.046	0.120	0											
Mor	0.014	0.308	0.026	-0.043	0.071	0										
Qba	0.014	0.308	0.026	-0.043	0.071	-0.053	0									
JDSGua	0.303	-0.081	0.141	0.441	0.082	0.377	0.377	0								
Maf	0.047	0.428	0.100	-0.040	0.153	-0.034	-0.034	0.474	0							
CAI	0.047	0.428	0.100	-0.040	0.153	-0.034	-0.034	0.474	-0.053	0						
RNeSBS	-0.007	0.224	-0.029	-0.004	0.005	-0.033	-0.033	0.305	0.028	0.028	0					
Blu	0.021	0.032	-0.020	0.153	-0.028	0.102	0.102	0.104	0.186	0.186	0.038	0				
RDSAur	0.261	-0.067	0.121	0.379	0.072	0.318	0.318	-0.058	0.399	0.399	0.246	0.074	0			
SRLArm	0.034	0.086	-0.049	0.078	-0.041	0.036	0.036	0.171	0.113	0.113	-0.013	-0.012	0.139	0		
HDOLuz	0.187	-0.076	0.036	0.289	-0.003	0.228	0.228	-0.035	0.318	0.318	0.152	0.019	-0.024	0.051	0	
Xan	-0.037	0.181	-0.046	-0.073	-0.009	-0.092	-0.092	0.279	-0.050	-0.050	-0.091	0.020	0.213	-0.034	0.129	0

Bold values: $p \leq 0.05$.

Table 4: Pairwise Fst genetic distances matrix of *Melipona quadrifasciata* populations from southern Brazil based on MtDNA. Paraná: Santo Antônio da Platina and Cambará (SAPCAM); Pato Branco (PBr); Prudentópolis (Pru); Curitiba and Campo Magro (CurCMA); Mandirituba (Man); Morretes (Mor) and Quatro Barras (QBa). Santa Catarina: Jaraguá do Sul and Guaramirim (JDSGua); Mafra (Maf); Campo Alegre (CAI); Rio Negrinho and São Bento do Sul (RNeSBS); Blumenau (Blu); Rio do Sul and Aurora (RDSAur); Santa Rosa de Lima and Armazém (SRLArm); Herval d'Oeste and Luzerna (HDOLuz) and Xanxerê (Xan).

	Pru	CurCMA	Man	Mor	QBa	JDSGua	Maf	CAI	RNeSBS	Blu	RDSAur	SRLArm	HDOLuz
Pru	0												
CurCMA	0.379	0											
Man	0.371	0.030	0										
Mor	0.567	0.182	-0.021	0									
QBa	0.686	0.098	0.178	0.501	0								
JDSGua	0.504	0.010	-0.076	0.027	0.342	0							
Maf	0.555	0.087	0.125	0.374	0.413	0.124	0						
CAI	0.451	0.132	-0.093	-0.110	0.472	-0.124	0.267	0					
RNeSBS	0.472	-0.078	-0.263	-0.313	0.628	-0.435	0.111	-0.295	0				
Blu	0.565	0.087	0.125	0.446	0.735	0.250	0.329	0.296	0.323	0			
RDSAur	0.539	0.087	-0.048	-0.063	0.414	-0.358	0.222	-0.128	-0.469	0.329	0		
SRLArm	0.543	0.225	0.003	-0.067	0.446	0.072	0.357	-0.060	-0.198	0.385	0.006	0	
HDOLuz	0.337	0.103	0.075	0.305	0.373	0.170	0.244	0.196	0.078	0.240	0.232	0.277	0
Xan	0.616	0.236	-0.009	-0.090	1	0.333	0.612	-0.091	0.250	0.800	0.134	-0.180	0.298

Bold values: $p \leq 0.05$.

Table 5: Pairwise F_{st} genetic distances matrix of *Melipona quadrifasciata* populations from southern Brazil based on MtCOI; structured by BAPS.

	Group A	Group B	Group C
Group A	0		
Group B	0.762	0	
Group C	0.582	0.721	0
Group D	0.835	0.827	0.715

All values: $p \leq 0.05$.

Table 6: Pairwise F_{st} genetic distances matrix of *Melipona quadrifasciata* populations from all distributions based on MtCOI; structured by BAPS. Yellow: populations from Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ), Espírito Santo (ES), Sergipe (SE) and Bahia (BA). Blue: populations from São Paulo (SP) and Bahia (BA). Green: populations from Minas Gerais (MG) and Bahia (BA). Red: populations from Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) and Paraná (PR).

	Yellow	Blue	Green
Yellow	0		
Blue	0.408	0	
Green	0.404	0.687	0
Red	0.733	0.797	0.799

All values: $p \leq 0.05$.

Figure legends

Figure 1: The geographic distribution of meliponaries sampled in Santa Catarina (SC) and Paraná (PR), Southern Brazil. ● Meliponaries only with *Melipona quadrifasciata* (MQQ). ▲ Meliponaries with *Melipona quadrifasciata antidioides* (MQA) known presence. Paraná: Santo Antônio da Platina and Cambará (SAPCAM); Pato Branco (PBr); Prudentópolis (Pru); Curitiba and Campo Magro (CurCMA); Mandirituba (Man); Morretes (Mor) and Quatro Barras (QBa). Santa Catarina: Jaraguá do Sul and Guaramirim (JDSGua); Mafra (Maf); Campo Alegre (CAI); Rio Negrinho and São Bento do Sul (RNeSBS); Blumenau (Blu); Rio do Sul and Aurora (RDSAur); Santa Rosa de Lima and Armazém (SRLArm); Herval d'Oeste and Luzerna (HDOLuz) and Xanxerê (Xan).

Figure 2: A: *Melipona quadrifasciata* STR gradient clusters distribution in southern Brazil; B: Structure; and C: The PCoA of the genetic gradient. The colors correspond to the highest proportion cluster obtained by Structure. Paraná: Santo Antônio da Platina and Cambará (SAPCAM); Pato Branco (PBr); Prudentópolis (Pru); Curitiba and Campo Magro (CurCMA); Mandirituba (Man); Morretes (Mor) and Quatro Barras (QBa). Santa Catarina: Jaraguá do Sul and Guaramirim (JDSGua); Mafra (Maf); Campo Alegre (CAI); Rio Negrinho and São Bento do Sul (RNeSBS); Blumenau (Blu); Rio do Sul and Aurora (RDSAur); Santa Rosa de Lima and Armazém (SRLArm); Herval d'Oeste and Luzerna (HDOLuz) and Xanxerê (Xan).

Figure 3: A: Geographic distribution of *Melipona quadrifasciata*; 23 mtCOI haplotypes found in 14 localities. The circles represent the frequency of each haplotype in the locality and do not express sample size; B: Haplotype network. The size of the circles represents the number of samples of this haplotype and the blue dots represent non-sampled mutational steps. Paraná: Santo Antônio da Platina and Cambará (SAPCAM); Pato Branco (PBr); Prudentópolis (Pru); Curitiba and Campo Magro (CurCMA); Mandirituba (Man); Morretes (Mor) and Quatro Barras (QBa). Santa Catarina: Jaraguá do Sul and Guaramirim (JDSGua); Mafra (Maf); Campo Alegre (CAI); Rio Negrinho and São Bento do Sul (RNeSBS); Blumenau (Blu); Rio do Sul and Aurora (RDSAur); Santa Rosa de Lima and Armazém (SRLArm); Herval d'Oeste and Luzerna (HDOLuz) and Xanxerê (Xan).

Figure 4: A: Geographic distribution of *Melipona quadrifasciata*; 23 mtCOI haplotypes found in 14 localities colored according to BAPS. The circles represent the frequency of each haplotype in the locality and do not express sample size. B: The four groups by BAPS. C: Haplotype network. D: PCoA colored according to BAPS. Paraná: Santo Antônio da Platina and Cambará (SAPCAM); Pato Branco (PBr); Prudentópolis (Pru); Curitiba and Campo Magro (CurCMA); Mandirituba (Man); Morretes (Mor) and Quatro Barras (QBa). Santa Catarina: Jaraguá do Sul and Guaramirim (JDSGua); Mafra (Maf); Campo Alegre (CAI); Rio Negrinho and São Bento do Sul (RNeSBS); Blumenau (Blu); Rio do Sul and Aurora (RDSAur); Santa Rosa de Lima and Armazém (SRLArm); Herval d'Oeste and Luzerna (HDOLuz) and Xanxerê (Xan).

Figure 5: A: BAPS of the *Melipona quadrifasciata* mtCOI gene with Batalha-Filho et al. (2010) samples. Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR), São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ), Espírito Santo (ES), Bahia (BA) and Sergipe (SE). Names in bold are from our study. B: Haplotype network. The groups obtained by the present study are colored as follows: red for Group A, green for Group B, blue for Group C and yellow for Group D. The other samples are colored by state of origin.

**Beekeeping practices affect the population structure of *Melipona quadrifasciata*
(Apidae, Meliponini) in southern Brazil**

Jaqueline Reginato Koser¹, Tiago Maurício Franco^{1,2}

1. Depto. de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil
2. Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

*Corresponding autor

E-mail: jaquelinekoser@gmail.com. Depto. de Genética – FMRP – Universidade de São Paulo. Av. Bandeirantes, 3900 – CEP: 14040-901 – Bairro Monte Alegre – Ribeirão Preto – SP – Brazil. Phone: +55 – 016- 3315-4578

Beekeeping affect the diversity and population structure in *Melipona quadrifasciata*

Figure 1: The geographic distribution of meliponaries sampled in Santa Catarina (SC) and Paraná (PR), Southern Brazil. ● Meliponaries only with *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* (MQQ). ▲ Meliponaries with *Melipona quadrifasciata antidioides* (MQA) known presence. Paraná: Santo Antônio da Platina and Cambará (SAPCAM); Pato Branco (PBr); Prudentópolis (Pru); Curitiba and Campo Magro (CurCMA); Mandirituba (Man); Morretes (Mor) and Quatro Barras (QBa). Santa Catarina: Jaraguá do Sul and Guaramirim (JDSGua); Mafra (Maf); Campo Alegre (CAI); Rio Negrinho and São Bento do Sul (RNeSBS); Blumenau (Blu); Rio do Sul and Aurora (RDSAur); Santa Rosa de Lima and Armazém (SRLArm); Herval d'Oeste and Luzerna (HDOLuz) and Xanxerê (Xan).

275x190mm (96 x 96 DPI)

Figure 2: A: *Melipona quadrifasciata* STR gradient clusters distribution in southern Brazil; B: Structure; and C: The PCoA of the genetic gradient. The colors correspond to the highest proportion cluster obtained by Structure. Paraná: Santo Antônio da Platina and Cambará (SAPCAM); Pato Branco (PBr); Prudentópolis (Pru); Curitiba and Campo Magro (CurCma); Mandirituba (Man); Morretes (Mor) and Quatro Barras (QBa). Santa Catarina: Jaraguá do Sul and Guaramirim (JD SGua); Mafra (Maf); Campo Alegre (CAI); Rio Negrinho and São Bento do Sul (RNeSBS); Blumenau (Blu); Rio do Sul and Aurora (RDS Aur); Santa Rosa de Lima and Armazém (SRLArm); Herval d'Oeste and Luzerna (HDOLuz) and Xanxerê (Xan).

400x400mm (96 x 96 DPI)

Figure 3: A: Geographic distribution of *Melipona quadrifasciata*; 23 mtCOI haplotypes found in 14 localities. The circles represent the frequency of each haplotype in the locality and do not express sample size; B: Haplotype network. The size of the circles represents the number of samples of this haplotype and the blue dots represent non-sampled mutational steps. Paraná: Santo Antônio da Platina and Cambará (SAPCAM); Pato Branco (PBr); Prudentópolis (Pru); Curitiba and Campo Magro (CurCma); Mandirituba (Man); Morretes (Mor) and Quatro Barras (QBa). Santa Catarina: Jaraguá do Sul and Guaramirim (JDSGua); Mafra (Maf); Campo Alegre (CAI); Rio Negrinho and São Bento do Sul (RNeSBS); Blumenau (Blu); Rio do Sul and Aurora (RDSAur); Santa Rosa de Lima and Armazém (SRLArm); Herval d'Oeste and Luzerna (HDOLuz) and Xanxerê (Xan).

400x400mm (96 x 96 DPI)

Figure 4: A: Geographic distribution of *Melipona quadrifasciata*; 23 mtCOI haplotypes found in 14 localities colored according to BAPS. The circles represent the frequency of each haplotype in the locality and do not express sample size. B: The four groups by BAPS. C: Haplotype network. D: PCoA colored according to BAPS. Paraná: Santo Antônio da Platina and Cambará (SAPCAM); Pato Branco (PBr); Prudentópolis (Pru); Curitiba and Campo Magro (CurCma); Mandirituba (Man); Morretes (Mor) and Quatro Barras (QBa). Santa Catarina: Jaraguá do Sul and Guaramirim (JDSGua); Mafra (Maf); Campo Alegre (CAI); Rio Negrinho and São Bento do Sul (RNeSBS); Blumenau (Bln); Rio do Sul and Aurora (RDSAur); Santa Rosa de Lima and Armazém (SRLArm); Herval d'Oeste and Luzerna (HDOLuz) and Xanxerê (Xan).

400x400mm (96 x 96 DPI)

Figure 5: A: BAPS of the *Melipona quadrifasciata* mtCOI gene with Batalha-Filho et al. (2010) samples. Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR), São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ), Espírito Santo (ES), Bahia (BA) and Sergipe (SE). Names in bold are from our study. B: Haplotype network. The groups obtained by the present study are colored as follows: red for Group A, green for Group B, blue for Group C and yellow for Group D. The other samples are colored by state of origin.

800x650mm (96 x 96 DPI)