UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**Diversidade e estrutura genética de populações urbanas de abelhas
Centridini (Hymenoptera: Apidae) visitantes florais de *Tecoma stans*
(L) Kunth (Bignoniaceae)**

DIEGO MOURE-OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, como
parte das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciências – Área: ENTOMOLOGIA

Ribeirão Preto/SP

- 2013-

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**Diversidade e estrutura genética de populações urbanas de abelhas
Centridini (Hymenoptera: Apidae) visitantes florais de *Tecoma stans*
(L) Kunth (Bignoniaceae)**

DIEGO MOURE-OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, como
parte das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciências – Área: ENTOMOLOGIA

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

Ribeirão Preto/SP

- 2013-

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.

Catálogo da publicação

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São

Paulo

Moure-Oliveira, Diego

Diversidade e estrutura genética de populações urbanas de abelhas Centridini (Hymenoptera: Apidae) visitantes florais de *Tecoma stans* (L) Kunth (Bignoniaceae).
Ribeirão Preto, 2013.
101p.

Dissertação de Mestrado, apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
Área de concentração: Entomologia.
Orientador: Del Lama, Marco Antonio

Palavras chave: Genética de populações; Estruturação populacional; Abelhas solitárias; Marcadores mitocondriais.

“Enquanto que o nosso planeta, obedecendo à lei fixa da gravitação, continua a girar na sua órbita, uma quantidade infinita de belas e admiráveis formas, saídas de um começo tão simples, não têm cessado de se desenvolver e desenvolvem-se ainda!” **Charles Darwin**

Agradecimentos

A meus pais, Maria Alice e Marcos, e minha irmã, Alinne, pelo apoio e amor incondicional; pelos conselhos e orientação; sem eles, nada disto teria se concretizado.

Aos meus avôs, Milton, Maria, Manoel e Iris, que sempre estiveram do meu lado, apesar das particularidades da vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama, pela oportunidade, paciência, dedicação, ensinamentos e confiança depositada em mim nesses quase três anos de convivência.

Ao pessoal do Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros (LGEH), Tony, Elder, Caíto, Dani, Naná, Gabi, Ju, Kátia, Vitor e Isabel, com quem tive o prazer de conviver e aprender durante o período do mestrado.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Garófalo, da USP-RP, pelo incentivo, ensinamentos e material disponibilizado.

Ao Dr. Leo Correia da Rocha Filho e ao técnico de laboratório José Carlos Serrano, da USP-RP, pela ajuda na identificação das espécies de abelhas.

Aos amigos de longa data, Gustavo, Erick, Renê e Guilherme, pela amizade, apoio, brincadeiras, brigas e, principalmente, os churrascos de todos estes anos que passamos juntos!

À Luana, uma pessoa muito especial na minha vida, pelos anos de companheirismo, amor, compreensão e conversas “nerds”.

Às secretárias da Pós-Graduação, Renata e Vera, pela disposição e simpatia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade e incentivo.

À FAPESP (proc. 2011/13774-9) e CNPq, pelo apoio financeiro do projeto.

A Deus, pela vida!

Learning To Fly

(Pink Floyd)

Into the distance a ribbon of black
Stretched to the point of no turning back
A flight of fancy on a windswept field
Standing alone my senses real
A fatal attraction holding me fast how
Can I escape this irresistible grasp?
Can't keep my eyes from the circling skies
Tongue-tied and twisted just an earth bound misfit, I
Ice is forming on the tips of my wings
Unheeded warnings I thought, I thought of everything
No navigator to find my way home
Unladen, empty and turned to stone
A soul in tension that's learning to fly
Condition grounded but determined to try
Can't keep my eyes from the circling skies
Tongue-tied and twisted just an earth-bound misfit, I

RESUMO

Em abelhas, como nos demais himenópteros, a haplodiploidia e o mecanismo de determinação do sexo restringem o tamanho efetivo da população. Ademais, a nidificação próxima ao sítio natal pelas fêmeas das espécies solitárias restringe o fluxo gênico materno e causa alta viscosidade populacional. *Centris* é um gênero de abelhas solitárias da tribo Centridini, encontradas em distintos locais, como matas contínuas ou fragmentos florestais, bem como em ambientes urbanos; as espécies *C. analis* e *C. tarsata* se destacam no gênero pela abundância com que são encontradas nestas localidades. São abelhas poliléticas ou generalistas na coleta de pólen e nidificam em cavidades pré-existentes. Em razão de seu porte médio, presume-se que não apresentem alta capacidade de dispersão. Fêmeas de algumas espécies do gênero apresentam comportamento filopátrico. Estes dados nos levam a supor que espécies com traços biológicos similares tenham suas populações naturalmente estruturadas (subdivididas). Para testar esta hipótese, foram analisadas algumas regiões do genoma mitocondrial (DNAm_t) de abelhas Centridini residentes em áreas urbanas. As duas subunidades da citocromo c oxidase (COI e COII), bem como o RNA transportador de leucina (RNAt^{Leu}), apresentaram baixo nível de variação intra-específica, e a dificuldade em amplificar estas regiões para uma das espécies impediu a utilização destas regiões para análises populacionais. Desta forma, foram selecionadas duas regiões gênicas com taxas de variação intra-específicas distintas, o gene citocromo b (*cytb*) e a subunidade maior do DNA ribossômico (16S). Por ser uma molécula de herança materna, a análise destas regiões gênicas nos permitiu obter informações a respeito de colonização e o número de linhagens maternas. Os resultados deste trabalho sugerem que as populações de *Centris tarsata* e *Centris trigonoides* apresentam baixa e moderada estruturação, respectivamente. Para *C. analis*, a espécie mais bem amostrada, o excesso de picos

duplos apresentados nos eletroferogramas dificultou a interpretação dos resultados. Foi possível ainda verificar diferenças na distribuição haplotípica de machos e fêmeas de *C. tarsata*, sugerindo a ocorrência de uma dispersão enviesada para machos, caracterizando uma dispersão sexo-assimétrica.

Palavras chave: Genética de populações; Estruturação populacional; Abelhas solitárias; Marcadores mitocondriais

ABSTRACT

In bees, as in other hymenopterans, the haplodiploidy and mechanism of sex determination constrain the effective population size. Moreover, the nesting close to home site by the females of solitary species restricts maternal gene flow and causes high population viscosity. *Centris* is a genus of solitary bees of the tribe Centridini found in different locations, such as continuous forests or forest fragments, as well as in urban environments; the species *C. analis* and *C. tarsata* stand out in the genre for the abundance that are found in these locations. They are polyetics bees, or generalists in collecting pollen, and nest in cavities pre-existing. In reason of its medium size, it is presumed that do not present high dispersal capacity. How some species of the genus are phylopatric, we presume that other also presenting similar behavior. These data lead us to suppose that species with similar traits have their populations naturally structured (subdivided). To test this hypothesis, we analyzed urban populations of four species of *Centris* for some regions of mitochondrial genome (mtDNA). The two subunits of cytochrome c oxidase (COI and COII) and the tRNA leucine (tRNA^{Leu}) showed a low level of intraspecific variation, and the difficulty to amplify those regions for one species prevented the use of these regions to population analysis. Thus, we selected two gene regions with distinct rates of intra-specific variation, the gene cytochrome b (*cytb*) and the large subunit ribosomal DNA (16S). As a molecule maternally inherited, the analysis of the mitochondrial genes enabled us to obtain informations about colonization through the number of maternal lineages. Our results suggest that *Centris tarsata* and *Centris trigonoides* populations exhibit low and moderate genetic structuring, respectively. In *C. analis*, the species most well sampled, the excess of double peaks showed in the electropherograms difficults the interpretation of results. Also, for the species *C. tarsata* was possible to verify differences between males and

females, suggesting the occurrence of a male skewed dispersion and an asymmetrical dispersion.

Keywords: Population genetics; Population structure; Solitary bees; Mitochondrial markers.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de indivíduos de <i>Centris</i> amostrados neste projeto e seus respectivos locais de coleta.....	27
Tabela 2. Distâncias geográficas (Km) entre as cidades de coleta.....	31
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados para amplificação por PCR de genes mitocondriais.....	35
Tabela 4. Polimorfismo de nucleotídeos/aminoácidos (%) entre diferentes espécies....	42
Tabela 5. Composição nucleotídica de um fragmento do gene COI para diferentes espécies de abelhas.....	48
Tabela 6. Índices de diversidade para o gene COI.....	48
Tabela 7. Sítios polimórficos detectados no gene COI de <i>C. tarsata</i>	50
Tabela 8. Sítios polimórficos detectados no gene COI de <i>Centris</i> sp.....	50
Tabela 9. Composição nucleotídica do segundo fragmento do gene COI para diferentes espécies de abelhas.....	54
Tabela 10. Composição nucleotídica do RNAt ^{Leu} para diferentes espécies de abelhas.....	56
Tabela 11. Composição nucleotídica do fragmento do gene COII para diferentes espécies de abelhas.....	60
Tabela 12. Composição nucleotídica de um fragmento do gene <i>cytb</i> para diferentes espécies de abelhas.....	66
Tabela 13. Índices de diversidade genética para o gene <i>cytb</i>	66
Tabela 14. Sítios polimórficos para <i>cytb</i> de <i>C. tarsata</i>	68
Tabela 15. Sítios polimórficos para <i>cytb</i> de <i>C. trigonoides</i>	69
Tabela 16. Sítios polimórficos para <i>cytb</i> de <i>Centris</i> sp.....	70
Tabela 17. Composição nucleotídica de um fragmento do gene 16S de diferentes espécies de abelhas.....	74

Tabela 18. Índices de diversidade genética para o gene 16S.....	74
Tabela 19. Sítios polimórficos em parte do gene 16S de <i>C. tarsata</i>	76
Tabela 20. Sítios polimórficos em parte do gene 16S de <i>C. trigonoides</i>	76
Tabela 21. Sítios polimórficos em parte do gene 16S de <i>Centris</i> sp.....	76
Tabela 22. Número de indivíduos da espécie <i>C. tarsata</i> analisados.....	79
Tabela 23. Número de indivíduos da espécie <i>C. trigonoides</i> analisados.....	79
Tabela 24. Número de indivíduos da espécie <i>Centris</i> sp. analisados.....	80
Tabela 25. Valores de F_{ST} para cada gene das espécies de <i>Centris</i>	81
Tabela 26. Valores de F_{ST} obtidos para cada gene na espécie <i>C. trigonoides</i> excluindo da análise os indivíduos oriundos de Jequié-BA.....	82
Tabela 27. Valores de F_{ST} estimados para a espécie <i>C. tarsata</i>	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diversidade de Centridini. De cima para baixo, da esquerda para a direita: fêmea de <i>C. (Heterocentris) analis</i> ; macho de <i>C. (Heterocentris) analis</i> ; fêmea de <i>C. (Centris) flavifrons</i> ; fêmea de <i>C. (Hemisiella) trigonoides</i> ; fêmea de <i>C. (Xanthemisia) lutea</i> ; fêmea de <i>C. (Centris) varia</i> ; macho de <i>C. (Paracentris) rhodopus</i> ; macho de <i>E. (Epicharana) elegans</i> ; fêmea de <i>E. (Hoplepicharis) lunulata</i> ; fêmea de <i>Epicharis (Hoplepicharis) fasciata</i> ; fêmea de <i>Epicharis (Epicharana) rustica</i> ; <i>Epicharis (Epicharana) flava</i> . Fotos: discoverylife.org; covillephotos.net; Laboratório de Morfologia Comparada de Hymenoptera – UFPR.....	22
Figura 2. Locais de coleta de <i>C. analis</i>	29
Figura 3. Locais de coleta de <i>C. tarsata</i>	29
Figura 4. Locais de coleta de <i>C. trigonoides</i>	30
Figura 5. Locais de coleta de <i>Centris</i> sp.....	30
Figura 6. Coleta das abelhas utilizando tubos plásticos. Nesta foto foi coletado um indivíduo do gênero <i>Thygater</i> (Apidae: Eucerini) enquanto o mesmo forrageava. Foto: Diego Moure-Oliveira.....	32
Figura 7. Molécula do DNA mitocondrial de <i>Apis mellifera</i> e as regiões gênicas analisadas neste projeto.....	34
Figura 8. Macho (à esquerda) e fêmea (à direita) de <i>C. analis</i> . Fonte: Rollin Coville Photographs (disponível em < http://www.covillephotos.com/ >).....	40
Figura 9. Caracteres utilizados para identificação do material: (A) Palpo maxilar com dois palpômeros; (B) Clípeo e labro de uma fêmea; (C) Perna posterior de um macho. Fêmur e tíbia são intumescidos e a seta indica o espinho no basitarso; (D) Mandíbula de um macho. Fotos: Diego Moure-Oliveira.....	40

Figura 10. Rede de haplótipos para o gene <i>cytb</i> de indivíduos do subgênero <i>Hemisiella</i>	41
Figura 11. Eletroferograma da região COI para as quatro espécies de <i>Centris</i> analisadas neste projeto.....	44
Figura 12. Sítio com sobreposição de bases para COI de <i>C. analis</i>	45
Figura 13. Novos sítios com sobreposição de bases.....	46
Figura 14. Mesmo indivíduo em reações diferentes apresentou padrões distintos na leitura do eletroferograma, indicando uma questão metodológica a ser estudada.....	46
Figura 15. Sequência de parte do gene COI de <i>C. tarsata</i>	49
Figura 16. Sequência de parte do gene COI de <i>C. trigonoides</i>	49
Figura 17. Sequência de parte do gene COI de <i>Centris</i> sp.....	50
Figura 18. Sequência de COI de <i>C. analis</i> com sobreposição de base.....	51
Figura 19. Mesmo indivíduo apresentando leitura distinta no eletroferograma da região COI.....	52
Figura 20. Eletroferograma de RNAt ^{Leu} para alguns indivíduos de <i>C. analis</i>	52
Figura 21. Sequência do segundo fragmento de COI de <i>Centris tarsata</i>	55
Figura 22. Sequência do segundo fragmento de COI de <i>Centris trigonoides</i>	55
Figura 23. Sequência do segundo fragmento de COI de <i>Centris</i> sp.....	55
Figura 24. Forma estrutural do RNAt ^{Leu} para as quatro espécies de <i>Centris</i> . A barra vermelha indica o anticódon e as bases verdes indicam onde ocorreu variação intra-específica na análise.....	58
Figura 25. Sequência para o fragmento de COII de <i>Centris tarsata</i>	61
Figura 26. Sequência para o fragmento de COII de <i>Centris trigonoides</i>	61
Figura 27. Sequência para o fragmento de COII de <i>Centris</i> sp.....	61

Figura 28. Gene <i>cytb</i> para <i>C. analis</i> . Excesso de picos duplos dificulta a interpretação dos resultados.....	64
Figura 29. Mesmo indivíduo de <i>C. analis</i> sendo seqüenciado com <i>primers</i> distintos para <i>cytb</i> . As regiões se sobrepõem, porém não verificamos o mesmo padrão no eletroferograma.....	64
Figura 30. Leitura do eletroferograma para o gene <i>cytb</i> para as espécies de <i>Centris</i>	65
Figura 31. Sequência do haplótipo comum para <i>cytb</i> de <i>C. tarsata</i>	67
Figura 32. Sequência do haplótipo comum para <i>cytb</i> de <i>C. trigonoides</i>	67
Figura 33. Sequência do haplótipo comum para <i>cytb</i> de <i>Centris</i> sp.....	68
Figura 34. Sequência parcial do gene 16S de <i>C. analis</i>	72
Figura 35. Eletroferograma de um fragmento do gene 16S de três espécies de <i>Centris</i>	73
Figura 36. Sequência do haplótipo comum de 16S de <i>C. tarsata</i>	75
Figura 37. Sequência do haplótipo comum de 16S de <i>C. trigonoides</i>	75
Figura 38. Sequência do haplótipo comum de 16S de <i>Centris</i> sp.....	75
Figura 39. Rede de haplótipos para <i>cytb</i> e 16S de <i>C. tarsata</i>	79
Figura 40. Rede de haplótipos para <i>cytb</i> e 16S de <i>C. trigonoides</i>	80
Figura 41. Rede de haplótipos para <i>cytb</i> e 16S de <i>Centris</i> sp.....	80
Figura 42. Redes de haplótipos para os genes <i>cytb</i> e 16S em fêmeas de <i>C. tarsata</i>	84
Figura 43. Redes de haplótipos para os genes <i>cytb</i> e 16S em machos de <i>C. tarsata</i>	84

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Populações urbanas de abelhas.....	20
1.2. A tribo Centridini.....	21
1.3. Ferramentas genéticas em estudos de estruturação populacional.....	24
2. OBJETIVO.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Material.....	27
3.1.1. Locais de coleta.....	28
3.1.2. Procedimento de coleta.....	31
3.1.3. Período de coleta.....	32
3.2. Metodologia de análise.....	33
3.2.1. Extração do DNA.....	33
3.2.2. Amplificação e sequenciamento do DNA.....	34
3.2.3. Análise das sequências nucleotídicas.....	36
3.2.4. Índices de diversidade genética.....	36
3.2.5. Análise de estruturação populacional.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. Variação interespecífica do DNA mitocondrial (DNAMt) em populações urbanas de Centridini (Hymenoptera, Apidae).....	38
4.2. Caracterização e variação intra-específica do DNA mitocondrial (DNAMt) de algumas espécies de Centridini (Hymenoptera, Apidae).....	43
4.2.1. Subunidades I e II do Complexo Citocromo c Oxidase (COI e COII) e RNA transportador de Leucina (RNAtLeu).....	43

4.2.2. Citocromo b (<i>cytb</i>).....	63
4.2.3. Subunidade maior do RNA ribossômico (16S).....	71
4.3. Estrutura genética de populações urbanas de três espécies de <i>Centris</i> (Hymenoptera, Apoidea, Centridini) visitantes florais de <i>Tecoma stans</i>	78
4.4. Colonização, dispersão e a genética das populações.....	86
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

As abelhas compartilham com os demais himenópteros a haplodiploidia e o mecanismo de determinação do sexo. Estas características restringem o tamanho efetivo da população e, embora este processo seja mais intenso nas espécies que apresentam comportamento eussocial, as espécies solitárias também podem ter suas populações afetadas.

A redução do tamanho efetivo pode acarretar a diminuição da variabilidade genética intrapopulacional, uma vez que poucas fêmeas e machos serão responsáveis por produzir a nova geração. Este processo torna-se cíclico, podendo comprometer a viabilidade da população ao longo do tempo. Isto é conhecido como “vórtex” de extinção (Zayed e Packer 2005).

Este efeito pode ser contrabalanceado pela introdução de material genético novo na população e isto pode ser realizado via mutações e, principalmente, pelo fluxo de indivíduos entre populações distintas.

Entretanto, muitas espécies de abelhas apresentam determinadas características que podem, naturalmente, reduzir a taxa de fluxo gênico entre as populações, como o comportamento filopátrico, em que fêmeas nidificam próximo aos seus sítios natais, restringindo assim o fluxo materno. Para estas espécies, os machos teriam a função de promover o fluxo gênico, movendo-se entre as populações. Cerântola *et al.* (2011) reportaram que os machos de *Euglossa cordata* migram e disseminam material genético entre populações, caracterizando uma dispersão sexo-assimétrica.

O oligoletismo, ou seja, a especialização na alimentação, também é outra característica que restringe a dispersão, pois limita os indivíduos a permanecerem em determinados locais onde fontes do alimento específico são encontradas. Em trabalho de

Zayed *et al.* (2005) é demonstrado que abelhas com esta característica tendem a possuir suas populações em um nível maior de estruturação genética em relação às espécies poliléticas, ou seja, generalistas na alimentação. Especificidade na coleta de outros recursos, como óleos florais e resinas, além de necessidades especiais na nidificação, como qualidade do substrato, também podem restringir populações de determinadas espécies de abelhas a distintos locais. Entretanto, esta característica não deve ser avaliada unicamente, pois em um trabalho com *Andrena vaga* (Andrenidae), uma abelha especialista, foi estimado níveis de estruturação genética menores do que o esperado (Cerna *et al.* 2013), e este fato foi atribuído também à alta capacidade de voo (dispersão) deste organismo.

Desta forma, a capacidade de voo do organismo também determina quanto este poderá migrar e tem sido demonstrado como importante característica associada à capacidade de voo das espécies o tamanho corporal das mesmas (Gathmann e Tschardt 2002).

Além das características naturais dos próprios organismos, outro fator que pode agravar a dificuldade de dispersão é a fragmentação do ambiente, tornando muitas populações isoladas em verdadeiras ilhas devido à destruição de seus habitats naturais. Desmatamento, expansão agropecuária e urbana de algumas regiões podem ser responsáveis não apenas por limitar as populações a estas ilhas de vegetação, mas também por favorecer a extinção das mesmas.

Por fim, a forma de colonização de uma determinada área também determina como uma população se estrutura, pois se poucas fêmeas colonizam a área, poucas linhagens maternas estarão presentes neste sítio, contribuindo para uma menor variabilidade genética da população. Em abelhas do gênero *Partamona* (Meliponini) este fato já foi documentado (Ferreira 2010).

Portanto, analisar como ocorrem estes processos e suas conseqüências se torna de suma importância a fim de preencher diversas lacunas existentes no entendimento das dinâmicas populacionais destes organismos, propiciando subsídios na elaboração de planos de conservação para estes importantes polinizadores.

1.1. Populações urbanas de abelhas

A fundação e expansão das cidades implicam na modificação drástica dos ambientes naturais. Portanto, os centros urbanos tornam-se regiões distintas destas áreas, formando um ecossistema particular.

Os ecossistemas urbanos são caracterizados pela alta densidade da população humana, heterogeneidade espacial, diversos tipos de poluição, como visual, sonora, aquática e atmosférica, alto número de espécies exóticas, principalmente na flora, e mudanças climáticas locais (McIntery *et al.* 2001). A cidade de São Paulo, por exemplo, pode ter uma diferença de 8°C entre periferia e centro (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - Inpe).

Porém, apesar destas características que transformam este ecossistema em uma área distinta, muitas espécies vegetais e animais, presentes em áreas nativas periféricas habitam estes centros urbanos; dentre os animais que apresentam populações urbanas, os insetos possuem notável destaque.

McIntery (2000) lista em seu trabalho cinco razões para a necessidade de se estudar a fauna de artrópodos em regiões urbanas: (1) alta diversidade, fornecendo um retrato da diversidade biológica global de uma determinada área; (2) o curto tempo de geração mostra uma resposta rápida às mudanças causadas pelas ações antropogênicas no solo e vegetação; (3) fácil amostragem; (4) estes animais representam um grande

acervo de níveis tróficos; (5) são importantes componentes ecológicos, econômicos e sociológicos dos ambientes antropizados.

Dentre os grupos de insetos que são amostrados nos grandes centros urbanos, coleópteros e lepidópteros possuem grande destaque, porém trabalhos como os de Camargo e Mazucato (1984), Taura e Laroca (2001), Zanette *et al.* (2005), Silva *et al.* (2007), López-Urbe *et al.* (2008), Matteson *et al.* (2008), Cerântola *et al.* (2011) têm demonstrado a abundância e diversidade da apifauna nestas localidades. Apesar disto, ainda tem se mostrado muito limitado o entendimento de como estas populações urbanas de abelhas colonizam e persistem nestas áreas tão distintas de seus ambientes naturais.

1.2. A tribo Centridini

Centridini é uma tribo de abelhas solitárias que, juntamente com outras doze tribos, compõem a subfamília Apinae (Silveira *et al.* 2002). São abelhas de médio a grande porte e habitam exclusivamente a região neotropical. A tribo Centridini agrupa dois gêneros - *Centris* e *Epicharis* - e é considerada uma das tribos mais diversas em número de espécies desta região (Figura 1).

A dependência na coleta de óleos florais faz com que estas abelhas sejam importantes polinizadores de espécies vegetais que fornecem tais recursos, como espécies da família Malphigiaceae e Krameriaceae. Como todas as demais abelhas coletoras de óleos, as fêmeas possuem uma estrutura especializada nas tíbias posteriores, denominada escopa, para coleta destes lipídios. Esta íntima relação com diversas plantas produtoras de óleo faz com que as espécies desta tribo sejam consideradas espécies-chave para muitos ecossistemas.

Figura 1. Diversidade de Centridini. De cima para baixo, da esquerda para a direita: fêmea de *C. (Heterocentris) analis*; macho de *C. (Heterocentris) analis*; fêmea de *C. (Centris) flavifrons*; fêmea de *C. (Hemisiella) trigonoides*; fêmea de *C. (Xanthemisia) lutea*; fêmea de *C. (Centris) varia*; macho de *C. (Paracentris) rhodopus*; macho de *E. (Epicharana) elegans*; fêmea de *E. (Hoplepicharis) lunulata*; fêmea de *Epicharis (Hoplepicharis) fasciata*; fêmea de *Epicharis (Epicharana) rustica*; *Epicharis (Epicharana) flava*. Fotos: discoverylife.org; covillephotos.net; Laboratório de Morfologia Comparada de Hymenoptera – UFPR.

Além desta importância ecológica, sabidamente este grupo possui algumas espécies com potencial agrícola, como *C. analis* e *C. tarsata* para o cultivo de acerola e murici, e *E. flava* para o cultivo de maracujá (Freitas e Paxton 1998; Siqueira de Castro 2002; Santos *et al.* 2007; Oliveira e Schlindwein 2009; Gaglianone *et. al* 2010).

Muitas espécies desta tribo são encontradas nos mais distintos ambientes, como matas fechadas, campos abertos e áreas rurais, além de também serem vistos nos centros urbanos (Camargo e Mazucato 1984; Morato *et al.* 1999, Silva *et al.* 2007, Gazola e Garofalo 2009, Gaglianone 2010). Dentre estas espécies, *C. tarsata* e principalmente *C. analis* recebem destaque pelo alto número de indivíduos amostrados.

Esta elevada abundância nos mais distintos locais demonstra uma alta plasticidade; possivelmente, o poliletismo destas espécies (Dorea *et al.* 2009, Dorea *et al.* 2010) contribui para este fato. Outro aspecto que auxilia a plasticidade é a forma de nidificação destas espécies, uma vez que estas utilizam cavidades pré-existentes para construção do ninho, sítios encontrados em abundância nos mais variados ambientes. As características apresentadas podem indicar que as populações destas espécies não apresentam altos níveis de estruturação.

Entretanto, a alta energia gasta nestes voos poderia comprometer outras funções do organismo, como reparação do metabolismo e reprodução. Por isso, a permanência nos sítios natais para reprodução e nidificação (filopatria, por exemplo) pode significar uma garantia de economia de energia, a qual seria gasta para forragear uma nova área (Greenwood 1980). Sabidamente a espécie *C. analis* apresenta comportamento filopátrico e um estudo com *C. flavifrons* também revelou indícios deste tipo de comportamento (Peixoto 2012), o que nos leva a crer que outras espécies do gênero *Centris* possam ser filopátricas. Também, o porte corporal destes organismos, apesar de ser considerado médio, não deve permitir a realização de grandes voos, limitando geograficamente seus indivíduos.

López-Uribe *et al.* (2008) demonstraram em trabalho de marcação e recaptura conduzido na cidade de São Carlos-SP que apesar da alta capacidade de voo das abelhas euglossíneas (Roubik e Hanson 2004), 75% das fêmeas de euglossíneos recapturadas o

foram próximo ao sítio natal. Isto demonstra que, para coleta de recursos específicos elas podem não realizar grandes voo, mesmo estando aptas a realizarem tal função.

Também, a permanência nos sítios natais faz com que poucas fêmeas estejam disponíveis para migrar e colonizar novas áreas, reduzindo assim o número de linhagens colonizadoras.

Portanto, todas estas características nos levam a supor que, apesar de algumas barreiras, como fragmentação e alimentação, não imporem limitações aos indivíduos, alguns comportamentos apresentados tornam as populações destas espécies altamente estruturadas.

1.3. Ferramentas genéticas em estudos de estruturação populacional

Para se investigar a genética das populações de uma espécie é necessário utilizar marcadores genéticos adequados. Neste trabalho, optamos por escolher marcadores mitocondriais, já que ao analisarmos esses marcadores, poderemos estimar o número de linhagens maternas que deram origem às populações residentes nos diferentes sítios amostrados destas localidades (Avisé *et al.* 1987; Arias *et. al* 2003), além de, quando compararmos os resultados oriundos de diferentes populações, poderemos verificar se algumas se encontram isoladas. Conforme dito anteriormente, devido a características particulares das abelhas Centridini encontradas nos centros urbanos, esperamos encontrar as populações destas espécies estruturadas e, utilizando marcadores mitocondriais, poderemos testar a hipótese mediante a caracterização de haplótipos exclusivos de certas populações.

Após a extração e amplificação (PCR) de regiões específicas do DNA mitocondrial, alguns procedimentos podem ser realizados com este material, como

digestão com enzimas de restrição (RFLP-PCR) ou seqüenciamento das regiões amplificadas e posterior verificação das diferenças nucleotídicas. Como a análise de sequências é mais eficiente em revelar substituições nucleotídicas em relação à primeira técnica citada (RFLP-PCR), esta metodologia foi aqui utilizada para verificar o grau de diversidade e estruturação populacional para alguns genes mitocondriais de herança materna (COI, COII, RNAt^{Leu}, *cytb* e 16S).

2. OBJETIVO

Considerando as características acima apresentadas por este grupo de abelhas, sua importância ecológica e econômica, os riscos de um acentuado declínio populacional e a pouca informação disponível na literatura sobre a biologia e genética destas abelhas, o objetivo deste projeto foi testar a seguinte hipótese de trabalho: “devido a algumas características da biologia do organismo, as populações urbanas de abelhas Centridini são naturalmente estruturadas”.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Para este projeto foi amostrado um total de 729 indivíduos de *Centris* distribuídos em quatro espécies: *C. (Heterocentris) analis*, *C. (Hemisiella) tarsata*, *C. (Hemisiella) trigonoides* e *C. (Hemisiella) sp.* A Tabela 1 apresenta o material coletado nas localidades amostradas.

Tabela 1. Número de indivíduos de *Centris* amostrados neste projeto e seus respectivos locais de coleta.

	<i>Centris analis</i>		<i>Centris tarsata</i>		<i>Centris trigonoides</i>		<i>Centris sp.</i>	
	NM	NF	NM	NF	NM	NF	NM	NF
Jaboticabal-SP	89	72	18	10	14	2	0	0
Rifaina-SP	71	19	1	6	4	0	5	0
São Carlos-SP	41	32	10	1	0	0	0	0
Rio Claro-SP	52	17	0	0	0	0	0	0
Ribeirão Preto-SP	51	15	18	1	11	1	6	2
Catanduva-SP	25	8	0	0	2	0	0	0
Jeriquara-SP	12	9	0	1	0	0	6	0
Franca-SP	12	0	0	0	0	0	4	0
Duartina-SP	7	2	0	0	0	0	0	0
Indiaporã-SP	5	1	0	0	1	0	4	0
Pedregulho-SP	1	1	0	0	0	0	0	0
Sacramento-MG	6	16	0	0	0	0	8	1
Ituaçu-BA	14	5	0	0	0	0	0	0
Jequié-BA	2	1	1	0	4	0	0	0
	388	198	48	19	37	3	33	3
Total	586		67		40		36	

NM – número de machos coletados

NF – Número de fêmeas coletadas

Para cada cidade foi amostrado material oriundo de mais de um ponto distribuído ao longo da mesma, a fim de diversificar nosso material. Esta metodologia

se mostra importante uma vez que não sabemos como as populações destas espécies se distribuem no interior das cidades.

Nitidamente *C. analis* foi a mais abundante em relação às demais espécies, apresentando um número amostral aproximadamente dez vezes superior. Este resultado corrobora com demais trabalhos que realizaram levantamento em ambiente urbano (Camargo e Mazucato 1984; Silva *et al.* 2007) e localidades próximas às amostradas no presente projeto (Gaglianone 2001).

3.1.1. Locais de coleta

As Figuras 2, 3, 4 e 5 apresentam os mapas com as localidades geográficas nas quais foram coletadas as espécies analisadas neste trabalho. Estes mapas foram esquematizados com o auxílio do software DIVA-GIS (disponível em <http://www.diva-gis.org>). As cidades do estado da Bahia (Jequié e Ituaçu) não foram incluídas nos mapas devido à grande distância geográfica em relação às demais cidades. Ainda, a Tabela 2 demonstra as distâncias geográficas (Km) entre as cidades amostradas, estimando-se as distâncias entre sítios em linha reta.

Figura 2. Locais de coleta de *C. analis*.

Figura 3. Locais de coleta de *C. tarsata*.

Figura 4. Locais de coleta de *C. trigonoides*.

Figura 5. Locais de coleta de *Centris* sp.

Tabela 2. Distâncias geográficas (Km) entre as cidades de coleta.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1-Indiaporã	-													
2-Catanduva	190	-												
3-Duartina	286	151	-											
4-Jaboticabal	249	70	172	-										
5-Rib. Preto	293	122	215	54	-									
6-São Carlos	337	156	223	89	48	-								
7-Rio Claro	374	185	201	124	105	65	-							
8-Franca	309	177	295	125	82	106	171	-						
9-Pedregulho	285	170	302	130	100	131	196	32	-					
10-Jeriquara	296	184	314	141	108	138	201	33	13	-				
11-Rifaina	302	199	335	162	128	161	222	52	32	21	-			
12-Sacramento	298	214	353	181	152	184	248	76	53	45	25	-		
13-Ituaçu	1179	1152	1284	1114	1074	1077	1131	993	989	973	954	941	-	
14-Jequié	1283	1241	1372	1202	1155	1155	1203	1079	1073	1063	1042	1031	128	-

3.1.2. Procedimento de coleta

Os indivíduos foram coletados individualmente em tubos ou sacos plásticos durante visitas às flores de *Tecoma stans* (L) Kunth (Figura 6), espécie conhecida como amarelinho ou falso ipê-amarelo, encontrada nas cidades devido à sua utilização ornamental e paisagística (Kranz e Passini 1997).

Machos e fêmeas coletados foram dispostos em recipientes plásticos no gelo, e posteriormente levados para o Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros, da Universidade Federal de São Carlos (LGEH-UFSCar), onde foram preservados em álcool absoluto e armazenados a -20°C.

Figura 6. Coleta das abelhas utilizando tubos plásticos. Nesta foto foi coletado um indivíduo do gênero *Thygater* (Apidae: Eucerini) enquanto o mesmo forrageava. Foto: Diego Moure-Oliveira.

3.1.3. Período de coleta

O material oriundo de Rifaina, Jeriquara, Pedregulho e Sacramento já haviam sido coletados pelo Prof. Del Lama anteriormente ao início do projeto. Assim que o mesmo foi iniciado em agosto de 2011, as coletas tiveram seus primeiros indivíduos amostrados em Ribeirão Preto, porém, sem grande expressão numérica. Durante este segundo semestre de 2011, os poucos indivíduos amostrados pertenciam ao subgênero *Hemisiella* e a espécie *C. analis*, inicialmente como foco do projeto, não havia sido verificada forrageando nas flores.

Durante o verão, entre janeiro a março de 2012, machos e fêmeas foram coletados em algumas cidades, tanto para *C. analis* como para *C. (Hemisiella)* sp. Ao iniciar a estação fria, novamente estes organismos diminuíram suas atividades de forrageamento. Estas atividades se intensificaram durante o período quente, como já verificado por Gaglianone (2003), onde grande parte das espécies de Centridini foi coletada entre setembro e abril. Portanto, as coletas foram intensificadas a partir de

dezembro de 2012 e concluídas ao final de abril de 2013, obtendo um número amostral satisfatório para nossas análises.

3.2. Metodologia de análise

3.2.1 - Extração do DNA

Fragmentos de alguns genes mitocondriais, como as subunidades I e II do complexo da citocromo c oxidase (COI e COII), citocromo b (*cytb*) e subunidade maior do RNA ribossômico (16S) tiveram suas sequências nucleotídicas parcialmente determinadas, além do RNA transportador de Leucina (RNAt^{Leu}). A figura 7 apresenta uma esquematização da molécula do DNA mitocondrial de *Apis mellifera* e demonstra a localização estrutural das regiões gênicas analisadas neste projeto. O DNA genômico foi extraído do tórax ou das pernas dos indivíduos coletados utilizando o método fenol-clorofórmio proposto por Sheppard & McPheron (1991) ou o protocolo Chelex 100 (Walsh *et al.*, 1991), respectivamente.

Tabela 3. *Primers* utilizados para amplificação por PCR de genes mitocondriais

	<i>Primers</i>	<i>Referência</i>
COI	F: 5'-GGAGATCCAATTCTTTATCAAC-3'	F: Afonso (2012)
	R: 5'-GATATTAATCCTAAAAAATGTTGAGG-3'	R: Dick <i>et al.</i> (2004)
COI-COII	F: 5'-TCTATACCACGACGTTATTC-3'	Hall e Smith (1991)
	R: 5'-GATCAATATCATTGATGACC-3'	
Cytb	F: 5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3'	Crozier <i>et al.</i> 1991
	R: 5'-ATTACACCTCCTAATTAATTAGGAAT-3'	
Cytb	F: 5'-CGTTTAATTCAAYATAAAAYGG-3'	Koulianos <i>et al.</i> (1999) – modificado
	R: 5'-TATCATTCTGGTTTAATATG-3'	
16S	F: 5'-TTTTGTACCTTTTGTATCAGGGTTG-3'	Hall e Smith (1991)
	R: 5'-CTATAGGGTCTTATCGTCCC-3'	
16S	F: 5'-CACCTGTTTATCAAAAACATG-3'	Hall e Smith (1991)
	R: 5'-CGTCGATTTGAACTCAAATCATG-3'	

Os produtos de amplificação destas regiões foram purificados utilizando 1U de SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, GE) e 10U de *ExoI* (Exonuclease I, GE) para 8 µL de DNA extraído.

As seqüências *forward* e *reverse* foram obtidas diretamente a partir de produtos purificados da amplificação em seqüenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems) disponível no Laboratório de Biotecnologia da FCAV – UNESP de Jaboticabal, SP. Os eletroferogramas foram analisados no programa Codon Code versão 3.7.1 (CodonCode, Dedham, Massachusetts, United States). Após edição das seqüências, as mesmas foram alinhadas no programa MultAlin© (disponível em <<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>>) para verificação de possíveis substituições nucleotídicas.

3.2.3. Análise das sequências nucleotídicas

As sequências foram alinhadas mediante o programa *CLUSTAL W* (Thompson *et al.* 1994). Estes alinhamentos são ajustados manualmente no programa *BioEdit* (Hall 1999). O software BLAST (Altschul *et al.* 1990) foi utilizado para identificar similaridades entre as sequências obtidas e as disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Também foi utilizado o software NETWORK (Bandelt *et al.* 1999) para montar uma rede de haplótipos e verificar suas relações. Para verificação dos aminoácidos traduzidos e comparação entre espécies, foi utilizado o programa CodonCode versão 3.7.1 (CodonCode, Dedham, Massachusetts, United States).

3.2.4. Índices de diversidade genética

Para cada região gênica sequenciada foram analisados alguns índices de diversidade genética e estes parâmetros foram comparados entre os distintos genes. Os índices analisados neste projeto foram: diversidade haplotípica (H_d), que estima a probabilidade de amostrarmos dois haplótipos do total amostral e estes serem diferentes; diversidade nucleotídica (π), que representa o número médio de diferenças entre duas sequências (por sítio) retiradas ao acaso da amostra total e, por fim, sítios polimórficos (SP), índice que indica quantos sítios são variáveis em relação ao total do fragmento, demonstrando quanto aquele fragmento/gene é variável. Estes índices foram calculados com o auxílio do software DNAsp versão 5.10.1 (Librado e Rozas 2009).

3.2.5. Análise de estruturação populacional

Utilizando o software Arlequin, versão 3.1 (Excoffier *et al.* 2005) o nível de estruturação populacional foi estimado pela estatística F de Wright, que estabelece

quanto da diferenciação total é atribuída à diferenciação interpopulacional (F_{ST}). Para realizar esta estimativa, foi assumido um valor de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente, foi necessário caracterizar e analisar a variação intra-específica de todas as regiões gênicas sequenciadas para verificação de quais poderiam ser utilizadas de forma satisfatória. Foi verificada, então, uma dificuldade na interpretação dos resultados encontrados em *C. analis*. Como também amostramos indivíduos de outra espécie, estes foram analisados e assim puderam ser estimadas redes de haplótipos e árvores filogenéticas para então discutir as questões de colonização e estruturação.

Porém, quando as análises iniciaram, foi detectado um número superior ao esperado de espécies, pois o que inicialmente acreditávamos serem duas espécies – *C. analis* e *C. tarsata* - foi subdividido em quatro grupos de indivíduos.

Portanto, os resultados serão apresentados e discutidos em três partes. Na primeira, apresentaremos a dificuldade na identificação do material, descrevendo a variação interespecífica verificada no material coletado. Na segunda seção, o objetivo será caracterizar e analisar a diversidade intra-específica, selecionando as regiões gênicas que se adequam à análise; a terceira e última parte, em que deveremos discutir o teste da hipótese proposta neste projeto.

4.1. Variação interespecífica do DNA mitocondrial (DNAm) em populações urbanas de Centridini (Hymenoptera, Apidae).

Inicialmente, o projeto visava estudar apenas as populações urbanas da espécie *C. analis*, tendo em vista a abundância que esta espécie apresenta nos centros urbanos. Entretanto, durante as saídas a campo nas distintas cidades foi possível coletar outras espécies de Centridini, tanto *Centris* como *Epicharis*. Foi estabelecido, então, que estas espécies seriam utilizadas como grupos externos.

Quando consultada a literatura e verificados os trabalhos de levantamento em centros urbanos (Camargo e Mazucato 1986; Silva *et al.* 2007) juntamente com chaves de identificação (Ayala 1998; Silveira *et al.* 2002), constatamos que do subgênero *Heterocentris*, apenas amostras de *C. analis* foram coletadas, identificada em razão de características particulares da espécie, como diferentes colorações entre os sexos (machos possuem o abdômen preto, enquanto as fêmeas possuem o abdômen avermelhado), além do padrão de coloração, formato apical do clipeo e dos dentes mandibulares (Figura 8). Foram amostrados também poucos indivíduos do subgênero *Trachina*, caracterizados pela coloração em forma de T invertido no clipeo e porte corporal maior em relação às demais espécies amostradas; porém, estes espécimes não foram identificados ao nível de espécie. Por fim, ainda em *Centris*, também amostramos muitos indivíduos do subgênero *Hemisiella*, que foram caracterizados pelo porte corporal médio e ausência de coloração metálica, palpos maxilares com 2-4 palpômeros, clipeo sem faixa amarela longitudinal, fêmeas com margem apical do labro inteira, machos com fêmur e tíbia posteriores intumescidos e basitarsos posteriores com espinho, segundo dente mandibular menor que o terceiro e mais próximo do primeiro (Figura 9). Entretanto, em razão da falta de chaves de identificação das espécies, foi possível apenas chegar ao nível de subgênero para estes indivíduos.

Figura 8. Macho (à esquerda) e fêmea (à direita) de *C. analis*. Fonte: Rollin Coville Photographs (disponível em <<http://www.covillephotos.com/>>).

Figura 9. Caracteres utilizados para identificação do material: (A) Palpo maxilar com dois palpômeros; (B) Clípeo e labro de uma fêmea; (C) Perna posterior de um macho. Fêmur e tíbia são intumescidos e a seta indica o espinho no basitarso; (D) Mandíbula de um macho. Fotos: Diego Moure-Oliveira.

Ao recorrer aos levantamentos taxonômicos, não apenas em centros urbanos, mas também em localidades próximas, como a Estação Ecológica de Jataí (Gaglianone 2003), localizada no município de Luiz Antônio-SP, próximo a Ribeirão Preto-SP, percebemos que dentre as espécies de *Hemisiella* que poderíamos estar amostrando,

existia a ocorrência de duas espécies: *C. tarsata* e *C. trigonoides*, sendo a primeira notadamente mais abundante.

Entretanto, quando realizamos as primeiras análises com o gene *cytb* para estas abelhas, percebemos que as amostras do subgênero *Hemisiella* foram agrupadas em três clados distintos. A rede de haplótipos demonstra nitidamente a formação de três grupos (Figura 10), ocorrendo poucas mutações dentro de grupo (uma ou duas, na maior parte das vezes) e muitas mutações entre grupos (de quarenta a sessenta sítios polimórficos, aproximadamente).

Figura 10. Rede de haplótipos para o gene *cytb* de indivíduos do subgênero *Hemisiella*.

Analisando o nível de variação entre estes três grupos e outras espécies de abelhas, percebemos que os indivíduos destes distintos clados são mais próximos geneticamente entre si do que com as demais espécies, mesmo espécies do gênero *Centris* (Tabela 4). Somado ao fato destas abelhas apresentarem as características morfológicas já mencionadas, possivelmente estes indivíduos são do subgênero *Hemisiella*.

Tabela 4. Polimorfismo de nucleotídeos/aminoácidos (%) entre diferentes espécies.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	<i>C. inermis</i>	<i>C. flavifrons</i>	<i>A. mellifera</i>
Grupo 1	-	10,76 / 8,46	10 / 7,4	15,45 / 16	14,69 / 18,84	19 / 25,92
Grupo 2	-	-	9 / 5,18	16,79 / 16,68	16,58 / 19,71	20,1 / 24,87
Grupo 3	-	-	-	16,06 / 17,44	17,52 / 20,42	22 / 25,38
<i>C. inermis</i>	-	-	-	-	8,71 / 17,33	20,64 / 25,68
<i>C. flavifrons</i>	-	-	-	-	-	16,28 / 19,85
<i>A. mellifera</i>	-	-	-	-	-	-

O material coletado foi então levado ao laboratório do Prof. Dr. Carlos Garófalo para ser identificado pelo técnico José Carlos Serrano. Apesar do material estar conservado em álcool, comprometendo assim diversas estruturas notoriamente importantes na identificação destas abelhas, como cerdas e coloração, o especialista agrupou parte dos espécimes em duas espécies, *C. tarsata* e *C. trigonoides*. O terceiro grupo não foi possível identificar a espécie. Quando este material foi submetido a análises genéticas, a separação morfológica realizada foi corroborada. Assim, estes três grupos serão identificados neste projeto como *C. tarsata*, *C. trigonoides* e *Centris* sp.

Estes resultados demonstram a necessidade de incluir os métodos moleculares na identificação das espécies e a necessidade de uma ampla revisão taxonômica do gênero, notadamente para estas espécies que habitam centros urbanos e são importantes polinizadores da flora urbana.

4.2. Caracterização e variação intra-específica do DNA mitocondrial (DNAm_t) de algumas espécies de Centridini (Hymenoptera, Apidae).

4.2.1. Subunidades I e II do Complexo Citocromo c Oxidase (COI e COII) e RNA transportador de Leucina (RNAt^{Leu})

Para estas regiões gênicas, foram utilizados dois pares de *primers* delineados a partir do genoma mitocondrial de *Apis mellifera*. O primeiro par utilizado foi composto de um *primer forward* desenhado no laboratório (Afonso 2012) e por um *primer reverse* proposto por Dick *et al.* (2004) e corresponde a um fragmento de 629 pb da região COI. O segundo, foi proposto por Hall e Smith (1991) e corresponde a um fragmento de aproximadamente 850 pb para *A. mellifera*; este par de *primers* engloba o final da região COI, todo o RNAt^{Leu} e o início da região COII. O *primer reverse* do primeiro par sobrepõe o *primer forward* do segundo par e, assim, pudemos formar um fragmento com quase 1500 pb.

A qualidade da amplificação dos dois fragmentos foi excelente e a leitura do eletroferograma também não apresentou dificuldades, conforme mostra a Figura 11 (exceto para alguns sítios em *C. analis*, que será discutido posteriormente), evitando assim possíveis erros na leitura e equívocos na análise do resultado.

Figura 11. Eletroferograma da região COI para as quatro espécies de *Centris* analisadas neste projeto.

Para o primeiro fragmento (COI), analisamos um total de 163 sequências, sendo 116 para *C. analis*, 26 para *C. tarsata*, 36 para *Centris* sp. e apenas 3 para *C. trigonoides*. Para esta última espécie, foram poucos os resultados obtidos em razão de que esta região não amplificou para a maioria das amostras da espécie.

Para as três espécies do subgênero *Hemisiella* foi possível identificar nitidamente a variação intra e interespecífica devida a substituições nucleotídicas. No entanto, em *C. analis* ocorreu uma situação particular - em alguns sítios houve sobreposição de bases em uma posição definida (Figura 12).

Figura 12. Sítio com sobreposição de bases para COI de *C. analis*.

Este pico duplo sugere a ocorrência de heteroplasmia (Kmiec *et al.* 2006), ou seja, a presença de nucleotídeos distintos na mesma posição em diferentes moléculas de DNA presentes nas mitocôndrias do mesmo indivíduo.

Os primeiros resultados obtidos (primeiras 81 sequências) apresentaram esta sobreposição de picos no mesmo sítio para todos os indivíduos analisados. Ao desconsiderar esta posição, todo o restante do fragmento se apresentou igual para todos os indivíduos, apesar de procedentes de localidades como Ribeirão Preto, Rifaina, Jeriquara, Sacramento ou Jequié.

Como não encontramos nenhuma variação entre os indivíduos, esta região gênica não forneceu informações relevantes para analisar a estrutura genética desta espécie, o que nos levou a analisar outras regiões mitocondriais.

Após análises preliminares de outras regiões gênicas, resolvemos ampliar o número amostral para este gene para corroborar a ausência de variação neste fragmento para diferentes localidades. Ao analisarmos alguns indivíduos coletados em São Carlos, observamos que outros sítios, além do já relatado, apresentaram sobreposição de picos para todos os indivíduos analisados (Figura 13). Ressalta-se que, excluindo estes pontos

de picos duplos, todo o restante do fragmento é idêntico em todos os indivíduos sequenciados.

Figura 13. Novos sítios com sobreposição de bases.

Para verificar se existia alguma relação entre locais de coleta e a presença de pico duplo, repetimos diversos indivíduos e então constatamos que esta presença de sobreposições de base é um problema metodológico, pois os indivíduos que não apresentavam sobreposição inicialmente passaram a apresentar em um segundo sequenciamento (Figura 14).

Figura 14. Mesmo indivíduo em reações diferentes apresentou padrões distintos na leitura do eletroferograma, indicando uma questão metodológica a ser estudada.

Portanto, todas estas sequências que obtivemos para este gene para esta espécie não mostraram um resultado consistente e, assim, não foram considerados para posteriores discussões neste projeto.

Conforme dito anteriormente, as outras espécies de *Centris* analisadas neste trabalho não apresentaram dificuldades como esta apresentada e assim puderam ser analisadas sem maiores problemas. Foram feitas algumas repetições para certificar a repetibilidade de nossos resultados e os dados se mostraram robustos.

Primeiramente, precisávamos ter certeza se a região gênica obtida no sequenciamento era a mesma que desejávamos analisar. Para isso, haplótipos das três espécies foram submetidos a um alinhamento com outras sequências presentes no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Utilizando a ferramenta BLAST, verificamos que as sequências das três espécies alinhavam com alta similaridade (maior que 90%) com COI de *A. mellifera*, *Euglossa villosa* e *Bombus ignitus*. Estes resultados nos forneceram a segurança de que estávamos trabalhando com a região gênica desejada.

Analisando a composição nucleotídica destes fragmentos, verificamos que as mesmas seguem um padrão, onde adenina e timina juntas compõem mais de 70% das bases, enquanto citosina é a de menor frequência. Este padrão é também observado em outras abelhas (Tabela 5). As sequências das demais abelhas foram disponibilizadas por diversos autores e obtidas no NCBI (Crozier e Crozier 1993; Sheffield *et al.* 2009; Ferreira 2011; Cristiano *et al.* 2012; Williams *et al.* 2012; Françoso e Arias 2013).

Tabela 5. Composição nucleotídica de um fragmento do gene COI para diferentes espécies de abelhas.

Espécies da família Apidae	Composição Nucleotídica (%)			
	Adenina	Timina	Guanina	Citosina
<i>Centris tarsata</i> (Centridini)	34,02	43,40	12,88	9,70
<i>Centris trigonoides</i> (Centridini)	34,18	42,13	12,88	10,81
<i>Centris</i> sp. (Centridini)	34,82	41,34	12,56	11,29
<i>Anthophora furcata</i> (Anthophorini)	28,31	46,42	13,39	11,87
<i>Eulaema nigrita</i> (Euglossini)	33,23	45,69	11,60	11,25
<i>Partamona helleri</i> (Meliponini)	33,72	44,19	12,27	9,82
<i>Melipona scutellaris</i> (Meliponini)	35,08	41,97	12,30	10,66
<i>Bombus hypocrita</i> (Bombini)	34,50	40,38	12,88	12,24
<i>Apis mellifera</i> (Apini)	32,72	41,31	14,52	11,45

A Tabela 6 mostra os índices de diversidade estimados para esta região gênica para cada espécie analisada. Como poucos indivíduos foram seqüenciados para *C. trigonoides*, não foram estimados os valores para a mesma. Ressalte-se que para a primeira espécie, o tamanho do fragmento apresentou 628 pb, pois um dos indivíduos amostrados apresentou em um sítio uma incerteza na identificação da base, sendo representado por “N” e, como o software utilizado não considera esta variável na análise, esta posição foi excluída de todos os indivíduos, originando a diferença aparente.

Tabela 6. Índices de diversidade para o gene COI.

	Índices de Diversidade				
	N	Hd	π	SP	TF
<i>Centris tarsata</i>	26	0,474	0,00096	6	628
<i>Centris</i> sp.	36	0,502	0,00299	8	629

N – Número amostral SP – Sítios polimórficos

Hd – Diversidade haplotípica TF – Tamanho do fragmento (pb)

π – Diversidade nucleotídica

Para este gene, encontramos baixos valores de Hd e π quando comparados a outras regiões gênicas (ver adiante), o que pode ser justificado pelo baixo número

amostral. Porém, mesmo em amostras de localidades como Rifaina, Sacramento, Ribeirão Preto e Jeriquara, observamos pouca variação intra-específica.

Dentre os seis sítios polimórficos encontrados para *C. tarsata*, apenas um resulta em substituição de aminoácido, caracterizando uma substituição não-sinônima. Já em *Centris* sp., dos oito sítios variáveis, três resultam em alteração de aminoácido. Estes achados nos indicam uma alta conservação do gene quanto à mudança de aminoácido.

As sequências deste fragmento COI nas três espécies podem ser verificadas nas Figuras 15, 16 e 17, enquanto os sítios polimórficos de cada haplótipo encontrado e as respectivas mutações podem ser visualizados nas Tabelas 7 e 8. Para *C. trigonoides* não foi construída nenhuma tabela contendo os sítios polimórficos devido ao baixo número amostral analisado.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GGAGATCCAA TTCTTTATCA ACATTTATTT TGATTTTTTG GACATCCTGA AGTTTATATT TTAATTTTAC CAGGATTGGG ATTAATTTCT CAAATTATTA
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TAAATGAAAG AGGAAAAAAA GAAACATTTG GAAATTTAGG AATAATTAT GCTATATTAG GAATTGGGTT CTTAGGATTT ATTGTTTGAG CTCATCATAT
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ATTTACTGTT GGATTAGATG TTGATACTCG AGCTTATTTT ACTTCTGCTA CTATAATTAT TGCTGTACCT ACAGGAATTA AAGTTTTTAT ATGATTAGCA
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
ACTTATCATG GATCAAAATT AAATTTTAAT AATTCTATTA TATGATCTTT AGGATTTATT TTATTATTTA CAATTGGAGG ATTAACGGGA ATTATATTAT
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
CTAATTCTTC AATTGATATT ATTTTACATG ATACATATTA TGTGTGTTGG CATTITTCATT ATGTATTATC AATAGGAGCT GTATTTTCAA TTATTACAAG
      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
ATTAATTCAC TGATATCCCT TAATTACAGG ATTATTAATA AATAATAAAT GATTAAAAAT TCAATTTTTT ATAATATTTA TTGGAGTAAA TATAACATTT
      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
TTTCCTCAAC ATTTTTTAGG ATTAATATC

```

Figura 15. Sequência de parte do gene COI de *C. tarsata*.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GGAGATCCAA TTCTTTATCA ACATTTGTTT TGATTTTTTG GACATCCTGA AGTTTATATT TTAATTTTAC CAGGATTGGG ATTAATTTCA CAAATTATTA
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TAAATGAAAG AGGAAAAAAA GAAACATTTG GAAATTTAGG TATGATTTAT GCAATATTAG GAATTGGATT TTTAGGATTT ATTGTTTGAG CTCATCATAT
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ATTCACAGTA GGATTAGATG TTGACACTCG AGCTTACTTT ACTTCTGCTA CAATAATTAT TGCTGTACCT ACAGGAATTA AAGTTTTTAT GTGATTAGCT
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
ACCTATCATG GATCAAAATT AAATTTTAAT AATTCATTA TATGATCATT AGGATTTATT ATATTATTTA CAATTGGAGG ATTAACAGGT ATTATATTAT
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
CTAATTCTTC TATTGATATT ATTTTACATG ATACATATTA TGTGTAGGA CATTITCACT ATGTACTATC TATAGGAGCT GTATTTTCAA TCATTACAAG
      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
ATTAATTCAT TGATTTCCCT TAATTACTGG ATTATTAATG AATAATAAAT GATTAAAAAT TCAATTTTTT ATAATATTTA TTGGTGTAAG TATAACATTT
      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
TTTCCTCAAC ATTTTTTAGG ATTAATATC

```

Figura 16. Sequência de parte do gene COI de *C. trigonoides*.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GGAGATCCAA TTCTTTATCA ACATTATTTT TGATTTTTTG GTCATCCTGA AGTTTATATT TTAATTCCTC CAGGATTTGG ATTAATTTC CAAATTATTA
     110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TAAATGAAAG AGGAAAAAAA GAAACATTG GAAATTTAGG AATAATCTAT GCAATACTAG GAATTGGATT TTTAGGATTT ATTGTTGAG CACATCATAT
     210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ATTACAGTA GGATTAGATG TAGATACCCG AGCTTATTTT ACTTCAGCAA CAATAATTAT TGCTGTACCT ACAGGAATTA AAATTTT TAGATTAGCT
     310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
ACTTACCATG GATCAAAATT AAATTTTAAT AATCAATTA TATGATCATT AGGATTCATT ATACTATTTA CCATCGGAGG ATTAACAGGA ATTATATTAT
     410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
CTAATTCCTC TATTGATATT ATTTTACATG ATACATATTA TGTTGTTGGA CATTTTCATT ATGTATTATC AATAGGAGCT GTATTTTCTA TTATTACAAG
     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
ATTAATTCAT TGATTTCCTT TAATCACTGG ATTATTAATA AATAATAAAT GATTAAAAAT TCAATTTTTT ATAATATTTA TTGGTGTAAG TATAACATTT
     610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
TTCCTCAAC ATTTTITAGG ATTAATATC

```

Figura 17. Sequência de parte do gene COI de *Centris* sp.

Tabela 7. Sítios polimórficos detectados no gene COI de *C. tarsata*.

Sítios Polimórficos						
COI	102	114	168	249	387	465
H1	A	A	G	T	G	A
H2	A	A	G	A	G	A
H3	A	A	T	T	G	A
H4	G	A	G	T	G	A
H5	A	A	G	T	A	A
H6	A	G	G	T	G	A
H7	A	A	A	T	G	A
H8	A	A	A	T	G	G

Tabela 8. Sítios polimórficos detectados no gene COI de *Centris* sp.

Sítios Polimórficos								
COI	61	213	270	306	309	357	444	589
H1	T	A	T	C	T	C	T	A
H2	T	A	T	C	T	C	T	T
H3	T	A	T	C	T	C	C	A
H4	C	G	T	T	C	C	T	A
H5	C	A	A	T	C	T	T	A

As Tabelas 7 e 8 nos indicam que a primeira metade do fragmento é mais variável em relação à segunda metade; considerando que este fragmento sequenciado

inicia na metade do gene, podemos perceber que a porção mediana desta região gênica apresenta mais variação do que a extremidade final.

O segundo fragmento também foi seqüenciado para as quatro espécies. Para *C. analis* foram analisados 93 indivíduos e estes apresentaram um fragmento de 664 pb, diferentemente do previsto para *A. mellifera*, que é de aproximadamente 850 pb. Esta diferença pode ser explicada pela ausência nesta espécie de *Centris* da região intergênica presente no DNAm^t da abelha melífera (Crozier e Crozier 1993), entre a região RNAt^{Leu} e COII.

Como já observado para o primeiro fragmento, todos os indivíduos da espécie *C. analis*, quando alinhados, possuem exatamente a mesma sequência, exceto em uns poucos sítios com picos duplos, compartilhados por todos (figura 18).

Figura 18. Sequência de COI de *C. analis* com sobreposição de base.

Semelhantemente ao primeiro fragmento, foram seqüenciados novamente alguns indivíduos e estes apresentaram picos duplos onde anteriormente não fora verificado (Figura 19), tanto para a região correspondente ao gene COI como para COII. Frente à

falta de repetibilidade dos resultados, estes não foram considerados para uma discussão mais elaborada.

Figura 19. Mesmo indivíduo apresentando leitura distinta no eletroferograma da região COI.

Apesar deste fragmento não poder ser utilizado para trabalharmos a estrutura genética das populações de *C. analis*, pudemos observar que esta espécie não apresenta região intergênica entre RNAt^{Leu} e COII. Ainda, a sequência gênica do transportador de leucina se apresentou igual em todos os indivíduos, mesmo estes sendo de localidades diferentes. O tamanho para esta região foi de 68 pb e sua composição nucleotídica foi verificada, juntamente com outras espécies de abelhas. Vale ressaltar que, apesar de COI e COII de *C. analis* não serem utilizados na análise comparativa com as demais espécies devido aos picos duplos, a região RNAt^{Leu} apresentou uma leitura muito confiável, sem a presença de picos duplos (Figura 20), razão pela qual estes dados foram utilizados na análise conjunta das espécies.

Figura 20. Eletroferograma de RNAt^{Leu} para alguns indivíduos de *C. analis*.

Para as demais espécies de *Centris* este fragmento não apresentou problemas na interpretação dos resultados e assim pudemos utilizar esta região na análise. Novamente, foram feitas algumas repetições e estas confirmaram a repetibilidade dos nossos resultados.

No total, foram seqüenciadas 42 amostras, sendo 21 de *C. tarsata*, 20 de *Centris* sp. e apenas uma de *C. trigonoides*. Novamente, esta última espécie apresentou um baixo número amostral devido à dificuldade de amplificar esta região.

Os fragmentos apresentaram tamanhos distintos para cada espécie, sendo, aproximadamente, 750 pb para *C. trigonoides*, 830 pb para *Centris* sp. e mais de 900 pb para *C. tarsata*. Para esta última não foi possível resgatar os *primers* nas extremidades da sequência; portanto, podemos concluir que este fragmento possui um número maior do que o obtido. Entretanto, como este par de *primers* abrange três regiões gênicas, foi necessário, primeiramente, reconhecer estas regiões para então analisá-las separadamente.

A primeira porção do fragmento representa a região COI e em *A. mellifera* este fragmento corresponde a, aproximadamente, 260 pb. Nas espécies *C. trigonoides* e *Centris* sp., a região COI apresenta tamanho semelhante; para *C. tarsata*, conforme dito anteriormente, não foi possível realizar a leitura do fragmento total, e assim não recuperamos toda a porção referente ao COI, impossibilitando afirmar o tamanho e todas as mutações nesta região.

Nesta porção é possível verificar apenas uma mutação em *Centris* sp. e dois sítios polimórficos em *C. tarsata*, onde poucos indivíduos compartilham a mutação, sendo que apenas uma mudança desta última espécie é uma substituição não-sinônima.

A composição nucleotídica para esta primeira região deste fragmento pode ser verificada na Tabela 9; as demais sequencias analisadas foram disponibilizadas por

alguns autores no NCBI (Crozier e Crozier 1993; Williams *et al.* 2012). Para este fragmento não foram estimados os índices de diversidade devido à baixa variação encontrada já relatada.

Tabela 9. Composição nucleotídica do segundo fragmento do gene COI para diferentes espécies de abelhas.

Espécies da família Apidae	Composição Nucleotídica (%)			
	Adenina	Timina	Guanina	Citosina
<i>Centris tarsata</i> (Centridini)*	38,61	45,54	5,94	9,90
<i>Centris trigonoides</i> (Centridini)	37,36	44,91	6,04	11,70
<i>Centris</i> sp. (Centridini)	36,98	44,53	6,04	12,45
<i>Bombus hypocrita</i> (Bombini)	39,02	41,29	6,44	13,26
<i>Apis mellifera</i> (Apini)	38,64	42,05	6,06	13,26

* não corresponde ao fragmento total

Diferentemente do observado no primeiro fragmento, onde citosina era o nucleotídeo menos representado, nesta porção do gene COI a base guanina apresentou a menor frequência; em contrapartida, adenina e timina novamente compõem mais de 80% do fragmento. Isto mostra uma maior concentração de citosina em relação à guanina na extremidade da molécula em relação ao interior.

Este resultado corrobora com o observado anteriormente, onde constatamos que a porção interna do gene COI se apresentou mais variável em relação à extremidade; conforme dito, este fragmento representa o final do gene e nitidamente esta porção apresenta poucas mutações para as espécies analisadas.

O final das regiões gênicas codificadoras de proteínas é reconhecido pela presença do códon de terminação TAA; no trabalho de Crozier e Crozier (1993), é revelado que para *A. mellifera* particularmente o gene COI termina não com este códon, mas sim apenas com o nucleotídeo T. O gene COII também é citado com esta característica, porém na sequência que o autor disponibiliza no trabalho, isto não é

verificado. Para todas as nossas sequências, foi possível observar no final do gene o códon de término, mesmo ocorrendo uma mutação não-sinônima entre estas sequências analisadas e a abelha melífera no último códon.

As sequências do segundo fragmento de COI para as três espécies podem ser visualizadas nas Figuras 21, 22 e 23. Como existem poucas variações neste fragmento, foi demonstrada apenas a sequência mais comum.

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
ATTGGTCTT TAATTACAAT TAATAGAATA ATTTTATTAA TTTTATTAT TTTTGAATCA TTAATTGCTA AACGATTAA TTTATTAAA TTTAATCAAT
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
CTTCATTAGA ATGAATAATA CCATTTTATC CACCTTTAGA TCATTCTTTC TTAGAAATAC CAATAATTTT TAAGAATAAA AAGAATACTT TTTTAAATTA
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
AA

```

Figura 21. Sequência do segundo fragmento de COI de *Centris tarsata*.

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
TCTATACCAC GACGTTATTC AGATTATCCA GATTCTTATT ATTGTTGAAA TTTAATTCTC TCAATTGGAT CATTAATTAC TATTAATAGA ATAATTTTAT
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TAATTTTAT TATTTTGAAT TCATTAAATAG CTAAACGATT AATTTTATTT AAATTTAATC AATCTTCTTT AGAATGAATA ATACCATTCT ATCCTCCTTT
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
AGATCATTC TTTTGAATAA TACCAATAAT TTTAAAAAAT AAAAAAATA CTTCTTTTAA TTAAT

```

Figura 22. Sequência do segundo fragmento de COI de *Centris trigonoides*.

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
TCTATACCAC GACGTTATTC AGATTATCCA GATTCTTATT ATTGTTGAAA TTTAATTCTC TCAATTGGAT CATTAATTAC AATTAATAGA ATAATTTTAT
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TAATTTTAT TATTTTGAAT TCATTAAATG CAAAACGATT AATTTTATTT AAATTTAATC AATCTTCTTT AGAATGAATA ATACCATTCT ATCCTCCTTT
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
AGATCATTC TTTTGAATAA TACCAATAAT TTTAAAAAAT AAAAAAATA CTTCTTTTAA TTAAT

```

Figura 23. Sequência do segundo fragmento de COI de *Centris* sp.

Ao final da região COI em *A. mellifera* inicia o transportador; entretanto, para as abelhas analisadas de Centridini ocorre uma pequena região intergênica entre estes genes, abrangendo aproximadamente 11 pb para *C. analis*, 28 pb para *Centris* sp., 30 pb para *C. trigonoides* e mais de 340 pb para *C. tarsata*.

A ausência ou presença desta região entre genes parece ser variável dentro da subfamília Apinae, pois enquanto *Melipona bicolor*, igual a abelha melífera, não possui

esta região entre estes genes, outros grupos de abelhas possuem, como as espécies de Centridini aqui analisadas e *Bombus hypocrita* (aprox. 40 pb).

C. analis não apresentou nenhuma variação nesta região dentre todas as 93 sequencias analisadas; já para *Centris* sp. encontramos três *gaps* entre os 20 indivíduos; para *C. tarsata*, vemos oito mutações, sendo três trocas de nucleotídeos e cinco *gaps* ao longo das 21 amostras. A presença destas mutações não guarda relação com a procedência das amostras.

O RNAt^{Leu} pode ser observado em todas as espécies analisadas e suas formas estruturais foram reconstruídas (Figura 24). A composição nucleotídica deste fragmento encontra-se na Tabela 10 e as demais sequencias analisadas foram disponibilizadas no NCBI por alguns autores (Crozier e Crozier 1993; Cristiano *et al.* 2012; Williams *et al.* 2012).

Tabela 10. Composição nucleotídica do RNAt^{Leu} para diferentes espécies de abelhas.

Espécies da família Apidae	Composição Nucleotídica (%)			
	Adenina	Timina	Guanina	Citosina
<i>Centris tarsata</i> (Centridini)	43,84	39,73	9,59	6,85
<i>Centris trigonoides</i> (Centridini)	42,65	42,65	8,82	5,88
<i>Centris</i> sp. (Centridini)	38,57	47,14	10,00	4,29
<i>Centris analis</i> (Centridini)	42,11	44,74	7,89	5,26
<i>Melipona scutellaris</i> (Meliponini)	41,79	44,78	8,96	4,48
<i>Bombus hypocrita</i> (Bombini)	40,30	41,79	10,45	7,46
<i>Apis mellifera</i> (Apini)	42,68	38,57	11,43	7,14

Novamente podemos verificar a grande quantidade de A+T presente no DNAm^t de insetos em relação a G+C. Porém, vale ressaltar que timina não foi a mais representativa que adenina em todas as espécies, mostrando um relativo equilíbrio entre estas bases, diferentemente do encontrado em COI.

Por fim, foi observada pouca variação neste gene, onde *C. analis* não apresentou nenhuma em 93 amostras, enquanto apenas um indivíduo de *Centris* sp. e um de *C. tarsata* apresentaram uma substituição nucleotídica cada dentre todos analisados. Portanto, este marcador se mostrou bem conservado intra-especificamente, e, para estas espécies pelo menos, não fornecerá informações relevantes a respeito de variação populacional.

Esta pouca variação se deve ao fato das mutações intra-específicas ficarem limitadas às alças (loops) T ψ C e D do transportador (figura 24), uma vez que as demais regiões são mais conservadas, decorrente ao emparelhamento de bases, como observado nos braços, ou devido a especificidade do transportador, como nas regiões de anticódon e aceptador (Silvestre 2006).

Figura 24. Forma estrutural do RNAt^{Leu} para as quatro espécies de *Centris*. A barra vermelha indica o anticódon e as bases verdes indicam onde ocorreu variação intra-específica na análise.

Em *A. mellifera*, entre o RNAt^{Leu} e COII existe uma grande região intergênica, com pouco menos de 200 pb. *Bombus hypocrita* também apresenta esta região, abrangendo 74 pb, enquanto *Melipona bicolor* não possui este fragmento. Para *Centris* sp. essa região abrange quase 180 pb; em *C. trigonoides* encontramos apenas 71 pb;

para *C. tarsata* não verificamos nenhuma região intergênica. Igual para *C. analis*, não é vista nenhuma região intergênica nesta localidade.

Vale ressaltar que, o que foi encontrado em *C. tarsata* pode representar uma migração do transportador, e por isso em uma das extremidades encontramos uma região muito representativa em relação às demais espécies e em outra extremidade não. Apesar da estrutura gênica do DNAm_t ser muito conservada, é comum ocorrer migrações dos RNAt entre uma região e outra quando comparadas diferentes espécies e grupos de abelhas (Silvestre 2006).

Também, o trabalho de Ferreira *et al.* (2013) revela que a espécie *C. aenea* apresentou um fragmento de 600-650 pb quando amplificado com este pra de *primers*, revelando assim uma possível ausência destas duas regiões intergênicas, igual visto para *C. analis*.

Finalmente, após esta região inicia a subunidade II do citocromo c oxidase. O par de *primers* utilizados recupera os primeiros 320 pb deste gene. Como não existem inserções e deleções nesta região gênica, todas as espécies analisadas apresentaram o mesmo tamanho de fragmento, com exceção de *C. tarsata*, que, conforme dito anteriormente, não foi possível uma reação que abrangesse o fragmento total. Portanto, para esta última conseguimos 270 pb da região COII. A Tabela 11 revela a composição nucleotídica deste fragmento; novamente, as demais sequencias analisadas foram disponibilizadas por alguns autores no NCBI (Crozier e Crozier 1993; Cristiano *et al.* 2012; Williams *et al.* 2012).

Tabela 11. Composição nucleotídica do fragmento do gene COII para diferentes espécies de abelhas.

Espécies da família Apidae	Composição Nucleotídica (%)			
	Adenina	Timina	Guanina	Citosina
<i>Centris tarsata</i> (Centridini)*	38,89	45,56	5,56	10,00
<i>Centris trigonoides</i> (Centridini)	37,50	44,69	6,25	11,56
<i>Centris</i> sp. (Centridini)	37,81	45,94	5,94	10,31
<i>Melipona scutellaris</i> (Meliponini)	38,75	48,75	4,06	8,44
<i>Bombus hypocrita</i> (Bombini)	37,81	47,19	4,37	10,62
<i>Apis mellifera</i> (Apini)	37,81	47,50	5,31	9,38

*não corresponde ao fragmento total

Podemos perceber que novamente citosina foi mais representativa que guanina, igual ao segundo fragmento de COI que analisamos. Este resultado nos mostra que as extremidades dos genes do citocromo c oxidase apresentam mais citosinas em relação a guanina e esta proporção muda conforme analisamos o interior.

Quanto à variação intraespecífica, este gene se apresentou muito conservado comparado à subunidade I, pois para *Centris* sp. e *C. tarsata* vemos um indivíduos com uma mutação e dois indivíduos com uma mutação cada, respectivamente. As três substituições são sinônimas.

Todas as regiões codificadoras do genoma de *A. mellifera* iniciam ou com metionina (ATG ou ATA) ou com isoleucina (ATC ou ATT) (Crozier e Corizier 1993). Nesta análise observarmos que todas as espécies de *Centris* iniciam a subunidade II com o aminoácido isoleucina, apesar de ocorrer uma mutação interespecífica nesta região inicial entre *C. trigonoides* e as demais espécies.

As sequencias completas da subunidade II estão nas figuras 25, 26 e 27. Novamente, como não houve muita variação neste fragmento, esta representada a sequência mais comum de cada espécie.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
ATTGCTACAT GATATATAAT AAGTTTACAA AATTCAAAC CAGTTTACTG TGATAATTTA ATTCCTTTC ATAATTACAC ATTTATATTA ATATTAATGA
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TTATTACTTT TACATTAAAT ATTATATATA AAATTGTGAA TAATAAATTT ATTAATCGAT TTATATTAAA ACACCATACA TTAGAAATTA TTTGAACAAT
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
TGTTCCAATT TTAATTTTAT TATCAATTTG TTTTCCATCT TTAAAAATTC TATATATATT AGATGATAT

```

Figura 25. Sequência do fragmento de COII de *Centris tarsata*.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
ATCGCTACAT GATTTATAAT AAGTTTACAA AATTCTAATT CTTTATATTG TGATAATTTA ATTCATTTC ATAATTATAC ATTTACATTA ATATTAATAA
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TCATTACTTT TACTATAAAT ATAATATTTA AAATTGTAC AAATAAATTC ATTAACCGAT TTATATTAAA ACACCATACA TTAGAAATTA TTTGAACAAT
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CATTCCATTT TTAGTGTAT TATCAATTTG TTTTCCATCT TTAAAAATTC TTTATATACT AGATGATATT ATAGAACCTT TAATTCTAT TAAAGTTATT
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
GGTCATCAAT GATATTGATC

```

Figura 26. Sequência do fragmento de COII de *Centris trigonoides*.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
ATTGCTACAT GATTTATAAT AAGTTTACAA AATTCTAATT CATTATATTG TGATAATTTA ATTCATTTC ATAATTATAC ATTTATATTA ATATTAATAA
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TTATTACTTT TACTATAAAT ATAATATTTA AAATTGTAC AAATAAATTT ATTAACCGAT TTATATTAAA ACATCACACA TTAGAAATTA TTTGAACAT
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
TATTCCTATC TTAGTTCCTT TATCAATTTG TTTTCCATCT TTAAAAATTC TATATATATT AGATGATATT ATAGAACCTT TAATTCAAT TAAAGTTATT
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
GGTCATCAAT GATATTGATC

```

Figura 27. Sequência do fragmento de COII de *Centris* sp.

As subunidades I e II do citocromo c oxidase fazem parte de um complexo gênico codificador de proteínas transmembranas envolvido no transporte de elétrons e fosforilação oxidativa em organismos eucariotos. Este complexo, no total, possui três subunidades, e apesar da subunidade III (COIII) possuir poucos estudos, as subunidades I e II vêm sendo amplamente estudadas.

Estruturalmente, o citocromo c oxidase apresenta suas subunidades entre as regiões codificadoras ND2 e ND3 em *Apis mellifera* (Crozier e Crozier 1993), *Melipona bicolor* (Silvestre *et al.* 2008) e *Bombus ignitus* (Cha *et al.* 2007), sendo que COI e COII se encontram separadas apenas pela região RNAt^{Leu}, conforme observado em nossas análises, e COIII possui a região gênica ATPase que a separa das outras subunidades. O tamanho deste gene é de aproximadamente 1560 pb para COI e 670 pb

para COII de *A. mellifera* (Crozier e Crozier 1993). Nosso trabalho conseguiu resgatar praticamente metade de cada subunidade.

Por serem regiões codificadoras de proteínas, estes genes possuem uma taxa de conservação alta ao longo das linhagens evolutivas. Nos insetos, COI é a região gênica mais conservada quanto à substituição de aminoácidos, seguida por COII (Simon *et al.* 1994). Os resultados deste trabalho mostraram uma maior conservação do fragmento inicial da subunidade II em relação à I, porém este fato pode ser explicado pela maior variação vista no interior do gene em relação à extremidade.

Apesar disso, o alto índice encontrado de substituições sinônimas em ambas regiões gênicas corroboram com a afirmação de que o citocromo c oxidase é altamente conservado neste grupo de animais.

Em abelhas, Ferreira (2010) também relata que, ao analisar o gene COI de *Partamona helleri*, uma espécie de abelha sem ferrão, apesar de ocorrer doze sítios polimórficos entre os indivíduos analisados, nenhuma destas substituições nucleotídicas resulta em troca de aminoácidos; em contrapartida, o gene *cytb* destes mesmos indivíduos apresentaram 21 substituições nucleotídicas e sete trocas de aminoácidos.

Em um estudo de Nigro *et al.* (1991) com três espécies de *Drosophila* revela que, quando comparada a região COI e ND2 entre estas espécies de dípteros, a quantidade de sítios polimórficos são semelhantes (14,4% para COI e 18,8% para ND2); porém, quando verificado quantos destes sítios polimórficos resultavam em substituições não-sinônimas, ou seja, com troca de aminoácidos, do total de substituições no gene ND2, 19,6% resultavam em trocas de aminoácidos enquanto para COI este número era reduzido para 1%.

Apesar destas subunidades serem alvo de muitos estudos, elas são muito conservadas e talvez, quando estudadas isoladamente, não forneçam informações

suficientes para esclarecer determinadas questões. Por exemplo, o estudo de Estoup *et al.* (1996) relata ocorrer apenas três haplótipos para a região COII entre treze populações europeias de *Bombus terrestris* amplamente distribuídas geograficamente (ilha e continente), enquanto Widmer *et al.* (1998) e Pirounakis *et al.* (1998) verificaram em *B. terrestris* e *B. pascuorum* (organismo com distribuição semelhante à *B. terrestris*), respectivamente, uma maior variação genética quando analisado o gene *cytb*.

4.2.2. Citocromo b (*cytb*)

Inicialmente foi utilizado um par de *primers* delineado a partir do genoma mitocondrial de *Apis mellifera* por Crozier *et al.* (1991). Estes *primers* já haviam sido utilizados com sucesso em nosso laboratório não apenas para *Apis mellifera*, mas também em *Euglossa cordata* (Oi 2010) e *Partamona helleri* (Ferreira 2010). O tamanho previsto para este fragmento é de 485pb.

Para *C. analis*, foram obtidas 56 sequências para este gene de amostras procedentes de localidades distintas: 22 de Ribeirão Preto, 17 de Sacramento, 12 de Rifaina e cinco de Jeriquara. A qualidade do produto amplificado foi boa; no entanto, após o sequenciamento, novamente não foi possível obter um resultado passível de interpretação, dado que a maioria das sequências apresentava vários sítios nos quais era possível verificar a sobreposição de dois picos (Figura 28). Quando verificado se existia relação entre indivíduos oriundos de um mesmo local e sobreposição de picos, esta relação não foi verificada. Novamente, com exceção destes sítios com picos duplos, todo o restante do fragmento foi idêntico em todos os indivíduos sequenciados.

Figura 28. Gene *cytb* para *C. analis*. Excesso de picos duplos dificulta a interpretação dos resultados.

Com o objetivo de tentar contornar esta dificuldade, sequenciamos outros 20 indivíduos também para o gene *cytb*, porém para uma região diferente, onde o novo *primer* F iniciava-se, aproximadamente, 150 pb antes do *primer* F utilizado anteriormente. Este novo par de *primer* foi proposto por Koulianos *et al.* (1999) e o fragmento amplificado possui cerca de 580 pb. Entretanto, mais uma vez, o elevado grau de picos sobrepostos dificultou a interpretação dos resultados.

Por fim, como estas regiões se sobrepõem, verificamos se havia alguma relação entre as sequências obtidas com os dois *primers* nos mesmos indivíduos. A Figura 29 mostra que, apesar de algumas sobreposições se corresponderem nas diferentes sequências, algumas outras não se repetem, demonstrando um artefato de reação.

Figura 29. Mesmo indivíduo de *C. analis* sendo sequenciado com *primers* distintos para *cytb*. As regiões se sobrepõem, porém não verificamos o mesmo padrão no eletroferograma.

Para as demais espécies do gênero *Centris* analisadas neste projeto o *primer* proposto por Koulianos *et al.* (1999) para a região do citocromo b se mostrou muito útil e devido à isso foi a região gênica que mais teve indivíduos sequenciados. No todo, foram sequenciados 66 indivíduos de *C. tarsata*, 38 para *C. trigonoides* e 34 para *Centris* sp., totalizando 147 sequências. Diferentemente de *C. analis*, o eletroferograma não apresentou nenhuma dificuldade para a interpretação dos resultados, extinguindo qualquer equívoco na leitura (Figura 30).

Figura 30. Leitura do eletroferograma para o gene *cytb* para as espécies de *Centris*.

Para nos assegurar que estávamos trabalhando com o gene *cytb*, utilizamos a ferramenta BLAST para verificar com quais sequências nossos resultados apresentavam alta similaridade. Encontramos, para as três espécies, um alto índice de semelhança com citocromo b de *A. mellifera* e *Centris inermis*, além de muitas espécies de Euglossini, superando 80% de similaridade.

Quando verificamos a composição nucleotídica deste fragmento (Tabela 12), verificamos que igualmente aos demais genes analisados, mais de 70% das bases são adenina ou timina; porém, pudemos observar que para esta região, guanina é a menos

representativa. As demais sequências analisadas foram obtidas no NCBI, anteriormente disponibilizadas por Crozier e Crozier (1993), Leys *et al.* (2000) e Darveau *et al.* (2005).

Tabela 12. Composição nucleotídica de um fragmento do gene *cytb* para diferentes espécies de abelhas.

Espécies da família Apidae	Composição Nucleotídica (%)			
	Adenina	Timina	Guanina	Citosina
<i>Centris tarsata</i> (Centridini)	33,56	44,40	9,29	12,74
<i>Centris trigonoides</i> (Centridini)	33,56	43,72	8,95	13,77
<i>Centris</i> sp. (Centridini)	34,60	42,51	8,78	14,11
<i>Centris inermis</i> (Centridini)	32,43	46,31	9,55	11,71
<i>Euglossa analis</i> (Euglossini)	37,0	43,50	9,44	10,06
<i>Eufriesea venusta</i> (Euglossini)	34,67	45,98	9,13	10,22
<i>Xylocopa violacea</i> (Xylocopini)	33,12	47,84	8,44	10,61
<i>Apis mellifera</i> (Apini)	37,83	44,24	7,45	10,48

Diferentemente do gene COI, esta região gênica já apresentou um nível de variação intra-específica maior. A Tabela 13 nos mostra a diversidade genética estimada de cada espécie.

Tabela 13. Índices de diversidade genética para o gene *cytb*.

	Índices de Diversidade				
	N	Hd	π	SP	TF
<i>Centris tarsata</i>	66	0,877	0,00361	22	555
<i>Centris trigonoides</i>	38	0,853	0,00904	28	567
<i>Centris</i> sp.	34	0,724	0,00230	10	534

N – Número amostral SP – Sítios polimórficos

Hd – Diversidade haplotípica TF – Tamanho do fragmento (pb)

π – Diversidade nucleotídica

Comparando estes índices de diversidade com os encontrados para os genes anteriormente analisados, percebemos que a região do citocromo b se apresenta bem

mais variável. *Centris* sp., que apresentou um número amostral semelhante ao analisado para COI, mostra valores de Hd e π muito superior ao encontrado para o outro gene.

As sequências completas do fragmento mais comum por espécie podem ser visualizadas nas Figuras 31, 32 e 33 enquanto os sítios polimórficos são demonstrados nas Tabelas 14, 15 e 16. Os haplótipos revelados nestas tabelas foram os encontrados para cada espécie.

Quanto à formação de aminoácidos, vemos que das 22 substituições nucleotídicas que ocorrem em *C. tarsata*, quatro alteram o aminoácido codificado; em *C. trigonoides*, dentre as 41 mutações, quatro são não-sinônimas; finalmente, nenhuma das substituições em *Centris* sp. resulta em alteração de aminoácido.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
TAAATGGGCG TTCATTTTAT TTTATAATAA TATATACTCA TATTGCTCGA AATTATATATT ATTGTTTCATT TACTTTAACT CATACATGAA TAATTGGTGT
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
AACTATTTTA TTATTATCAA TAGCAACAGC ATTTTTAGGT TATATTTTAC CATGAGGACA AATATCTTTT TGAGGAGCTA CAGTAATTAC TAATCTTTTT
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
TCAGCTATTC CTTATATTGG ATCAATATTT GTTGAATGAA TTTGAGGAGG TTAATCAATT AATAATGCTA CTTTAAATCG ATTTTTCATC TTACATTTTA
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
TTTACCTTTT TGTAATTCCT GTATTAGTAA TTTTACATTT ATTTTATTTA CATCAACAGC GATCAAATAA TCCTTTTGGG TTTAATAGAA ATCTTTATAA
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
AATCCATTTT AATCCATATT TTACAATTAA AGATTTAATT GGATTTTATA TAATCTTAAT ATTATTTTTT TTTATTATTT TAAAATCTCC TTATCAATTT
      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
AGAGATCCAG ACAATTTTAA AATGCGCAAT CCAATATCTA CTCCAACTCA TATTA

```

Figura 31. Sequência do haplótipo comum para *cytb* de *C. tarsata*.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
CGTTTAATTC ATATAAATGG AGCTTCTTTT TATTTTATAA TAATATACAT TCATATTGCT CGAAATTTAT ATTATTATTC ATTTTCATTA ACTCATACTT
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GAATAATTGG AGTAACAATT ATATTAATAT CTATAGCAAC AGCATTTTATA GGATATATTTC TTCCATGAGG ACAAATATCA TTCTGAGGAG CTACAGTAAT
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
TACAAATTTA TTTTCAGCTA TCCCTTATAT TGGATCTATA TTTGTTGAAT GAATCTGAGG AGGTACTCA ATTAATAACG CTACTCTAAA TCGATTTTTC
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
TCTTTACATT TTATTTTACC TTTCATTATT CTTATATTAG TAATTTTACA TTTATTTTAC TTACATATTA CAGGATCTAG AAATCCCTTA GGATTTGATA
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
GAACTTATT TAAAATTCOA TTTAATCCTT ATTTTACTAT TAAAGATTTA TTAGGATTTT ATTTAATCTT AATATTATTT TTTTATTA TTTTAAAAA
      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
TCCTTATCAA TTTAGTGATC CAGATAATTT TAAAATTGCA AATCTATAT CTACTCTAC TCATATTA

```

Figura 32. Sequência do haplótipo comum para *cytb* de *C. trigonoides*.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
CGTTTAATTC ATATAAATGG AGCTTCATTT TATTTTATAA TAATATATAC ACATATCGCT CGAAATTAT ATTATTATTC ATTCTCATTA ACTCATACTT

     110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GAATAATTGG AGTAACAATT CTATTAAATAT CAATAGCTAC AGCATTTTGA GGTATATATTT TACCATGAGG ACAAATATCA TTTTGAGGAG CCACAGTAAT

     210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
TACAAATTTA TTTTCAGCTA TTCCTTATAT TGGATCAATT TTTGTTGAAT GAATTGAGG AGGTATTTC AATAATAACG CTACTCTAAA TCGATTTTTT

     310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
TCATTACATT TCATTTTACC CTTTATTATC CTTTACTAG TAATTTTACA TTTATTTTAT TTACATTAT CAGGATCTAG AAATCCATTA GGATTTAATA

     410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
GAAATTTATT TAAATCCCA TTCATCCTT ATTTTACAAT TAAAGATTTA ATTGGATTTT ACATAATTTT AATATTATTT TTATTTATTA TTTTAAAAA

     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
CCCCTATCAA TTCAGAGACC CTGATAATTT TAAAATTGCT AATTCAATAT CTACCCCAAC TCATAT

```

Figura 33. Sequência do haplótipo comum para *cytb* de *Centris* sp.

Tabela 14. Sítios polimórficos para *cytb* de *C. tarsata*.

Sítios Polimórficos																						
<i>cytb</i>	8	32	37	47	140	176	221	242	254	266	318	321	324	338	380	450	455	464	506	542	548	554
H1	G	A	C	T	T	A	A	T	C	T	C	G	T	T	A	A	C	A	T	T	T	T
H2	A	A	C	T	T	G	A	T	C	T	C	A	T	T	A	A	T	A	T	T	C	T
H3	A	A	C	T	T	G	A	T	C	T	T	G	T	T	A	A	T	A	T	T	C	T
H4	A	A	C	T	T	G	A	T	C	T	T	G	T	T	A	A	T	A	T	T	C	A
H5	A	A	C	T	T	G	A	T	C	T	C	G	T	T	A	A	T	A	T	T	C	T
H6	A	A	C	T	T	G	A	T	C	T	C	G	T	T	A	A	T	A	T	T	T	T
H7	A	A	C	T	T	A	A	T	C	T	C	G	T	T	A	A	T	A	T	T	T	T
H8	A	A	C	T	T	A	A	T	C	T	C	G	T	T	A	A	T	A	T	C	T	T
H9	A	G	C	T	T	G	A	T	C	T	C	G	T	T	A	A	T	A	T	T	C	T
H10	A	A	C	T	T	G	A	T	T	T	C	G	T	T	A	A	T	A	T	T	C	T
H11	A	A	C	T	T	A	A	T	C	T	C	G	T	C	A	A	T	A	T	T	T	T
H12	A	A	C	T	T	A	A	T	C	T	T	G	T	T	A	A	T	A	C	T	T	T
H13	A	A	C	T	T	G	A	T	C	T	T	G	T	T	A	A	T	G	T	T	C	T
H14	A	A	C	T	T	A	A	T	C	T	T	G	T	T	A	A	T	A	T	T	T	T
H15	A	A	C	C	T	A	A	T	C	T	C	G	T	T	A	A	T	A	T	T	C	T
H16	A	A	C	T	T	A	G	T	C	T	C	G	T	T	A	A	T	A	T	T	T	T
H17	A	A	C	T	T	A	A	T	T	T	C	G	T	T	A	A	T	A	C	T	T	T
H18	A	A	C	T	T	G	A	T	C	T	C	G	T	T	G	A	T	A	T	T	C	T
H19	A	A	T	T	T	A	A	T	C	T	C	G	T	T	A	A	T	A	T	T	T	T
H20	A	A	C	T	T	A	A	T	C	C	C	G	T	T	A	A	T	A	T	C	T	T
H21	A	A	C	T	T	G	A	T	C	T	C	G	T	T	A	T	T	A	T	T	T	T
H22	A	A	C	T	T	G	A	C	C	T	C	G	T	T	A	A	T	A	T	T	T	T
H23	A	A	C	T	C	G	A	T	C	T	C	G	C	T	A	A	T	A	T	T	T	T

Tabela 15. Sítios polimórficos para *cytb* de *C. trigonoides*.

Sítios Polimórficos																												
<i>cytb</i>	33	94	108	127	171	183	213	219	222	237	246	264	267	273	300	324	331	337	360	387	399	426	441	468	472	519	543	555
H1	T	C	T	A	A	C	T	T	C	T	T	T	C	T	C	C	C	T	C	C	T	T	T	C	A	T	T	T
H2	T	C	T	A	A	C	T	T	C	T	T	T	C	T	C	C	C	T	C	C	T	T	T	C	A	T	T	C
H3	T	C	T	A	A	C	T	T	C	T	T	T	C	C	C	T	T	T	C	C	T	T	C	C	A	T	T	T
H4	T	C	T	A	A	C	T	T	C	T	T	T	C	C	C	C	C	T	C	C	T	T	C	T	A	T	T	T
H5	T	C	T	A	A	C	T	T	C	T	T	T	C	T	C	C	C	T	C	C	T	T	C	C	A	T	T	T
H6	T	C	T	A	A	C	T	T	C	T	T	T	C	C	C	C	C	T	C	C	T	T	C	C	A	T	T	T
H7	T	C	T	A	T	C	T	T	C	T	A	T	C	T	C	C	C	T	C	C	T	T	C	C	A	T	T	T
H8	C	C	T	T	A	T	C	C	T	T	T	A	C	T	T	C	C	C	T	A	T	C	C	C	C	C	C	C
H9	C	C	T	T	A	T	C	C	T	T	T	A	T	T	T	C	C	C	T	A	T	C	C	C	C	C	C	C
H10	T	C	T	A	A	C	T	T	C	C	T	T	C	T	C	C	C	T	C	C	T	T	T	C	A	T	T	C
H11	T	C	T	A	A	C	T	T	C	T	T	T	C	C	C	C	T	T	C	C	T	T	C	C	A	T	T	T
H12	T	C	T	A	A	C	T	T	C	T	T	T	C	C	C	C	C	T	C	C	C	T	C	C	A	T	T	T
H13	T	C	T	A	A	C	T	T	C	T	T	T	C	C	C	C	C	T	C	C	T	T	C	C	A	T	T	C
H14	T	T	T	A	A	C	T	T	C	T	A	T	C	T	C	C	C	T	C	C	T	T	C	C	A	T	T	T
H15	T	C	C	A	A	C	C	T	C	T	T	T	C	C	C	C	C	T	C	C	T	T	C	C	A	T	T	T

Tabela 16. Sítios polimórficos para *cytb* de *Centris* sp.

Sítios Polimórficos										
<i>Cytb</i>	48	78	153	165	285	312	337	417	504	519
H1	T	T	T	A	T	C	C	C	C	C
H2	T	T	T	A	T	C	T	C	C	C
H3	C	T	T	A	T	C	T	C	T	C
H4	T	C	T	A	T	T	T	T	C	T
H5	T	T	T	A	T	C	T	T	C	C
H6	T	T	T	G	T	C	T	C	C	C
H7	T	T	T	A	T	T	T	T	C	T
H8	C	T	T	A	T	C	T	C	C	C
H9	T	T	T	A	C	C	T	C	C	C
H10	T	T	G	A	T	C	T	C	C	C

Conforme observado na Tabela 13, o fragmento possui um tamanho de aproximadamente 550 pb para estas espécies. Analisando os sítios polimórficos, podemos perceber que mais da metade das mutações estão ocorrendo na segunda metade do fragmento. O *cytb* de *A. mellifera* compreende aproximadamente da posição 11010 até 12200 do genoma completo (Crozier e Crozier 1993). Este fragmento que amplificamos abrange uma região central, entre as posições 11250 a 11830, aproximadamente. O alto número de mutações verificadas pode reforçar o resultado que encontramos para citocromo c oxidase: interior do gene mais variável em relação à extremidade. Entretanto, somente se houvesse uma análise das extremidades desta molécula poderíamos confirmar esta informação.

Vale ressaltar que o interior deste gene possui mais citosina em relação à guanina, diferentemente do observado para o COI, onde o interior possuía mais guanina.

Estruturalmente, este gene está localizado entre os genes codificadores de proteínas ND1 e ND6, e apresenta um tamanho de aproximadamente 1200 pb para *A. mellifera* (Crozier e Crozier 1993). É um gene componente da cadeia respiratória dos eucariotos, tendo importante participação no transporte de elétrons e produção de ATP da célula. Como os genes COI e COII, o gene *cytb* é um gene codificador de proteínas,

porém, sua taxa de variação é maior entre os organismos quando comparado com os genes do complexo citocromo c oxidase, e nossos resultados corroboram com este fato.

Apesar de não ocorrer muitas substituições não-sinônimas, vemos que este tipo de mutação é mais comum nesta região gênica quando comparada às subunidades I e II do citocromo c oxidase. Simon *et al.* (1994) revela que *cytb* só é menos conservado que as subunidades do citocromo c oxidase quanto à substituição de aminoácidos; as regiões de NADH desidrogenase são mais variáveis.

Conforme já apresentado, Pirounakis *et al.* (1998) e Widmer *et al.* (1998) encontraram uma maior variação em *Bombus* para o gene *cytb* do que para o gene COII analisado por Estoup *et al.* (1996). Vale ressaltar que Shao *et al.* (2004) obteve 16 sequências para *cytb* de *B. ignatus* oriundos de oito localidades e não encontrou nenhuma variação entre os indivíduos, mesmo o par de *primers* utilizado também abrangendo uma porção central do gene. Isto pode ter ocorrido devido ao baixo número amostral analisado, porém uma análise mais intensiva acerca disto faz-se necessária.

4.2.3. Subunidade maior do RNA ribossômico (16S)

Para esta região gênica, foi utilizado inicialmente o par de *primers* delineado a partir do genoma de *Apis mellifera* por Hall e Smith (1991). O tamanho previsto para este fragmento é de 740 pb, tendo sido utilizado com sucesso em *Apis mellifera* (Collet *et al.* 2007) e *Euglossa cordata* (López-Uribe 2009) em nosso laboratório. Como controle, além de *C. analis*, foram seqüenciados alguns indivíduos de *C. tarsata* e *A. mellifera*. As reações de PCR resultaram em amostras de boa qualidade para todas as espécies analisadas.

No total, obtivemos 34 sequências para *C. analis*, duas para *C. tarsata* e duas para *A. mellifera*. As sequências de *C. tarsata* e *A. mellifera* apresentaram um tamanho

de, aproximadamente, 740 pb e quando alinhamos com o banco de dados do NCBI através da ferramenta BLAST, estas alinharam com alta similaridade com outros indivíduos também sequenciados para a região 16S. Como exemplo, *C. tarsata* alinha com *Centris sp.* e *Hypotrigena ruspolti* com 93% e 88% de similaridade, respectivamente, enquanto *A. mellifera* alinha com *A. florea* e *A. dorsata* com 99% e 96% de similaridade, respectivamente. Estes dados corroboram nossos resultados de que estamos trabalhando com a região gênica desejada. Quando alinhamos as sequências obtidas, estas possuem poucas substituições nucleotídicas e poucos *gaps* entre si. Estas diferenças são facilmente visualizadas no eletroferograma.

Entretanto, as sequências de *C. analis* apresentaram um resultado de difícil interpretação, onde o fragmento é muito menor que o previsto, apresentando menos de 400bp na leitura do eletroferograma.

Além desta diferença de tamanho, o fragmento apresenta também muitas posições com sobreposições de picos (Figura 34) e isto inviabilizou a utilização destas sequências para qualquer tipo de análise.

Figura 34. Sequência parcial do gene 16S de *C. analis*.

Na tentativa de contornar esta dificuldade, foi solicitada a síntese do par de *primers* proposto por Hall e Smith (1991) que amplifica um fragmento de aproximadamente 550pb para 16S de *A. mellifera*. Sequenciamos apenas cinco indivíduos de *C. analis* para esta nova região gênica, o que foi suficiente para revelar a

inadequação do estudo deste gene nas condições utilizadas, dado o excesso de picos sobrepostos.

Para as outras três espécies, este par de *primer* se mostrou muito útil e assim obtivemos um elevado número de indivíduos seqüenciados, menor apenas que o obtido para *cytb*. No total obtivemos 130 indivíduos seqüenciados: 67 para *C. tarsata*, 34 para *C. trigonoides* e 29 para *Centris* sp. A leitura do eletroferograma se mostrou excelente, não apresentando qualquer dificuldade de leitura e interpretação (Figura 35).

Figura 35. Eletroferograma de um fragmento do gene 16S de três espécies de *Centris*.

Quando utilizamos a ferramenta BLAST, estas possuem similaridade superior a 80% com 16S de *B. weisi*, *A. mellifera* e diversos meliponíneos, além de uma espécie de Centridini (*Centris* sp.). Estas similaridades nos garantem confiabilidade dos dados.

A composição nucleotídica deste gene também foi analisada (Tabela 17); as demais sequências analisadas foram obtidas do NCBI, anteriormente disponibilizadas por Crozier e Crozier (1993), Cameron e Williams (2003) e Ramirez *et al.* (2007). Podemos perceber que as bases possuem frequências semelhantes à observada em citocromo b e distinta da encontrada em COI e COII, mesmo este fragmento abrangendo

a extremidade do gene 16S; porém, nota-se que, para algumas espécies, as frequências de adenina e timina são variáveis, mesmo sendo ambas as mais representativas.

Tabela 17. Composição nucleotídica de um fragmento do gene 16S de diferentes espécies de abelhas.

Espécies da família Apidae	Composição Nucleotídica (%)			
	Adenina	Timina	Guanina	Citosina
<i>Centris tarsata</i> (Centridini)	38,21	40,36	9,11	12,32
<i>Centris trigonoides</i> (Centridini)	38,46	39,89	8,41	13,24
<i>Centris</i> sp. (Centridini)	38,78	39,50	8,44	13,29
<i>Centris</i> sp. NCBI (Centridini)	40,25	36,64	8,12	14,98
<i>Euglossa decorata</i> (Euglossini)	38,98	41,71	7,47	11,84
<i>Meliponamarginata</i> (Meliponini)	39,89	39,15	7,79	13,17
<i>Bombus weisi</i> (Bombini)	39,29	38,41	8,85	13,45
<i>Apis mellifera</i> (Apini)	39,15	38,24	8,09	14,52

Tabela 18. Índices de diversidade genética para o gene 16S.

	Índices de Diversidade				
	N	Hd	π	SP	TF
<i>Centris tarsata</i>	67	0,505	0,00106	6	559
<i>Centris trigonoides</i>	34	0,670	0,00203	6	558
<i>Centris</i> sp.	29	0,480	0,00093	4	556

N – Número amostral SP – Sítios polimórficos

Hd – Diversidade haplotípica TF – Tamanho do fragmento (pb)

π – Diversidade nucleotídica

A Tabela 18 apresenta os índices de diversidade estimados para este fragmento. Apesar do número amostral considerável, principalmente para *C. tarsata*, os valores de diversidade foram muito inferiores aos encontrados para *cytb*, embora esta região tenha apresentado níveis de variação superiores aos encontrados em COI e COII.

As sequências completas destes genes podem ser visualizadas nas Figuras 36, 37 e 38 para as três espécies. A distribuição dos sítios polimórficos para cada espécie pode ser visualizada nas Tabelas 19, 20 e 21. As sequências apresentadas correspondem ao

haplótipo mais comum de cada espécie, enquanto as tabelas ilustram os diferentes haplótipos deste gene caracterizados em cada espécie.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
CGTCGATTG AACTCAAATC ATGTAAGATT TAAAAAGTCG AACAGACTTA ATTATTTAAAC TACTGCGTTT AAAATTTATC TTAATTCAAC ATCGAGGTCG
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
CAAACATTTT TATAGATAAG GTCTCTTAAA AAATATTACG CTGTTATCCC TAAGGTAATT TATTCTAATT ATAAAAATAA TTTTAATCTT TATTATATTC
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
TAAAAATTATA GTAATTTTAA ATATTAAAGT TTTTAAATTT TTAATAATCC TCCCAATTAA ATATTAATAA ATTTACTAAA ATTAAATAAA TTTTAATAAA
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
TTATATAATA TAAATTTCTA TAGGGTCTTA TCGTCCCATA ATTATATTTT AACATTTTAA TAAAAAATTT AATTTCAATT ATTATTACTG AGACAGTATA
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
TATTTTCATT ATTCTTTCAT ACTGGACCTC ATTTAAAAGA CAATTGATTA TGCTACCTTT GTACAGTCAG TTATACTGCA GCTATTAACG AATTATGTCA
      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
TTGAGCAGAA TTGACTTATT ATCAAATTTT CCAATAAGAC ATGTTTTTGA TAAACAGGTG

```

Figura 36. Sequência do haplótipo comum de 16S de *C. tarsata*.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
CGTCGATTG AACTCAAATC ATGTAAGATT TAAAAAGTCG AACAGACTCA ATCTTTAAAC TTCTGCATTT AAAATTTATC TTAATTCAAC ATCGAGGTCG
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
CAAACATTTT TATTAATAAG ATCTCTCAAA AAATATTACG CTGTTATCCC TGAGGTAATT TACTCTATAT TAAAAATAA TTTTAAATCA AAATAATATA
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CTAAAATTAT AGAAAAATAA TAATTAAAGT TTATTTATTT TTAATCATCC TCCCAACTAA ATATCAACTA AAATTATATT TAATTAATAT ATATATATAT
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
A--AATTTAT TAATATAAAA TTCTACAGGG TCTTATCGTC CCATAATTTA ATTTTAACAT TTTTATTAAT ATTTTAATTT AAATTATATT TATTGAGACA
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
GTATATATTT CATTAATTCA TTCATTCCAG ACCTCATTTA AAAGACAATT GATTATGCTA CCTTTGTACA GTCGAATTATA CTGCAGCTAT TTAATCTATT
      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
GTCATTGAGC AGAAGTGAAT TATTATTAAT TTCAATAAGA CATGTTTTTG ATAAACAGGT G

```

Figura 37. Sequência do haplótipo comum de 16S de *C. trigonoides*.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
CGTCGATTG AACTCAAATC ATGTAAGATT TAAAAAGTCG AACAGACTTA ATCTTTAAAC TTCTGCATTT AAAATTTATC TTAATTCAAC ATCGAGGTCG
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
CAAACATTTT TATCAATAAG ATCTCTCAAA AAATATTACG CTGTTATCCC TGAGGTAATT TATTCTAATT TAAAAATAA TTTTAATCTT TATAATAATC
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CTAAAATTAT AGTAAAAATA ATATTAAAGT TTATTTATTT TTAACCATCC TCCCAATTAA ATATTAATTA AAAATATATA ATTAAAAATA TATTTATATA
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
AATATATTAA TATAAAATTC TACAGGGTCT TATCGTCCCA TAATTTAATT TTAACATTTT AATTAAAAAT TTAATTTAAA TCATTACTAT TGAGACAGTA
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
TATATTTTCAT TAATCCATTC ATTCTAGACC TCATTTAAAA GACAATTGAT TATGCTACCT TTGTACAGTC AATTATCTG CAGCTATTTA ACTTTAGTCA
      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
TTGAGCAGAA CTGACTTATT ATTAATATCA ATAAGACATG TTTTGTATTA ACAGGTG

```

Figura 38. Sequência do haplótipo comum de 16S de *Centris* sp.

Tabela 19. Sítios polimórficos em parte do gene 16S de *C. tarsata*.

Sítios Polimórficos						
16S	67	163	196	267	293	389
H1	G	T	T	A	T	T
H2	G	T	T	G	T	T
H3	A	T	T	A	T	T
H4	G	T	T	A	C	T
H5	G	T	C	A	T	T
H6	G	T	T	A	T	C
H7	G	C	T	A	T	T
H8	G	T	A	G	T	T

Tabela 20. Sítios polimórficos em parte do gene 16S de *C. trigonoides*.

Sítios Polimórficos								
16S	169	221	257	265	302	303	304	496
H1	A	T	C	C	-	-	T	T
H2	A	T	T	C	-	-	T	T
H3	A	T	T	C	-	-	C	T
H4	T	C	T	T	T	A	T	T
H5	A	T	C	C	T	A	T	T
H6	T	C	T	C	-	-	T	T
H7	A	T	T	C	T	A	T	T
H8	A	T	T	C	-	-	C	C

Tabela 21. Sítios polimórficos em parte do gene 16S de *Centris* sp.

Sítios Polimórficos				
16S	196	198	387	390
H1	T	A	C	T
H2	A	A	C	T
H3	T	A	C	C
H4	T	A	T	T
H5	T	-	C	T

Estes resultados nos mostram que, além da pouca variação encontrada, esta se encontra de forma mais distribuída ao longo do fragmento. A região sequenciada do gene 16S fica próxima à extremidade 3' do gene, próximo à junção com o gene RNAt^{Leu} de *A. mellifera* (Crozier e Crozier 1993). Como o gene possui pouco mais de 1400pb e

nosso fragmento apenas 560 pb, sequenciamos apenas a segunda metade do gene, a qual se mostrou pouco variável. Novamente, encontramos a extremidade de uma região gênica pouco variável, como já discutido para as outras regiões gênicas sequenciadas; possivelmente, se analisássemos o interior do gene, encontraríamos um maior número de mutações.

Porém, mesmo com uma diversidade menor, este gene apresentou um tipo de variação até então observada apenas nas regiões intergênicas: *gap*. Este tipo de variação ocorre quando uma base ou um conjunto de bases são perdidos ou inseridos em determinados haplótipos. Em uma região codificadora de proteína, este tipo de mudança poderia alterar todo o esquema de leitura e, assim, comprometer os aminoácidos codificados posteriormente a esse *gap*. Portanto, espera-se encontrar este tipo de variação em regiões não codificadoras, como 16S e 12S, além de regiões intergênicas.

Mutações no material genético podem ocorrer devido a erros na replicação ou também por outros fatores, como a presença de radicais livres, que interferem na composição química das bases. Este tipo de mudança não ocasiona perda ou ganho, mas apenas troca; mesmo cada base nitrogenada possuindo propriedades físicas distintas, a estrutura da molécula permanece praticamente inalterada. Porém, a perda de nucleotídeos pode comprometer estruturalmente a molécula, e assim a ocorrência de *gaps* pode ser considerada uma mutação de “maior peso”. Tanto que este tipo de variação é observada apenas em algumas regiões gênicas específicas, conforme dito anteriormente.

Estruturalmente, o gene 16S encontra-se entre as regiões gênicas 12S e ND1 e possui em *A. mellifera* um tamanho aproximado de 1360 pb (Crozier e Crozier 1993). Apesar de possuir regiões bem conservadas (Simon *et al.* 1994), este é um gene de função estrutural (não traduzido) e, portanto, a variação entre sequências é verificada

não apenas com substituição nucleotídica, mas também com perda ou inserção de bases nitrogenadas ou sequência das mesmas, caracterizada pela presença de *gaps*, diferentemente do observado para as outras regiões gênicas analisadas neste trabalho.

4.3. Estrutura genética de populações urbanas de três espécies de *Centris* (Hymenoptera, Apoidea, Centridini) visitantes florais de *Tecoma stans*.

Conforme discutido anteriormente, foram selecionadas duas regiões gênicas distintas, sendo uma mais variável intra-especificamente (*cytb*) em relação à outra (16S), para testar a hipótese de trabalho.

O projeto inicial tinha como foco o estudo populacional apenas da espécie *C. analis*. Entretanto, como apresentado, os resultados para esta espécie não puderam ser interpretados de forma satisfatória; sendo assim, outras três espécies que também foram amostradas nos distintos centros urbanos - *C. tarsata*, *C. trigonoides* e *Centris* sp -, foram utilizadas como organismos-modelo para o teste da hipótese.

A hipótese do projeto afirma que, devido a características particulares de sua biologia, estas abelhas devem possuir populações estruturadas. Para verificar se isto ocorre, foram construídas redes de haplótipos de ambos os genes para cada espécie. Estas redes podem ser visualizadas nas Figuras 39, 40 e 41, enquanto o número de indivíduos analisados e suas respectivas localidades são apresentados nas Tabelas 22, 23 e 24.

Tabela 22. Número de indivíduos da espécie *C. tarsata* analisados.

	<i>Cytb</i>	16S
Jaboticabal-SP	28	29
Ribeirão Preto-SP	18	18
São Carlos-SP	11	11
Rifaina-SP	7	7
Jeriquara-SP	1	1
Jequié-BA	1	1
TOTAL	66	67

Figura 39. Rede de haplótipos para *cytb* e 16S de *C. tarsata*.Tabela 23. Número de indivíduos da espécie *C. trigonoides* analisados.

	<i>Cytb</i>	16S
Jaboticabal-SP	16	17
Ribeirão Preto-SP	15	11
Indiaporã-SP	1	1
Catanduva-SP	2	2
Jequié-BA	4	3
TOTAL	38	34

Figura 40. Rede de haplótipos para *cytb* e 16S de *C. trigonoides*.

Tabela 24. Número de indivíduos da espécie *Centris* sp. analisados.

	<i>Cytb</i>	16S
Sacramento-MG	9	9
Ribeirão Preto-SP	6	1
Jeriquara-SP	6	6
Franca-SP	4	4
Indiaporã-SP	4	4
Rifaina-SP	5	5
TOTAL	34	29

Figura 41. Rede de haplótipos para *cytb* e 16S de *Centris* sp.

As três espécies apresentaram usualmente duas “classes” de haplótipos: poucos, compartilhados por indivíduos oriundos de distintas localidades e a maioria caracterizando haplótipos únicos.

Os haplótipos compartilhados constituem, possivelmente, linhagens basais, podendo representar as linhagens colonizadoras. Este fato se justifica pois é mais parcimonioso supor que linhagens diferentes se originaram a partir de uma linhagem comum (Castelloe e Templeton 1994).

Ao estimarmos o nível de estruturação destas abelhas, percebemos que as mesmas apresentam resultados distintos (Tabela 25). Para esta estimativa, os diferentes sítios amostrados em cada localidade foram considerados como sub-amostras de uma única população.

Tabela 25. Valores de F_{ST} para cada gene das espécies de *Centris*.

	<i>Cytb</i>		16S	
	F_{ST}	P	F_{ST}	P
<i>C. tarsata</i>	0,063	$0,034 \pm 0,005$	**	$0,922 \pm 0,009$
<i>C. trigonoides</i>	0,722	$0,0 \pm 0,0$	0,522	$0,0 \pm 0,0$
<i>Centris</i> sp.	0,088	$0,058 \pm 0,008^*$	0,060	$0,238 \pm 0,012^*$

* Valores não significativos ($p < 0,05$)

** Valores negativos

Para *C. tarsata*, o valor estimado de F_{ST} a partir do gene *cytb* foi significativo, diferentemente do valor não significativo estimado pelo gene 16S. No entanto, o valor estimado para *cytb* é próximo de 6%, indicando um baixo nível de estruturação. Considerando que a região 16S é mais conservada, este resultado observado pode indicar que o nível de estruturação para esta espécie é realmente baixo, uma vez que a

região mais conservada não apresentou estruturação e a região mais variável apresentou um valor relativamente baixo (6%).

Diferentemente, para a espécie *C. trigonoides* observou-se um nível de estruturação maior em relação às demais espécies analisadas para ambas as regiões gênicas. No entanto, este fato pode ser atribuído à alta diferenciação dos indivíduos oriundos de Jequié em relação aos demais; ao excluirmos estes indivíduos da análise, encontramos valores inferiores aos inicialmente estimados, mas ainda altamente significativo para o gene 16S (Tabela 26).

Tabela 26. Valores de F_{ST} obtidos para cada gene na espécie *C. trigonoides* excluindo da análise os indivíduos oriundos de Jequié-BA.

	<i>Cytb</i>		16S	
	F_{ST}	<i>P</i>	F_{ST}	<i>P</i>
<i>C. trigonoides</i>	0,040	$0,265 \pm 0,012^*$	0,245	$0,016 \pm 0,004$

* Valores não significativos ($p < 0,05$)

Nitidamente os valores de F_{ST} estimados para *cytb* são discrepantes dos observados anteriormente quando analisados sem os indivíduos de Jequié-BA, enquanto que para 16S, apesar de valores distintos, a população está estruturada para esta região gênica. Este resultado sugere que para esta espécie, conforme aumenta a distância geográfica entre as populações, os níveis de estruturação aumentam.

Por fim, para a terceira espécie (*Centris* sp.) podemos verificar que, para ambas regiões gênicas, os resultados não foram significativos, indicando ausência de estruturação. Apesar disto, devemos considerar que o teste realizado é sensível ao tamanho populacional e, certamente, os valores de *P* foram diretamente influenciados pelo baixo número amostral analisado para esta espécie.

Deve-se considerar que, diferentemente das demais espécies, em *C. tarsata* foi analisado um número maior de fêmeas - dezenove contra três das outras duas espécies; portanto, se fez necessário estimar os valores de F_{ST} separadamente entre os sexos (Tabela 27).

Tabela 27. Valores de F_{ST} estimados para a espécie *C. tarsata*.

	<i>Cytb</i>		16S	
	F_{ST}	<i>P</i>	F_{ST}	<i>P</i>
Fêmeas	0,215*	$0,055 \pm 0,007$	**	$0,947 \pm 0,006$
Machos	0,0225*	$0,275 \pm 0,013$	**	$0,564 \pm 0,017$

* Valores não significativos ($p < 0,05$)

** Valores negativos

Os valores estimados para machos e fêmeas não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$); possivelmente este resultado se deve ao baixo número amostral analisado. Entretanto, ao analisarmos de forma separada as redes de haplótipos para cada sexo, nitidamente obtemos redes com diferentes padrões (Figuras 42 e 43). Os números de cada haplótipo representado nestas redes seguem a mesma numeração das redes apresentadas anteriormente para *C. tarsata* para cada gene (Figura 39), ou seja, o haplótipo H_1 do gene *cytb* para fêmeas de *C. tarsata* corresponde ao H_1 de *cytb* para a análise de todas as *C. tarsata*.

Figura 42. Redes de haplótipos para os genes *cytb* e 16S em fêmeas de *C. tarsata*.

Figura 43. Redes de haplótipos para os genes *cytb* e 16S em machos de *C. tarsata*.

As redes de haplótipos revelam que fêmeas de *C. tarsata* compõem, em sua maioria, haplótipos comuns, tanto para *cytb* como para 16S; já os machos apresentam muitos haplótipos únicos/exclusivos, principalmente para *cytb*.

Ao compararmos apenas os machos de *C. tarsata* com as demais espécies, que possuem, em sua maioria, machos, percebemos que os resultados revelam ausência de estruturação para o gene *cytb*, o marcador mais variável para todas as espécies analisadas. O gene 16S indica que as populações analisadas de *C. trigonoides* estão estruturadas, diferentemente das demais espécies; já para *Centris* sp. a rede de

haplótipos para 16S mostra que dado o baixo número de indivíduos analisados, em sua maioria são haplótipos comuns.

Em nossas observações a campo, a maioria dos machos coletados apresentava um comportamento territorialista, realizando voos rápidos e protegendo as flores de outros indivíduos; este comportamento também foi observado em outras espécies de abelhas solitárias (Gerling e Hermann 1978; Medeiros e Schlindwein 2003). Ocorreram em duas oportunidades de coletarmos um macho e uma fêmea na mesma flor. Isto sugere que estes sítios de coleta são utilizados por estas espécies, além de coleta de recursos, para reprodução. Assim, os machos analisados são oriundos de outras localidades e se estabeleceram nestas populações com o intuito de reproduzir; isto explica o alto índice de haplótipos únicos/exclusivos e, para *C. tarsata*, a nítida diferença nos valores estimados de F_{ST} .

As fêmeas analisadas de *C. tarsata* apresentaram resultados distintos e a rede de haplótipos para ambos os genes demonstra que, apesar do número amostral inferior, ocorre um número menor de haplótipos, sugestionando que machos e fêmeas adotam diferentes estratégias, onde possivelmente fêmeas permanecem nos sítios natais (filopatria, por exemplo) e machos são dispersores. Também, as fêmeas apresentaram mais de uma linhagem materna por sítio de coleta, como por exemplo, em Jaboticabal foram encontradas quatro e em Rifaina três; analisando em uma escala menor, agora considerando cada árvore ou conjunto de árvores um sítio de coleta, veremos a ocorrência de dois e três haplótipos em alguns sítios de Rifaina e Jaboticabal. O trabalho de Ferreira *et al.* (2013) também demonstra a ocorrência de mais de uma linhagem nos locais de coleta; diferentemente, o trabalho de Ferreira (2010) demonstrou que para *Partamona helleri*, o campus da Universidade Federal de São Carlos e o da Universidade de São Paulo (cidade de São Paulo) foram colonizados apenas por uma

linhagem materna cada um, enquanto os trabalhos de Brito e Arias (2010) e Fernandes *et al.* (2011) revelam uma alta diferenciação genética entre populações de *P. helleri* e *P. seridoensis*, respectivamente; esta alta diferença possivelmente ocorre devido à forma de colonização destas abelhas, somadas ao fato da baixa dispersão. Estes resultados nos indicam que as espécies de *Centris* analisadas neste projeto provavelmente colonizam suas áreas com um número superior de fêmeas em relação às espécies sociais.

4.4. Colonização, dispersão e a genética das populações.

Colonização pode ser entendida como o estabelecimento de colônias (ou população) em um local onde anteriormente não existia esta espécie fundadora. A forma como ocorre essa colonização irá influenciar diretamente a genética da população ao longo do tempo (Harrison e Hastings 1996). Se poucos indivíduos colonizam determinada área, a variabilidade genética daquela população ficará limitada à variabilidade apresentada pelos colonizadores. Este efeito pode ser observado em algumas populações de abelhas do gênero *Partamona* (Meliponini); poucas fêmeas (rainhas) são responsáveis por colonizar uma nova área e devido a este sistema de acasalamento destes organismos, toda uma área delimitada apresenta operárias de diferentes colônias, mas pertencentes a uma mesma linhagem, ocasionando alta diferenciação em populações próximas geograficamente (Ferreira 2010; Fernandes *et al.* 2011). Este fato pode resultar em que cada evento de colonização possa ocorrer sob a condição de efeito fundador.

Nossos resultados sugerem que as espécies analisadas neste projeto realizam a colonização com um número maior de fêmeas fundadoras em relação às espécies sociais, pois nossas redes de haplótipos têm demonstrado um número superior de

linhagens ancestrais de um determinado local do que o observado para meliponíneos. Este fato pode ser explicado pelo distinto sistema de acasalamento apresentado em abelhas sociais e solitárias: em sociais, apenas a rainha irá se reproduzir (salvo algumas exceções, onde operárias põe ovos não fecundados, dando origem a machos) e fundar uma nova colônia; nas espécies solitárias, todas as fêmeas estão aptas a se reproduzir e fundar novos ninhos.

Porém, deve ser considerado que novas linhagens podem se estabelecer nos locais. Em abelhas sociais, como cada colônia pode apresentar de centenas a milhares de indivíduos, poucas colônias são necessárias para saturar um determinado local; enquanto para solitárias os poucos indivíduos gerados em um ninho não são suficientes para saturar uma área, e assim, esta localidade fica disponível para outras fêmeas fundarem seus ninhos.

Após a fundação de um novo ninho/colônia, a matriarca e sua prole podem migrar ou permanecer no local. Estes distintos comportamentos podem ser motivados por alguns fatores, como gasto de energia e disponibilidade de recursos. A filopatria é um exemplo deste comportamento. As espécies sociais dependem de recursos das colônias-mãe para construção da nova colônia (Nogueira-Neto 1954) e, portanto, acabam não migrando muito para a fundação e geração de uma nova prole; as fêmeas de abelhas solitárias, após finalizarem a construção de um ninho, não irão mais interagir com este e assim ficam “livres” para migrarem para outras áreas. Porém, nossos resultados sugerem que estas fêmeas permanecem em uma mesma localidade, pelo menos para *C. tarsata*. Outros estudos, conforme já apresentado, sugerem que as fêmeas de alguns gêneros desta tribo são filopátricas; portanto, acreditamos que estas três espécies são filopátricas, porém, um estudo mais detalhado a respeito desta questão se faz necessário.

Tendo em vista as conseqüências da baixa variabilidade genética nas populações, notadamente as haplodiplóides, uma solução para compensar a permanência das fêmeas em determinados locais é a migração dos machos; em *Partamona helleri* foram encontrados indícios de que esta estratégia não ocorre (Ferreira 2010); em *Euglossa cordata* este fato foi evidenciado (Cerântola *et al.* 2011); nossos resultados sugerem que, para *C. tarsata* pelo menos, esta estratégia possivelmente ocorre.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos para as espécies de *Centris* foram distintos. Para *C. analis*, o marcador mitocondrial apresentou resultados de difícil interpretação; assim, não foi possível mensurar o nível de estruturação para esta espécie. Para *Centris* sp., os resultados apresentaram ausência de estruturação para ambas regiões gênicas analisadas. Em *C. tarsata*, quando analisado machos e fêmeas junto, o gene *ctyb* apresenta um baixo nível de estruturação, porém, quando separada a análise por sexo, ocorre ausência de estruturação. Vale ressaltar que, apesar dos valores de F_{st} não serem significativamente diferentes de zero, as redes de haplótipos para cada sexo se apresentaram de formas distintas. Por fim, *C. trigonoides* foi a única espécie que apresentou altos níveis de estruturação. No entanto, estes altos níveis ocorreram quando indivíduos oriundos de Jequié-BA foram incluídos na análise, sugerindo que para esta espécie a distância geográfica pode ser determinante nos níveis de estruturação. Sendo assim, o teste da hipótese de trabalho nesta espécie ficou comprometida.

Uma melhor amostragem destes organismos se faz necessária, para então se poder concluir de forma mais robusta este estudo. A inclusão de uma terceira região gênica com taxa de mutação distinta das analisadas, como, por exemplo, COI, deve ser considerada, apesar de não ter se mostrado crucial; já a inclusão de genes nucleares se mostra de grande valia, e estes poderão ser microssatélites espécie-específicos ou SNPs a serem prospectados na infinidade de sequências que podem ser obtidas por Sequenciamento de Nova Geração (NGS). Portanto, o projeto terá continuidade em futuro breve buscando, particularmente, averiguar o papel dos machos de *Centris* na introdução de variação alélica nova em cada sítio estudado. De posse dos marcadores mitocondriais e com a inclusão dos marcadores nucleares, será possível averiguar uma

dispersão assimétrica de machos e fêmeas destas espécies, resultando na estruturação genética destas populações. Com a realização desta análise em futuro próximo, será possível concluir o teste final da hipótese aqui proposta.

Além disto, foi possível verificar diferentes taxas de variação nos distintos genes entre e dentro de espécies, ressaltando a necessidade de estudos com mais de uma região gênica em trabalhos que visem verificar diversidade e estruturação populacional.

Apesar das dificuldades aqui relatadas para a obtenção de sequências gênicas de *C. analis*, possivelmente decorrentes da ocorrência conjunta de elevada heteroplasmia e NUMTs, as regiões passíveis de utilização (e foram muitas e de tamanho em pares de bases significativo) demonstraram total similaridade de sequência nos indivíduos analisados. Deve ser ressaltado que esta espécie foi a que maiores investimentos em sequenciamento tipo Sanger foram feitos. Portanto, encontrar tão baixa variação nucleotídica nos diferentes genes analisados na espécie de maior distribuição geográfica e que apresenta populações de maior tamanho é um fato que exige uma explicação. Consideramos que este seja a questão mais relevante levantada por este estudo e que exigirá esforços redobrados no sentido de elucidar a questão.

Os três genes mitocondriais utilizados (COI, citocromo b e 16S) mostraram-se plenamente adequados para diferenciar as três espécies de *Centris* do subgênero *Hemisiella* (*Centris tarsata*, *Centris trigonoides* e *Centris* sp.) amostradas nas flores de *Tecoma stans*. Desta forma, relações filogenéticas entre as espécies desse subgênero poderão ser estabelecidas.

Por fim, embora os centros urbanos representem uma grande barreira para muitas espécies animais, observamos uma rica e diversa fauna de Centridini e grupos relacionados nas diferentes cidades onde foram feitas amostragens em flores de *Tecoma stans*. Além das quatro espécies de *Centris* amostradas, foi capturado um número

expressivo de espécimes de *Epicharis* sp. e de *Oxaea* sp. (Andrenidae) em localidades específicas. As nossas observações aqui relatadas e coletas anteriores de outros grupos de abelhas (por exemplo, abelhas euglossíneas em flores de *Thevetia peruviana*) em sítios urbanos claramente apontam que algumas espécies de abelhas são comuns nestes ambientes, o que exige um maior esforço na proposição de projetos na área de Ecologia Urbana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso, J. **Origem das linhagens mitocondriais nas abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.)** do Brasil. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos. 2012.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410. 1990.
- Arias, M. C.; Francisco, F. O.; Silvestre, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. In: G. A. R. Melo & I. Alves-dos-Santos, **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure**. Ed. UNESCO, Criciúma, 2003.
- Avise, J. C.; Arnold, J.; Ball, R. M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J. E.; Reeb, C. A.; Saunders, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 489-522, 1987.
- Ayala, R. **Sistemática de los taxa supraespecíficos de las abejas de la tribu Centridini (Hymenoptera: Anthophoridae)**. Tese de Doutorado. Universidad Autónoma de México, México, 180 pp. 1998.
- Bandelt, H.J.; Forster, P.; Röhl, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, p.37-48. 1999.
- Brito, R.M.; Arias, M.C. Genetic structure of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) from Neotropical Atlantic rainforest. **Insectes Sociaux**, v. 57, p. 413-419. 2010.
- Camargo, J.M.F.; Mazucato, M. Inventário da apifauna e flora apícola de Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Dusenía**, v.14(2), p. 55-87, 1984.

- Cameron, S.A.; Mardulyn, P. Multiple molecular data sets suggest independent origins of highly eusocial behavior in bees (Hymenoptera:Apinae). **Systematic Biology**, v. 50, p. 194-214. 2001.
- Cameron, S.A.; Williams, P.H. Phylogeny of bumble bees in the New World subgenus *Fervidobombus* (Hymenoptera: Apidae): congruence of molecular and morphological data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 28(3), p. 552-563. 2003.
- Castelloe, J.; Templeton, A.R. Root probabilities for intraespecific gene trees under neutral coalescent theory. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 3(2), p. 102-113. 1994.
- Cerântola, N. C. M.; Oi, C. A.; Cervini, M.; Del Lama, M. A. Genetic differentiation of urban populations of *Euglossa cordata* from the state of São Paulo, Brazil. **Apidologie**, v. 42, p. 214-222, 2011.
- Cerna, K.; Straka, J.; Munclinger, P. Population structure of pioneer specialist solitary bee *Andrena vaga* (Hymenoptera: Andrenidae) in central Europe: the effect of habitat fragmentation or evolutionary history? **Conservation Genetics**, v. 14, p. 875-883. 2013.
- Cha, S.Y. Yoon, H.J. Lee, E.M. Yoon, M.H. Hwang, J.S. Jin, B.R. Han, Y.S. Kim, I. The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the bumblebee, *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae). **Gene**, v.392, p. 206-220. 2007.
- Collet, T.; Arias, M.C.; Del Lama, M.A. 16S mtDNA variation in *Apis mellifera* detected by PCR-RFLP. **Apidologie**, v.28, p.47-54. 2007.

- Cristiano, M.P.; Fernandes-Salomao, T.M.; Yotoko, K.S.C. Nuclear mitochondrial DNA: an Achilles' heel of molecular systematics, phylogenetics and phylogeographic studies of stingless bees. **Apidologie**, v. 43, p. 527-538. 2012.
- Crozier, R.H.; Crozier, Y.C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. **Genetics Society of America**, v.133, p.97-117. 1993.
- Crozier, Y.C.; Koulianos, S.; Crozier, R.H. An improved test for africanized honeybee mitochondrial DNA. **Experientia**, v. 47, p. 698-696. 1991.
- Darveau, C.A.; Hochachka, P.W.; Welch, K.C. Jr.; Roubik, D.W. Allometric scaling of flight energetics in Panamanian orchid bees: a comparative phylogenetic approach. **The Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 3581-3591. 2005.
- Dick, C.W.; Roubik, D. W.; Gruber, K. F.; Bermingham, E. Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. **Molecular Ecology**, v. 13(12), p. 3775-3785, 2004.
- Dorea, M.C.; Santos, F.A.R.; Lima, L.C.L.; Figueroa, L.E.R. Análise polínica do resíduo pós-emergência de ninhos de *Centris tarsata* Smith (Hymenoptera: Apidae, Centridini). **Neotropical Entomology**, v. 38(2), p. 197-202. 2009.
- Dorea, M.C.; Aguiar, C.M.L.; Figueroa, L.E.R.; Lima, L.C.L.; Santos, F.A.R. Residual pollen in nest of *Centris analis* (Hymenoptera, Apidae, Centridini) in na area of caatinga vegetation from Brazil. **Oecologia Australis**, v. 14(1), p. 232-237. 2010.
- Estoup, A.; Solignac, M.; Cornuet, J.M.; Goudets, J.; Scholls, A. Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. **Molecular Ecology**, v.5, p. 19-31. 1996.

- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. “Arlequin 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis,” **Computational and Molecular Population Genetics Lab**, v. 1, p. 47–50. 2005.
- Françoso, E.; Arias, M.C. Cytochrome c oxidase I primers for corbiculate bees: DNA barcode and mini-barcode. **Molecular Ecology Resource**, v. 13(5), p. 844-850. 2013.
- Fernandes, C.R.M.; Martins, C.F.; Ferreira, K.M.; Del Lama, M.A. Gene variation, population differentiation, and sociogenetic structure of nests of *Partamona seridoensis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Biochemical Genetics**, v. 50, p. 325-335. 2012.
- Ferreira, K.M. **A colonização de uma área por espécies de abelhas sem ferrão. Um Estudo de Caso: *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini).** Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos. 2010.
- Ferreira, V.S.; Aguiar, C.M.L.; Oliveira, E.J.F.; Costa, M.A. Mitochondrial DNA variability in populations of *Centris aenea* (Hymenoptera, Apidae), a crop-pollinating bee in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 12(1), p. 830-837. 2013.
- Freitas, B.M.; Paxton, R.J. A comparison of two pollinators: the introduced honey bee *Apis mellifera* and an indigenous bee *Centris tarsata* on cashew *Anacardium occidentale* in its native range of NE Brazil. **Journal of Applied Ecology**, v. 35, p. 109-121. 1998.
- Gaglianone, M.C. Abelhas da tribo Centridini na Estação Ecológica de Jataí (Luiz Antônio, SP): composição de espécies e interações com flores de Malpighiaceae. In: G. A. R. Melo & I. Alves-dos-Santos, **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure**. Ed. UNESCO, Criciúma, 2003.

- Gaglianone, M.C.; Rocha, H.H.S.; Benevides, C.R.; Junqueira, C.N.; Augusto, S.C. Importância de Centridini (Apidae) na polinização de plantas de interesse agrícola: o maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) como estudo de caso na região sudeste do Brasil. **Oecologia Australis**, v. 14(1), p. 152-164. 2010.
- Gathmann, A.; Tscharntke, T. Foraging ranges of solitary bees. **Journal of Animal Ecology**, v. 71, p. 757–764, 2002.
- Gazola, A. L.; Garófalo, C. A. Trap-nesting bees (Hymenoptera: Apoidea) in forest fragments of the state of São Paulo, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 8 (2), p. 607-622. 2009.
- Gerling, D.; Hermann, H.R. Biology and mating behavior of *Xylocopa virginica* L. (Hymenoptera, Anthophoridae). **Behaviour Ecology and Sociobiology**, v. 3, p. 99-111. 1978.
- Gonçalves, L.; Silva, C.I.; Buschini, M.L.T. Collection of Pollen Grains by *Centris* (*Hemisiella*) *tarsata* Smith (Apidae: Centridini): Is *C. tarsata* an Oligolectic or Polylectic Species? **Zoological Studies**, v. 51(2), p.195-203. 2012.
- Greenwood, P.J. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. **Animal Behaviour**, v.28, p. 1140-1162. 1980.
- Harrison, S.; Hastings, A. Genetic and evolutionary consequences of metapopulation structure. **Tree**, v. 11(4), p. 180-183. 1996.
- Hall, H. G.; Smith, D. R. Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy Science USA**, v. 88, p. 4548-4552, 1991.
- Hall, H.G. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98. 1999.

- Kmiec, B.; Woloszynska, M. Janska, H. Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. **Current Genetics**, v.50, p.149-159. 2006.
- Koulianos, S.; Schmid-Hempel, R.; Roubik, D.W.; Schmid-Hempel, P. Phylogenetic relationships within the corbiculate Apinae (Hymenoptera) and the evolution of eusociality. **J. Evol. Biol**, v.12, p.380-384. 1999.
- Kranz, W. M.; Passini, T. **Amarelinho**: biologia e controle. Instituto Agronômico do Paraná. 1997.
- Leys, R.; Cooper, S.J.; Schwarz, M.P. Molecular phylogeny of the large carpenter bees, genus *Xylocopa* (Hymenoptera: apidae), based on mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 17(3), p. 407-418. 2000.
- Librado, P.; Rozas, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25(11), p. 1451-1452. 2009.
- López-Uribe, M.M.; Oi, C.A.; Del Lama, M.A. Nectar-foraging behaviour of Euglossine bees (Hymenoptera: Apidae) in urban areas. **Apidologie**, v. 39, p. 410-418. 2008.
- López-Uribe, M.M. **Dinâmica e estrutura genética populacional de abelhas Euglossini (Hymenoptera: Apidae) visitantes florais de Thevetia peruviana (Apocynaceae) em áreas urbanas**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos. 2009.
- Matteson, K.C.; Ascher, J.S.; Langellotto, G.A. Bee richness and abundance in New York City urban gardens. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 101(1), p. 140-150. 2008.
- McIntery, N.E. Ecology of urban arthropods: a review and a call to action. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 93(4), p. 825-835. 2000.

- McIntery, N.E; Rango, J.; Fagan, W.F.; Faeth, S.H. Ground arthropod community structure in a heterogeneous urban environment. **Landscape and Urban Planning**, v. 52, p. 257-274. 2001.
- Medeiros, P.C.R.; Schlindwein, C. Territórios de machos, acasalamento, distribuição e relação com plantas em *Protomeliturga turnerae* (Ducke, 1907) (Hymenoptera, Andrenidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47(4), p. 589-596. 2003.
- Morato, E. F.; Garcia, M. V. B.; Campos, L. A. O. Biologia de *Centris* Fabricius (Hymenoptera, Anthophoridae, Centridini) em matas contínuas e fragmentos na Amazônia Central. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16 (4), p. 1213-1222, 1999.
- Nigro, L. Solignac, M. Sharp, P. Mitochondrial DNA sequence divergence in the *melanogaster* and *oriental* species subgroups of *Drosophila*. **J. Mol. Evol.**, v.33, p.156-162. 1991.
- Nixon, K. C. 2002. WinClada ver. 1.0000 Published by the author, Ithaca, NY, USA.
- Nogueira-Neto, P. Notas bionômicas sobre Meliponíneos. III. Sobre a enxameagem. **Arquivo do Museu Nacional do Rio de Janeiro**, v. 42, p. 419-451. 1954.
- Oi, C.A. **Estrutura sociogenética de ninhos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) e estrutura genética das populações urbanas de *Euglossa cordata* do estado de São Paulo**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos. 2010.
- Oliveira, R.; Schlindwein, C. Searching for a manageable pollinator for acerola orchards: the solitary oil-collecting bee *Centris analis* (Hymenoptera: Apidae: Centridini). **Journal of Economic Entomology**, v. 102(1), p. 265-273. 2009.
- Packer, L.; Zayed, A.; Grixti, J. C.; Ruz, L.; Owen, R. E.; Vivallo, F.; Toro, H. Conservation genetics of potentially endangered mutualism: reduce levels of

- genetic variation in specialist versus generalist bees. **Conservation Biology**, v. 19, n. 1, p. 195-202, fev. 2005.
- Peixoto, M. P. **Biologia e ecologia da nidificação e variabilidade genética de *Centris (Centris) flavifrons* Fabricius (Hymenoptera: Apidae, Centridini)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba. 2012.
- Pirounakis, K.; Koulianos, S.; Schmid-Hempel, P. Genetic variation among European populations of *Bombus pascuorum* (Hymenoptera: Apidae) from mitochondrial DNA sequence data. **European Journal of Entomology**, v.95, p. 27-33. 1998.
- Ramirez, S.R.; Nieh, J.C.; Quental, T.B.; Roubik, D.W.; Imperatriz-Fonseca, V.L.; Pierce, N.E. A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56(2), p. 519-525. 2010.
- Roubik, D.W.; Hanson, P.E. Orchid bees from tropical America: biology and field guide. **INBio Press, Santo Domingo de Heredia**. 352p. 2004.
- Santos, S.K.D.; Gomes, L.P.; Souza, L.E.C.; Waldschmidt, A.M. Visitantes florais do caju anão precoce (*Anacardium occidentale* L.) em uma área de caatinga no município de Jequié-BA. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, Caxambu. 2007.
- Shao, Z.Y.; Mao, H.X.; Fu, W.J.; Ono, M.; Wang, D.S. Bonizzoni, M.; Zhang Y.P. Genetic Structure of Asian Populations of *Bombus ignites* (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Heredity**, v.95 (1), p.46–52. 2004.
- Sheffield, C.S.; Hebert, P.D.; Kevan, P.G.; Packer, L. DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 196-207. 2009.

- Sheppard, W. S.; McPheron, B. A. Ribosomal DNA diversity in Apidae. In: **Diversity in the genus *Apis***. Smith DR: Westview, Boulder (CO), pp. 89-102. 1991.
- Silva, C. I.; Augusto, S. C.; Sofia, S. H.; Moscheta, I. S. Diversidade de abelhas em *Tecoma stans* (L.) Kunth (Bignoniaceae): importância na polinização e produção de frutos. **Neotropical Entomology**, v. 36 (3), p. 331-341, mai/jun. 2007.
- Silveira, F. A.; Melo, G. A. R.; Almeida, E. A. B. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação**. 1 ed. Belo Horizonte: Fernando A. Silveira, 2002.
- Silvestre, D. **Evolução do genoma mitocondrial e relações filogenéticas entre abelhas da subfamília Apinae**. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 2006.
- Silvestre, D. Dowton, M. Arias, M.C. The mitochondrial genome of the stingless bee *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Sequence, gene organization and a unique tRNA translocation event conserved across the tribe Meliponini. **Genetics and Molecular Biology**, v.31(2), p.451-460. 2008.
- Simon, C.; Frati, F.; Beckenbach, A.; Crespi, B.; Liu, H.; Flook, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reactions primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v.87(6). 1994.
- Siqueira-de-Castro, M. Bee fauna of some tropical and exotic fruits: potencial pollinators and their conservation. IN: Kevan P & Imperatriz Fonseca: **Pollinating Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature**, Ministry of Environment. p. 275-288. 2002.
- Taura, H.M.; Laroca, S. A associação de abelhas silvestres de um biótopo urbano de Curitiba (Brasil), com comparações espaço-temporais: abundância relativa,

fenologia, diversidade e exploração de recursos (Hymenoptera, Apoidea). **Acta Biológica Paranaense**, v.30(1,2,3,4), p. 35-137. 2001.

Tavaré, S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of dna sequences.

Lectures on Mathematics in the Life Sciences, v. 17, p. 57-86. 1986.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22(22), p. 4673–4680. 1994.

Walsh, P. S.; Metzger, D. A.; Higuchi, R. Chelex 100 as a médium for simple extraction of DNA of PCR-based typing from forensic material.**Biotechniques**, v. 10 (4), p. 506-513. 1991.

Widmer, A.; Schmid-Hempel, P.; Estoup, A.; Scholl, A. Population genetic structure and colonization history of *Bombus terrestris* s.l. (Hymenoptera: Apidae) from Canary Island and Madeira. **Heredity**, v.81, p.563-572. 1998.

Zanette, L.R.S.; Martins, R.P.; Ribeiro, S.P. Effects of urbanization on Neotropical wasp and bee assemblages in a Brazilian metropolis.**Landscape and Urban Planning**, v.71, p.105-121. 2005.

Zayed A.; Packer, L. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 102, p. 10742-10746. 2005.