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

**“Caracterização populacional de *Mourella caerulea* (Fries, 1900)
e *Plebeia nigriceps* (Fries, 1901) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)
através de morfometria geométrica da asa, análise de
hidrocarbonetos cuticulares e DNA mitocondrial”.**

Juliana Stephanie Galaschi Teixeira

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: ENTOMOLOGIA

RIBEIRÃO PRETO -SP

2015

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

**“Caracterização populacional de *Mourella caerulea* (Friese, 1900)
e *Plebeia nigriceps* (Friese, 1901) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)
através de morfometria geométrica da asa, análise de
hidrocarbonetos cuticulares e DNA mitocondrial”.**

Juliana Stephanie Galaschi Teixeira

Orientador: Prof. Dr. Tiago Maurício Franco

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: ENTOMOLOGIA

RIBEIRÃO PRETO -SP

2015

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

Teixeira, Juliana Stephanie Galaschi

Caracterização populacional de *Mourella caerulea* (Friese, 1900) e *Plebeia nigriceps* (Friese, 1901) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) através de morfometria geométrica da asa, análise de hidrocarbonetos cuticulares e DNA mitocondrial.

Characterization of population of *Mourella caerulea* (Friese, 1900) and *Plebeia nigriceps* (Friese, 1901) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) through geometric morphometrics of wings, analysis of cuticular hydrocarbons and mtDNA.

Ribeirão Preto, 2015
135 p.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Entomologia

Orientador: Tiago Maurício Franco

1. Abelhas sem ferrão 2. *Mourella caerulea* 3. *Plebeia nigriceps* 4. Morfometria Geométrica 5. DNA mitocondrial 6. Hidrocarbonetos cuticulares

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a). Tiago Maurício Franco

Aos meus pais,
Maria Luíza Galaschi e Luiz Carlos Teixeira,
que sempre incentivaram a seguir meus sonhos
Dedico

Agradecimentos

Primeiramente ao Prof. Dr. Tiago Maurício Franco, pela orientação, dedicação e apoio no desenvolvimento dessa pesquisa.

Às Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi e Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões, por permitir que os experimentos relacionados à parte molecular do trabalho fossem realizados no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas.

Ao Prof. Dr. Fábio Santos Nascimento, que disponibilizou a estrutura de seu laboratório para a realização das análises de hidrocarbonetos cuticulares.

À Prof. Maria Cristina Arias, por ter cedido *primers* para realizarmos alguns testes durante o trabalho.

À Profa. Dra. Vera Lúcia Imperatriz-Fonseca, pela orientação no primeiro ano de desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Garófalo, por permitir a utilização das dependências de seu laboratório, pelos bons conselhos e ensinamentos.

À Dra. Sidia Witter, pelo incentivo a vir para Ribeirão Preto desenvolver este trabalho e auxílio nas coletas. À Dra. Betina Blochtein, por me apresentar o mundo das abelhas e oferecer suporte desde então.

Aos meliponicultores que me auxiliaram nesta jornada: ao Rafael Gehrke; ao Claiton Kunzler e sua mãe, dona Cecília; ao seu Humberto; à Roselaine Wilges e seu marido; ao José Antônio Lopes Souza; ao Diego Saucedo e à Franciele Fernandes dos Santos.

Aos técnicos da Emater: Lauro Schmidt, Paulo Conrad e Luiz Antônio Marmitt, pelo auxílio na localização das colônias e nas coletas.

Ao Prof. Dr. Fabiano Silva Alves e à Profa. Lilá Acosta Simon, pelo apoio em Alegrete.

Aos colegas do APILAB, pela amizade e companheirismo.

Ao pessoal do Laboratório de Ecologia e Evolução de Abelhas e Vespas, pela amizade e apoio, principalmente na reta final deste trabalho.

À Letícia Azambuja Lopes e à Annelise de Souza Rosa, pela amizade desde os tempos idos da PUCRS. Pela parceria seja no metal, nas coletas, em disciplinas e nas indaiadas da vida. Muito obrigada por tudo!

À Vera Lúcia Castelo Figueiredo e Rosana Almeida, pela amizade e apoio.

Ao Tiago Falcón, meu marido, que contribuiu diretamente nas coletas, análises e diversas discussões sobre este trabalho.

À minha família (núcleos metropolitano e litorâneo), que mesmo com a distância acompanham e apoiam meu trabalho. Que seguram no osso a saudade e tem paciência com os longos períodos de ausência. Em especial aos pequenos *padawans*, Angelo e Enzo Zaniol.

À Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Programa de Pós-Graduação em Entomologia, pela oportunidade concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2011/02434-2) pela concessão da bolsa.

Resumo

Mourella caerulea, popularmente conhecida como mirim-de-chão ou bieira, e *Plebeia nigriceps*, comumente chamada mirim nigriceps, são meliponíneos ocorrentes no sul do Brasil, polinizadores de plantas nativas e cultivadas. *M. caerulea* está principalmente relacionada ao bioma Pampa e seu hábito de nidificação é subterrâneo. *P. nigriceps* nidifica em frestas de rochas e muros, sendo encontrada tanto no Pampa como em Mata Atlântica. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade populacional destas duas espécies, através de três metodologias: a morfometria geométrica de asa, perfil de hidrocarbonetos cuticulares e sequenciamento de fragmentos de genes mitocondriais. Foram coletadas operárias de 24 colônias de *M. caerulea* em cinco localidades de sua distribuição natural e 53 colônias de *P. nigriceps* em oito localidades no estado do Rio Grande do Sul. Para análise do padrão de venação da asa, foram marcados 13 marcos anatômicos na asa anterior direita de cinco a 20 operárias por colônia. A análise genética foi realizada avaliando um fragmento do gene Citocromo Oxidase I em *M. caerulea*, e Citocromo B em *P. nigriceps*. A análise morfométrica demonstrou estruturação dos grupos com separação estatisticamente significativa ($\alpha < 0,0001$) entre as localidades de *M. caerulea*. As distâncias morfométricas estão correlacionadas com a distância geográfica, e coerentes com regiões fisiográficas do bioma Pampa. A análise dos perfis de hidrocarbonetos distinguiu colônias de diferentes localidades, mas suas distâncias não apresentaram correlação com as distâncias geográficas. Foram encontrados seis haplótipos, todos exclusivos, com diversidade nucleotídica (π) de 0,01631 e uma diversidade haplotípica (H_d) de 0,74. Para *P. nigriceps*, as análises morfométricas apresentaram diferenças significativas entre localidades e correlação com as distâncias geográficas e biomas. A análise dos perfis de hidrocarbonetos distinguiu colônias de diferentes localidades, mas suas distâncias não apresentaram correlação com as distâncias geográficas. Foram encontrados 17 haplótipos, todos exclusivos, com diversidade nucleotídica (π) de 0,0147 e diversidade haplotípica (H_d) de 0,94. A presença de diversos haplótipos exclusivos, perfis morfométricos e de hidrocarbonetos cuticulares em populações pertencentes a diferentes biomas indicam a necessidade de uma atenção especial para estas populações no momento da definição de estratégias de conservação das espécies. Uma especial atenção às abelhas da espécie *Mourella caerulea*, que além de ser uma espécie representante única de um gênero monoespecífico, apresenta grandes distâncias populacionais entre os indivíduos de todas as localidades amostradas.

Palavras-chave: abelhas sem ferrão, *Mourella caerulea*, *Plebeia nigriceps*, morfometria geométrica, DNA mitocondrial, hidrocarbonetos cuticulares.

Abstract

Mourella caerulea and *Plebeia nigriceps* are two stingless bees with occurrence in the South region of Brazil. The first is commonly known as mirim-de-chão or bieira and the second is known as mirim nigriceps. Both species are important pollinators of native flora and crops. *M. caerulea* is related to Pampa biome and place nests on the ground. *P. nigriceps* occurs in both Pampa biome and Atlantic Rain Forest. This thesis had the objective of to evaluate the population variability of these species through three techniques: geometric morphometrics of wing, cuticular hydrocarbons (CHC) profiles and sequencing of fragments from mitochondrial DNA genes. We collected workers from 24 colonies for *M. caerulea* from five localities, and 53 colonies of *P. nigriceps* from eight localities in Rio Grande do Sul State. For the geometric morphometrics analysis, we used 13 landmarks plotted in the right forewing of five to 20 workers per nest. The fragments of mtDNA genes used for the molecular approach were from *Cytochrome Oxidase I* for *M. caerulea* and *Cytochrome B* for *P. nigriceps*. The morphometric approach discriminated the populations of *M. caerulea* from different localities ($\alpha < 0,0001$). The morphometric distances are correlated to geographic distances and go along with the physiographic regions of Pampa biome. CHC profiles differentiated the colonies of *M. caerulea* from different localities, but chemical distances are not in agreement with geographic distances. We found six haplotypes (all exclusives) with a nucleotide diversity (π) of 0.01631 and a haplotype diversity (H_d) of 0.74. For *P. nigriceps*, morphometric analysis was significant separating localities and in accordance with the geographic distances and biomes. CHC distinguished the colonies, but there was no significant correlation between this result and the geographic distances or biomes. mtDNA revealed 17 haplotypes (all exclusives) with a nucleotide diversity (π) of 0.0147 and a haplotype diversity (H_d) of 0.94. The discovery of different exclusives haplotypes, the morphometric and CHC profiles when comparing population belonging to different biomes indicate that we need to give a particular attention for these species at the moment of create conservation strategies for both biomes from Rio Grande do Sul. *M. caerulea* deserves a special concern once it is the only species of the monospecific genera, and its populations are distant between themselves.

Keywords: stingless bees, *Mourella caerulea*, *Plebeia nigriceps*, geometric morphometrics, mitochondrial DNA, cuticular hydrocarbons

Sumário

1 Introdução.....	1
2 Objetivos.....	17
3 Material e Métodos.....	19
3.1 Material Biológico.....	20
3.2 Características da área amostrada.....	22
3.3 Análises Morfométricas.....	28
3.4 Análises dos Hidrocarbonetos Cuticulares.....	30
3.5 Análises Moleculares.....	32
4 Resultados.....	36
4.1 <i>Mourella caerulea</i>	37
4.1.1 Análises Morfométricas.....	37
4.1.2 Análises dos Hidrocarbonetos Cuticulares.....	49
4.1.3 Análises Moleculares.....	62
4.2 <i>Plebeia nigriceps</i>	69
4.2.1 Análises Morfométricas.....	69
4.2.2 Análises dos Hidrocarbonetos Cuticulares.....	84
4.2.3 Análises Moleculares.....	97
5 Discussão.....	107
5.1 Morfometria Geométrica.....	108
5.2 Hidrocarbonetos Cuticulares.....	113
5.3 DNA Mitocondrial.....	116
6 Conclusões.....	122
Referências Bibliográficas.....	126

Introdução

1 Introdução

Abelhas: importância econômica e ambiental

Polinizadores desempenham um importante papel na maioria dos ecossistemas terrestres e desempenham um serviço vital para a manutenção, tanto das comunidades vegetais silvestres como da produtividade agrícola. Insetos, particularmente abelhas, são os principais polinizadores da maior parte dos cultivos agrícolas e vegetação nativa. A abelha melífera é capaz de aumentar a produtividade de 96% dos cultivos polinizados por animais (Klein *et al.*, 2007). Nos EUA, entre 1989 e 2000, houve um aumento de 36,3% na produção de amêndoas atribuído à polinização por *Apis mellifera* (Morse & Calderone, 2000). A abelha solitária *Megachile rotundata* é utilizada como principal polinizador na produção de alfafa (*Medicago sativa*), triplicando sua produção de sementes (Pitts-Singer & Cane, 2011).

No Brasil, as visitas de abelhas aumentaram em 20% o número de sementes produzidas em cebola (*Allium cepa* L.), sendo *Apis mellifera* a espécie mais frequente (Witter & Blochtein, 2003). O mesmo ocorre para canola (*Brassica napus* L.), que tem aumento de 22% de produção de sementes com visita de abelhas, em relação à autopolinização (Rosa *et al.*, 2011). Na produção de morangos (*Fragaria x ananassa* Duch.) as visitas de meliponíneos como *Tetragonisca angustula* (Malagodi-Braga & Kleinert, 2004) e *Plebeia nigriceps* (Witter *et al.*, 2012) contribuem para o aumento do peso dos frutos e ausência de deformidades.

As abelhas são responsáveis por cerca de 35% da produção mundial de alimentos através do serviço de polinização, desempenhando, desta forma, um papel econômico e ecológico fundamental para a humanidade (Klein *et al.*, 2007). O valor econômico anual

global da polinização agrícola realizada por insetos foi estimada em € 153 bilhões durante 2005, ou seja, 9,5% do valor econômico total da agricultura mundial, considerando apenas cultivos usados diretamente para alimentação humana. Apesar da abelha melífera realizar a polinização de muitas espécies vegetais nativas, sua contribuição não é bem suportada por dados empíricos, e a contribuição de polinizadores nativos pode ser maior do que a reconhecida previamente (Potts *et al.*, 2010).

As angiospermas representam a maior e mais diversa linhagem de plantas vasculares do planeta, sendo essa radiação explosiva justificada pela polinização mediada por animais. Insetos são os principais polinizadores, responsáveis por 70% da polinização dessas angiospermas e, entre os insetos, as abelhas são o grupo mais especializado. Todas as 16000 espécies atuais de abelhas vivem exclusivamente de recursos das angiospermas e são morfologicamente adaptadas para coletar, carregar e estocar estes recursos (Danforth *et al.*, 2006).

Na região Neotropical, um dos grupos de abelhas mais diversificados é o das abelhas sem ferrão (Meliponini) (Moure *et al.*, 2007). Camargo & Pedro (2013) reconheceram 417 espécies válidas. Entretanto, apesar desse grande esforço, a fauna total dos Meliponini não é devidamente conhecida e caracterizada devido a diversos fatores, tais como a inexistência de revisões taxonômicas sistematizadas na área, falta de informações precisas sobre nomenclatura válida e deficiências amostrais, com áreas pouco ou nunca amostradas (Freitas *et al.*, 2009).

Os esforços de coleta e levantamento sistemático da fauna de abelhas no Brasil não estão distribuídos homogeneamente ao longo de seu território, com uma tendência de concentração em algumas regiões e deixando outras de lado. A maioria dos estudos se concentra na região sudeste, especialmente no Estado de São Paulo, enquanto a

região Norte permanece sem uma amostragem sistematizada assim como na região Centro-Oeste, onde foram realizados poucos estudos. O que resulta em lacunas de amostragem em alguns biomas, como a Floresta Amazônica e o Pantanal Matogrossense (Freitas *et al.*, 2009).

O serviço de polinização depende de abelhas domesticadas e nativas, sendo que ambas podem ser afetadas por uma série de recentes alterações ambientais (Potts *et al.* 2010). No entanto, além do desconhecimento de boa parte de nossa fauna, estamos passando por uma redução considerável de alguns polinizadores. Nos Estados Unidos e Grã-Bretanha há registros do declínio de populações de abelhas *Bombus* (Goulson *et al.*, 2008). Biesmeijer (2006) relata a diminuição de polinizadores nativos na Grã-Bretanha e Países Baixos. Foi relatado um consistente declínio nas populações de abelhas melíferas no continente europeu entre 1985 e 2005, e uma diminuição de 59% das colônias nos Estados Unidos entre 1947 e 2005 (Potts *et al.*, 2010).

Entre os fatores que podem levar à diminuição das populações de polinizadores, podemos citar o uso inadequado de terras, com consequente perda e fragmentação de habitat, o aumento do uso de pesticidas, a poluição ambiental, introdução de espécies exóticas, patógenos e mudanças climáticas (Potts *et al.*, 2010).

A perda de habitat é geralmente o principal fator que leva ao declínio de polinizadores. A degradação de habitat pode afetar as espécies de abelhas primariamente pela diminuição da oferta de recursos florais e locais de nidificação (Alston *et al.*, 2007). Da mesma forma, o uso de inseticidas em doses letais ou subletais pode causar mortalidade por intoxicação direta das populações do entorno, resultando em mudanças locais na abundância e diversidade de abelhas nativas (Brittain *et al.*, 2010).

Os patógenos também são um importante causa do declínio dos polinizadores. Fürst e colaboradores (2014) mostram que patógenos encontrados em espécies nativas

de *Bombus* na verdade são oriundos de colônias comerciais de *Bombus* e abelhas melíferas manejadas.

As mudanças climáticas podem gerar impacto tanto em nível organizacional do indivíduo (mudando a atividade temporal das abelhas) como na genética de populações. Podem afetar a distribuição das espécies e as interações no nível de comunidade (mudando a composição e função nas comunidades de polinizadores) (Memmot *et al.*, 2007). Existem resultados sobre a alteração na distribuição de borboletas (Hickling *et al.*, 2006) e relação entre mudanças climáticas e declínio de abelhas do gênero *Bombus* (Williams *et al.*, 2009). Estudos de modelagem com base em distribuição geográfica e nicho ecológico têm sido aplicados para analisar as respostas das espécies aos impactos ocasionados em seus habitats. Há estudos predizendo a alteração na distribuição de sete espécies de *Centris* e três espécies de *Melipona* utilizando esta abordagem (Giannini *et al.*, 2012).

Mourella caerulea

Entre as abelhas sem ferrão, *Mourella caerulea* (Friese, 1900) é a única espécie representante do gênero *Mourella* Schwarz 1946, conhecida popularmente como mirim de chão ou bieira (Camargo & Wittmann, 1989), além de ser o único meliponíneo conhecido por apresentar coloração metálica. Ainda existem poucas informações sobre a espécie.

Seus ninhos são subterrâneos e exibem características arquitetônicas típicas de outros gêneros de abelhas de nidificação obrigatória no solo, como *Schwarziana* e os gêneros africanos *Meliplebeia*, *Plebeiella* e *Plebeina* (Camargo & Wittmann, 1989). Uma recente análise filogenética dos meliponíneos baseada em dados moleculares, apresenta *Mourella* como gênero irmão de *Schwarziana* (Rasmussen & Cameron,

2010).

Os ninhos estão associados a solos bem drenados e de origem granítica, com horizontes A e B pouco desenvolvidos e com abrupta transição para o horizonte C granítico. Ocupam cavidades entre raízes e outras cavidades subterrâneas menores, não existindo evidência de ocupação de ninhos de outros insetos sociais. Sua profundidade média é de 45-50 cm da entrada do ninho, podendo localizar-se a até 80 cm de profundidade (Camargo & Wittmann, 1989). De acordo com estes autores, os ninhos de *M. caerulea* foram localizados em áreas de florestas subtropicais, sendo que todos foram encontrados em áreas arbustivas abertas, consistindo principalmente de plantas da família Myrtaceae e também associadas a cultivos agrícolas. Segundo Witter & Blochtein (2003) operárias dessa espécie foram observadas visitando flores de cebola, cenoura e coentro, no município de Candiota - RS. Quanto ao forrageio, estas abelhas apresentam um amplo espectro de plantas visitadas, tendo sido reconhecidas vinte e cinco famílias botânicas, mais frequentemente representadas por Myrtaceae, Apiaceae, Rutaceae e Meliaceae (Camargo & Wittmann, 1989).

A espécie tem registro de ocorrência nos Estados do sul do Brasil: Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina, assim como em certas regiões do Paraguai e na província de Misiones, norte da Argentina (Camargo & Wittmann 1989, Silveira *et al.* 2002). No estado do Rio Grande do Sul, sua distribuição é conhecida para os municípios de Bagé, Caçapava do Sul, Candiota, Canguçu, Esteio, Guaíba, Lavras do Sul, Pinheiro Machado, Piratini, Porto Alegre, Rosário, Santana da Boa Vista, Santana do Livramento, São Leopoldo, São Lourenço do Sul, Viamão (Camargo & Wittmann, 1989; Witter *et al.*, 2007).

No Paraná, a referida espécie encontra-se em perigo de extinção (Mikich & Bérnils, 2004). Registros de sua ocorrência neste Estado sempre foram muito pontuais e

relacionadas à existência de Campos Naturais bem preservados, em especial no Terceiro Planalto Paranaense. Estes campos, porém, estão diminuindo de extensão rapidamente, principalmente nos últimos anos, devido ao avanço da agricultura. Embora a espécie não esteja ameaçada no Rio Grande do Sul, relatos de agricultores revelam que práticas agrícolas vêm resultando em destruição de ninhos. A perda de habitats, principalmente pelo avanço da agricultura sobre as áreas de Campos Naturais, destruindo ou aterrando os ninhos subterrâneos desta espécie e suprimindo suas fontes alimentares, paralelamente com a contaminação dessas com inseticidas, representam as principais ameaças a *Mourella caerulea* (Mikich & Bérnils, 2004).

Figura 1: *Mourella caerulea*. A- Operária forrageando em flor de gravatá (Bagé-RS); B- Entrada da colônia (Alegrete-RS); C- Vista lateral do ninho; D- Vista interna da colônia (Alegrete-RS). Créditos das fotos: A, B e D- Juliana Teixeira; C- Fernando Dias.

Plebeia nigriceps

Plebeia nigriceps (Friese, 1901) é uma das 16 espécies de abelhas sem ferrão pertencentes ao gênero *Plebeia* Schwarz, 1938 ocorrentes no Brasil, e uma das sete de distribuição conhecida no Rio Grande do Sul. Seu nome popular é mirim nigriceps, ou apenas mirim. *P. nigriceps* constrói seus ninhos em paredes de casas antigas ou recém-construídas, moirões de cercas construídos com árvores nativas e canos de água (Witter *et al.*, 2007). Seus favos de cria são horizontais e superpostos e podem ser dispostos de forma repartida, espalhados pelos diferentes espaços do oco, o que é facilitado pela ausência de invólucro. No lugar do invólucro observa-se uma rede de pilares que circundam a área de cria, além de depósitos de resinas nas paredes internas dos ninhos, no vestíbulo e no batume (Witter *et al.*, 2007).

P. nigriceps foi registrada ocorrendo em São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (Silveira *et al.*, 2002). No Rio Grande do Sul há registros para os municípios de Tenente Portela, São Francisco de Paula, Canela, Caxias do Sul, Bento Gonçalves e Planalto (Wittmann & Hoffman, 1990; Coleção de Abelhas do MCT/PUCRS). Nas excursões científicas e visitas a pequenos produtores rurais, ninhos de *P. nigriceps* também foram observados nos municípios de Pelotas, Turuçu, São Lourenço, Teutônia, Riozinho e Rolante (Witter *et al.*, 2007). A espécie ocorre tanto em áreas do bioma Mata Atlântica como do Pampa, estando vulnerável a alterações em ambos os tipos de ambiente.

Figura 2: *Plebeia nigriceps*. A- Operárias forrageando em flor de morango (Eldorado do Sul-RS); B- Vista interna da colônia (Eldorado do Sul-RS); C- Entrada da colônia em muro (Santa Maria-RS); D- Meliponário em propriedade rural (Turuçu-RS). Créditos das fotos: A e B- Sidia Witter; C e D- Juliana Teixeira.

Abordagens para estudos populacionais

Segundo Brown e Paxton (2009) as futuras estratégias de conservação precisam priorizar a minimização de perda de habitat, formar habitats de agricultura “amigáveis” para as abelhas, treinar cientistas e o público em geral em taxonomia e identificação de abelhas, estudos genéticos das populações para definir estratégias de conservação, avaliar o valor dos códigos de barra de DNA para a conservação de abelhas, determinar o impacto de plantas invasoras, animais, parasitas e patógenos e integrar essa informação para compreender o impacto potencial das mudanças climáticas na

diversidade atual de abelhas.

Atualmente, um dos maiores problemas encontrados para a conservação das espécies é a falta de dados sobre a distribuição e abundância de espécies de abelhas. Além do baixo número de taxonomistas, muito de nossa fauna ainda não foi descrita. Sem o conhecimento sobre onde as espécies vivem e quão abundantes são, é quase impossível medir seu declínio e gerar estratégias de conservação (Brown & Paxton, 2009). Sendo assim, novas ferramentas vêm sendo desenvolvidas para facilitar tal identificação e a avaliação da variabilidade populacional.

O desenvolvimento da biologia molecular nos propiciou formas de análise que facilitaram o entendimento das dinâmicas populacionais e do fluxo gênico entre os grupos, bem como a possível separação destes grupos em diferentes espécies. O DNA nuclear tem sido usado com muito sucesso nos estudos populacionais e de taxonomia molecular em abelhas sem ferrão, se mostrando bastante informativo para separação de espécies crípticas (Franck *et al.*, 2004), na descoberta e descrição de novas espécies (Tavares *et al.*, 2007), e também para estudos de estrutura populacional e diversidade genética (Thummajitsakul *et al.*, 2008).

Uma abordagem que foi introduzida para seu uso na identificação de espécies é o código de barras de DNA, que vem apresentando bons resultados até o momento. Proposta em 2003 (Hebert *et al.*, 2003) e baseada na premissa que as diferenças inter-específicas na sequência dos genes são maiores que as diferenças intra-específicas, esta metodologia consiste no sequenciamento de uma parte de aproximadamente 650 pares de bases do início do gene da citocromo oxidase I (CO I) e da comparação destas sequências entre os grupos. Segundo revisões, esta região se mostra distinta na vasta maioria dos casos animais estudados até o momento (>95%) (Vogler & Monaghan, 2007; Waugh, 2007).

Em abelhas, alguns resultados têm demonstrado a efetividade da técnica na identificação dos grupos, como por exemplo, a completa fauna de abelhas de uma região taxonomicamente bem conhecida foi testada e as 150 espécies presentes nesta fauna foram prontamente identificadas, juntamente com a descrição de algumas espécies crípticas e com a descoberta de algumas sinonímias em espécies cujas descrições estavam baseadas em somente indivíduos de um sexo (Sheffield *et al.*, 2009). Já em um segundo caso, *Dialictus* (Halictidae, gênero *Lasioglossum*), um subgênero taxonomicamente muito confuso e de difícil identificação devido a sua morfologia pouco variável foi também testado, sendo que neste caso os resultados também foram muito importantes para a taxonomia do grupo, onde diversas espécies crípticas e sinonímias foram descobertas (Packer *et al.*, 2008).

Em estudos populacionais e de diversidade, o DNA mitocondrial é uma molécula interessante por suas características, tais como a alta taxa de substituições de base, apresentar herança materna e ausência de recombinação (Arias *et al.*, 2003). Em meliponíneos, há estudos empregando o mtDNA como marcador molecular com diversas espécies, abordando diversos aspectos da variabilidade genética e populacional. Entre eles há estudos de diversidade genética em populações de *Plebeia remota* (Francisco *et al.*, 2008, Francisco & Arias, 2010; Francisco *et al.*, 2013), estrutura populacional de *Partamona helleri* (Brito & Arias, 2010), baixa diversidade mitocondrial em *Partamona mulata* (Brito *et al.*, 2013), hibridização entre *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca fiebrigi* (Francisco *et al.*, 2014), estrutura populacional de *Melipona subnitida* (Bonatti *et al.*, 2014).

Outra ferramenta importante que tem se mostrado eficiente na identificação e separação de espécies, subespécies e ecótipos é a morfometria geométrica (Francoy *et al.* 2008, 2009, Francoy & Imperatriz Fonseca, 2010) e dentre as atuais técnicas existentes,

a de análises de posições relativas de marcos anatômicos vem se mostrando muito promissora na diferenciação de grupos. O teste, que é baseado nas variações das coordenadas Cartesianas destes marcos anatômicos, nos permite analisar e identificar as variações de forma entre estruturas morfológicas homólogas nos diferentes exemplares em estudo (Rohlf & Marcus, 1993).

Os primeiros trabalhos utilizando morfometria geométrica e os padrões de venação de asas anteriores para diferenciação de grupos de abelhas foram realizados com abelhas africanizadas e suas subespécies ancestrais. A análise de deformações relativas dos padrões de nervura de asa atingiu sucesso de 85% de classificações corretas nas análises subespecíficas de *Apis mellifera*. As maiores taxas de erro na classificação ficaram junto às subespécies que pertencem ao mesmo ramo evolutivo, sendo as mesmas dificilmente distinguidas mesmo pelos métodos tradicionais já estabelecidos (Francoy *et al.*, 2008). Tais resultados indicam ainda que as abelhas africanizadas apresentam padrão de venação de asas completamente diferente das suas subespécies ancestrais, podendo ser facilmente identificada por tal característica, com taxas de acerto de 99%.

Em abelhas sem ferrão, o primeiro trabalho realizado com este tipo de análise demonstrou que duas populações de *Plebeia remota*, mantidas no mesmo local por mais de dez anos, não apresentam fluxo gênico, sendo que até o momento as populações eram reconhecidas como sendo pertencentes à mesma espécie. Juntamente com outros marcadores, como DNA mitocondrial e hidrocarbonetos cuticulares, tais resultados foram reforçados na proposição de que as populações são duas espécies distintas (Francisco *et al.*, 2008). Também já foram realizados diversos outros testes utilizando a morfometria geométrica, como a diferenciação de 93,4% dos indivíduos do gênero *Plebeia* (Silva, 2006), a diferenciação de sub-populações de *Nannotrigona*

testaceicornis (Mendes *et al.*, 2007), a diferenciação de machos e operárias em cinco espécies diferentes (Francoy *et al.*, 2009), o rastreamento da origem geográfica de colônias de *Melipona beecheii*, bem como confirmar a diferenciação desta espécie em linhagens genéticas (Francoy *et al.*, 2011) e a separação de populações de *Melipona subnitida* em pelo menos duas linhagens evolutivas (Bonatti *et al.*, 2014).

Todos estes resultados acabaram por consolidar a efetividade da técnica de análises de posições relativas de coordenadas Cartesianas na discriminação das espécies de abelhas sem ferrão. Esta é uma técnica rápida e de baixo custo, o que a torna bastante adequada para o reconhecimento das espécies e avaliação da variabilidade existente dentro e entre os grupos estudados.

Uma terceira metodologia que vem se mostrando muito promissora na análise de variabilidade intra e interespecíficas é a análise de hidrocarbonetos cuticulares. Os hidrocarbonetos cuticulares encontrados no perfil dos insetos são classificados em alcanos, alcanos ramificados, alcenos e alcadienos. São lipídios presentes na camada mais externa da cutícula dos insetos, o envelope, e que apresentam como função primária a impermeabilização do tegumento, evitando a dessecação e agindo como barreira contra patógenos (Lockey, 1988). No entanto estes compostos desempenham funções secundárias, tais como o reconhecimento intra e interespecífico e diferenciação sexual. Em espécies de insetos sociais caracteriza também a diferenciação de castas, de atividade desenvolvidas no interior da colônia e reconhecimento inter e intra-colonial (Howard & Blomquist, 2005; Nunes *et al.*, 2009; Ferreira-Caliman, 2010).

Essa diferenciação é causada pela riqueza de compostos e a variação quantitativa destes hidrocarbonetos, uma vez que este perfil se mantém constante ao longo do tempo devido à fatores genéticos. As funções secundárias dos hidrocarbonetos são consideradas uma razão para a diversidade de compostos encontrada em insetos.

Perfis de hidrocarbonetos cuticulares têm sido usados como caráter taxonômico, na identificação de espécies crípticas e na distinção de populações de insetos. Estudos sobre Diptera, Hemiptera, Orthoptera, Isoptera e Hymenoptera utilizam o perfil de hidrocarbonetos cuticulares para a resolução de problemas taxonômicos e populacionais. Os hidrocarbonetos se tornam mais interessantes para estudos populacionais em insetos sociais devido à sua importância na comunicação destes, comprovada por bioensaios utilizando os compostos (Châline *et al.*, 2005).

A metodologia já foi utilizada para a diferenciação populacional das espécies de meliponíneos *Plebeia remota* (Francisco *et al.*, 2008) e *Melipona marginata* (Ferreira-Caliman *et al.*, 2012) e se mostrou promissora, identificando colônias de populações distintas.

O Pampa e a Mata Atlântica do Rio Grande do Sul estão severamente ameaçados devido ao desmatamento, atividades agrícolas e silvícolas e ocupação humana. As áreas originais dos biomas foram drasticamente reduzidas e sua apifauna é pouco conhecida, tanto em número de espécies como em sua variabilidade genética. Apifauna essa que colabora com a manutenção de ambos os biomas. No Rio Grande do Sul, de acordo com o Banco de Dados do Centro de Meteorologia Aplicada da Fepagro não se observa uma tendência de aumento nas temperaturas mínimas, entretanto verifica-se uma tendência de aumento das temperaturas máximas em locais pontuais do Estado.

Mourella caerulea é um gênero monoespecífico, pouco estudado e ecologicamente muito importante. Das seis espécies de meliponíneos listadas no levantamento de Wittmann e Hoffmann (1990), é a única endêmica do Pampa. *Plebeia nigriceps* é uma das nove espécies pertencentes ao gênero *Plebeia* ocorrentes no estado, e ocupa ambos os biomas. As duas espécies possuem distribuição restrita ao sul do Brasil e América do Sul, sendo uma espécie de ocorrência em regiões de clima frio. Em

tempos de mudanças climáticas, estudos de variabilidade genética de populações de clima frio são extremamente importantes para prever cenários futuros relacionados à conservação dos polinizadores destas áreas.

Dado esse contexto, este trabalho tem como objetivo a investigação da variabilidade populacional das espécies de meliponíneos *M. caerulea* e *P. nigriceps*, através de dados morfométricos, químicos e moleculares, para fins de entendimento de sua estrutura populacional, visando subsídios que possam ser utilizados no desenvolvimento de estratégias futuras para sua conservação.

Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo caracterizar e mapear a variabilidade populacional das abelhas *Mourella caerulea* e *Plebeia nigriceps* em localidades dentro de sua área de ocorrência, com o intuito de gerar dados que possam auxiliar no entendimento de sua estruturação populacional e fornecer subsídios para a sua conservação.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a diversidade dos padrões morfométricos, de hidrocarbonetos cuticulares e do DNA mitocondrial de *Mourella caerulea* e *Plebeia nigriceps* em localidades distribuídas ao longo da área de ocorrência das espécies;
- Verificar a possibilidade de rastreamento geográfico das diferentes populações da espécie, bem como sua estrutura, a dinâmica das populações e o fluxo gênico entre elas;
- Determinar os haplótipos mitocondriais e suas relações genéticas;
- Verificar se a diversidade de ambientes onde habitam estas espécies são compatíveis com sua variabilidade genética, química e morfológica ou se estas espécies são homogêneas quanto a essas características;
- Correlacionar os diferentes padrões de variabilidade encontrados nas populações.

Material e Métodos

3 Material e Métodos

3.1 Material biológico

Foram realizadas coletas de *Mourella caerulea* e *Plebeia nigriceps* em localidades de sua distribuição natural. As coletas consistiram de 10 a 20 operárias por colônia. Para *P. nigriceps*, devido ao pequeno tamanho das abelhas (em torno de 3 mm), além da rede entomológica, as coletas foram realizadas com auxílio de aspirador entomológico. Ao todo, foi coletado material de 24 colônias de *M. caerulea* e 53 de *P. nigriceps*. As coletas de *M. caerulea* foram realizadas em Alegrete (29°47'5.29"S 55°46'32.37"O) (14 colônias), Candiota (31°35'59.99"S 53°43'59.94"O) (3 colônias), Turuçu (31°25'18.74"S 52°10'39.86"O) (6 colônias) e Viamão (30° 5'18.09"S 51° 1'25.64"O) (1 colônia). Além disso, na localidade de Bagé (31°19'13.96"S 54°10'24.42"O), foram coletadas abelhas nas flores, dada a dificuldade de se encontrar ninhos naturais na espécie. No total, foram coletadas 540 operárias. As coletas de *P. nigriceps* foram realizadas em Alegrete (29°47'5.29"S 55°46'32.37"O) (2 colônias), Anta Gorda (28°58'20.85"S 52° 0'17.08"O) (13 colônias), Ivorá (29°31'11.42"S 53°35'2.51"O) (3 colônias), Poço das Antas (29°27'12.81"S 51°40'10.63"O) (4 colônias), Riozinho (29°38'24.82"S 50°27'36.75"O) (8 colônias), Santa Maria (29°41'8.91"S 53°48'26.95"O) (8 colônias), Turuçu (31°25'18.74"S 52°10'39.86"O) (10 colônias) e Westfalia (29°25'42.32"S 51°45'57.78"O) (5 colônias), totalizando 610 operárias coletadas (Figura 3). Imediatamente após as coletas, as amostras tiveram seus hidrocarbonetos cuticulares extraídos de acordo com a metodologia a ser descrita no subitem 3.4.1 e posteriormente foram acondicionadas em frascos contendo álcool absoluto e armazenadas a -20°C para a realização das análises morfométricas e moleculares.

Figura 3: Mapa das localidades coletadas. Em amarelo, coletas de *M. caerulea*. 1 –Bagé, 2–Candiota; 3 – Viamão. Em vermelho, coletas de *P. nigriceps*. 1 – Santa Maria; 2 – Ivorá; 3 – Anta Gorda; 4 – Westfalia; 5 – Poço das Antas; 6 - Riozinho. Em verde, coleta de ambas as espécies. 1 – Alegrete; 2 – Turuçu.

3.2 Características da área amostrada

Os municípios de Alegrete, Bagé, Candiota e Turuçu, localizados na metade sul do Estado do Rio Grande do Sul, pertencem ao bioma Pampa. Segundo a classificação por regiões fisiográficas (Fortes, 1979) do Estado que leva em consideração características geológicas e de vegetação, Alegrete e Bagé está localizado na região da Campanha, enquanto Candiota pertence à Serra de Sudeste (Escudo Sul-Riograndense) e Turuçu corresponde à Encosta da Serra do Sudeste, região costeira à Lagoa dos Patos.

Um bioma de tamanho reduzido em território brasileiro (apenas 176496 km²) e pouco estudado sobre sua apifauna é o Pampa. O Pampa Brasileiro ocupa 63% do estado do Rio Grande do Sul e apresenta, em sua extensão, os climas subtropical e temperado, com quatro estações do ano definidas. É o segundo menor bioma do Brasil, compreendendo apenas 2,07% do território nacional, sendo maior somente que o bioma Pantanal. A vegetação dominante é composta por gramíneas, seguidas por arbustos e poucas formações arbóreas. Devido à presença das gramíneas, a pecuária extensiva é a principal atividade econômica desenvolvida em seus domínios. O solo da região, originário de rochas sedimentares, é extremamente arenoso e frágil, muito sensível à erosão pela ação d água e do vento. A fragilidade do solo, associada às condições climáticas, leva à sua intensa degradação por atividades humanas inapropriadas (Roesch *et al.*, 2009).

O Pampa é dividido em quatro formações geológicas: Plataforma Continental, Depressão Central, Formação da Serra Geral e Escudo Sul-Riograndense, este último corresponde à formação mais antiga, composta por rochas ígneas cristalinas do período

Pré-Cambriano. Quanto à vegetação, é formado por vegetação costeira (localizado na planície costeira) e por savana, que domina quase a totalidade da porção oeste do bioma.

Figura 4: Mapa dos tipos de vegetação do Rio Grande do Sul. Vegetações do Bioma Pampa: Áreas de formações pioneiras (cinza); Savana (roxo), Estepe (vermelho escuro); Savana Estépica (azul escuro); Floresta Estacional Semidecidual (azul petróleo); Floresta Estacional Decidual (marrom); contato entre vegetações (verde) (UFMS/SEMA-RS, 2007).

No presente, o Pampa representa um clima típico para o desenvolvimento de ecossistemas florestais. Contudo formações florestais densas não são comuns no Pampa, sendo que as principais são encontradas no limite norte do bioma, na área de transição com a Floresta Atlântica. Em outras regiões, formações com árvores são encontradas principalmente em matas de galerias, capões e florestas arbustivas (Roesch *et al.*, 2009, Hasenack *et al.*, 2010). São estimadas entre 3000 e 4000 espécies de gramíneas no sul do Brasil, pelo menos nove delas são endêmicas do bioma Pampa. Não obstante, de acordo com censo realizado pelo IBGE, entre 1970 e 2006 a área ocupada por campo nativo diminuiu de 14 para 8,9 milhões de hectares, o que corresponde a uma perda de

36% de campo. Essa redução de áreas de campo nativo pode levar à perda de biodiversidade.

Entre 2008-2009, o Bioma perdeu 331 Km² de área com a supressão de vegetação nativa, equivalente a taxa de 0,18% de sua totalidade. O município de Alegrete, na região de fronteira oeste do Estado do Rio Grande do Sul, foi o município que mais desmatou neste período em números absolutos, sendo 51,93 Km² equivalentes a 0,67% da área do município. A rizicultura (plantação de arroz), a pecuária e a expansão da substituição de vegetação nativa pelas plantações de eucalipto e pinus são as atividades que pressionam o desmatamento no Pampa (MMA, 2012).

No Brasil, muitas espécies de plantas e animais ocorrem apenas no Pampa, o que implica em altos níveis de endemismo (Ferreira & Boldrini, 2011). Boa parte de estudos a respeito de sua biodiversidade compreende a fauna de vertebrados, muitos deles representantes de espécies ameaçadas (Machado *et al.*, 2008). Poucos estudos relatam quais insetos habitam o Pampa e o único levantamento de abelhas naquela área, que também corresponde ao levantamento de espécies de abelhas de todo o Estado do Rio Grande do Sul, data de 1990, onde o Estado foi dividido em sete regiões fisiográficas, adaptadas de Fortes (1979). Foram registradas 320 espécies de abelhas ocorrentes no Estado, sendo que dentre as 20 espécies de meliponíneos listadas, apenas seis foram relatadas como ocorrentes no Pampa: *Lestrimelitta limao* (Smith, 1863), *Mourella caerulea* (Friese, 1900), *Plebeia emerina* (Friese, 1900), *Plebeia wittmanni* Moure & Camargo, 1989, *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier, 1836) e *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793) (Wittmann & Hoffmann, 1990). No entanto esses valores são subestimados, pois há registro de mais espécies de meliponíneos ocorrentes no bioma, tais como *Plebeia nigriceps* (Witter *et al.*, 2007) e *Tetragonisca angustula*.

Figura 5: Ameaças ao bioma Pampa. A- Plantio de *Eucalyptus* (Bagé-RS); B- Desertificação (Alegrete –RS); C- Agricultura (Bagé-RS) ; D-queimada (Bagé-RS). Créditos: Juliana Teixeira.

Anta Gorda, Poço das Antas, Riozinho e Westfalia, localizados na porção norte do estado, pertencem ao bioma Mata Atlântica, no Planalto Meridional.

A Mata Atlântica Brasileira originalmente cobria uma área de aproximadamente 1,1 milhão de km², correspondendo a 12% da superfície do país. A Mata Atlântica Brasileira originalmente cobria uma área de aproximadamente 1,1 milhão de km², correspondendo a 12% da superfície do país. A Floresta Atlântica é a segunda maior floresta tropical úmida da América do Sul, superada apenas pela Floresta Amazônica (Oliveira-Filho & Fontes, 2000). Este bioma está entre as florestas tropicais mais ameaçadas do mundo, principalmente porque sua distribuição corresponde às áreas mais populosas do Brasil. Hoje a Mata Atlântica corresponde à apenas 11, 43% da cobertura original, e a maioria de seus fragmentos são menores que 50 hectares (Ribeiro *et al.*, 2009).

No Rio Grande do Sul, a Mata Atlântica ocupa 37% do território do Estado, em sua porção norte. Atualmente, restam 7,5 % de remanescentes da Mata Atlântica, em relação à cobertura vegetal original (SEMA-RS, 2014). É dividida em floresta ombrófila densa (floresta atlântica), floresta ombrófila mista (com araucárias), florestas estacionais decidual e semi-decidual e matas de restinga. Além das florestas, a Mata Atlântica do Rio Grande do Sul é formada pelos campos de altitude e seus banhados, pelas demais vegetações de restinga e áreas úmidas associadas (UFSC/SEMA-RS, 2007). Entre 2012 e 2013 o estado registrou um aumento de 43% de desmatamento do bioma (SOS Mata Atlântica, INPE, 2014). Além do plantio de *Pinus*, a Mata Atlântica no Rio Grande do Sul também tem como ameaça o corte ilegal de *Araucaria angustifolia*.

Levantamentos de abelhas realizados em áreas de Mata Atlântica no Rio Grande do Sul relatam 16 espécies de meliponíneos ocorrentes no bioma (Alves-dos-

Santos, 1999; Harter-Marques, 1999; Wilms *et al.*, 1997; Wittmann & Hoffman, 1990).

Santa Maria e Ivorá, assim como Viamão localizam-se na Depressão Central, e possuem tanto características do bioma Mata Atlântica como do Pampa.

Figura 6: Ameaças à Mata Atlântica. A- Fragmentação da Mata (Riozinho –RS); Silvicultura (Poço das Antas –RS). Crédito das fotos: Juliana Teixeira

3.3 Análises Morfométricas

Para avaliar o padrão de venação das asas anteriores, a asa anterior direita de cada indivíduo coletado foi retirada com o auxílio de pinças e montada entre lâmina e lamínula. Estas asas tiveram sua imagem capturada por uma câmera digital acoplada a um estereomicroscópio e foram armazenadas em um computador.

Para a análise de deformações parciais, foi criado um arquivo com extensão .tps com o auxílio do software tpsUtil versão 1.40 (Rohlf, 2009), que serve de banco de dados para armazenamento das coordenadas cartesianas dos marcos anatômicos assinalados nas imagens. Foram marcados manualmente 13 marcos anatômicos nas junções de nervuras das células das asas anteriores de *M. caerulea* (Figura 7) e nas asas de *P. nigriceps* (Figura 8), utilizando o software tpsDig 2.12 (Rohlf, 2005a).

Figura 7: Asa anterior direita de operária de *M. caerulea*. Os pontos em vermelho representam o posicionamento dos marcos anatômico nas junções das nervuras.

Figura 8: Asa anterior direita de operária de *P. nigriceps*. Os pontos em vermelho representam o posicionamento dos marcos anatômico nas junções das nervuras.

As imagens foram então alinhadas de acordo com a metodologia de Procrustes, em que as imagens das asas são redimensionadas para um tamanho uniforme, sobrepostas com base em seus centróides e rotacionadas para produzirem um alinhamento ideal, onde o somatório das distâncias entre os marcos anatômicos homólogos seja a menor possível. Desse modo, as diferenças restantes são correspondentes à variação de forma, independentes do tamanho das estruturas, eliminando-se assim parte da influência ambiental que afeta o desenvolvimento dos organismos (Klingenberg & McIntyre, 1998).

A sobreposição de Procrustes, produção de matriz de covariância, análise de componente principal, análise de variáveis canônicas, cálculo das distâncias de Mahalanobis entre os centros dos grupos, análise discriminante para verificação da variabilidade dos grupos seguido de teste de validação foram realizadas com o software MorphoJ 1.03a (Klingenberg, 2011).

Para a construção de dendograma de proximidade morfológica pelo método de *Neighbor Joining* foi utilizado o software MEGA versão 5.05 (Tamura *et al.*, 2011).

A distância geográfica, em linha reta entre as populações, em quilômetros, a partir das coordenadas geográficas das cidades foi identificada utilizando a ferramenta Google Earth versão 6.1.0.5001 (Google Inc., 2011). Para verificação de correlações

significativas entre as distâncias morfológicas e distâncias geográficas das localidades estudadas foi também realizado teste de Mantel, com o auxílio do software TFPGA (Miller, 1997).

Devido aos estudos envolvendo morfometria geométrica em abelhas sem ferrão serem relativamente recentes, existem poucos dados na literatura para a maioria das espécies. Dessa forma, os dados obtidos para as cinco localidades de *M. caerulea* amostradas neste trabalho foram comparados com representantes de seu gênero irmão, *Schwarziana quadripunctata* (Lepeletier, 1836), e outras espécies próximas segundo Rasmussen e Cameron, 2010, como *Plebeia droryana* (Fries, 1900), *Plebeia pugnax*, *Plebeia remota* (Holmberg, 1903), *Plebeia saiqui* (Fries, 1900), *Lestrimellita limao* (Smith, 1863) e *Nannotrigona testaceicornis* (Lepeletier, 1836), de modo a se obter um padrão de comparações.

Para realizar a comparação das localidades amostradas de *P. nigriceps*, utilizamos outras espécies pertencentes ao gênero *Plebeia* Schwarz, 1938: *Plebeia droryana* (Fries, 1900), *Plebeia pugnax*, *Plebeia remota* (Holmberg, 1903), *Plebeia saiqui* (Fries, 1900), *Plebeia flavocincta* (Cockerell, 1912).

3.4 Análise dos hidrocarbonetos cuticulares

3.4.1 Extração de hidrocarbonetos

Para extração dos hidrocarbonetos cuticulares presentes na cutícula de *M. caerulea* e *P. nigriceps* operárias foram coletadas em frasco de vidro (*vial*) de 2 ml (1 frasco por indivíduo) e sacrificadas por resfriamento. A cada *vial* com amostra foi adicionado 1 ml de n-hexano 95% (Mallinckrodt Chemicals) por um minuto. O hexano

foi utilizado como solvente para remoção e eluição dos hidrocarbonetos da superfície do corpo das abelhas por ser um composto apolar. O hexano das amostras foi evaporado, restando apenas os hidrocarbonetos no interior dos vials. As amostras foram ressuspensas em 50 µl de hexano e analisadas em um sistema de Cromatografia Gasosa acoplado à Espectrometria de Massas SHIMADZU, modelo GCMS QP2010, equipado com coluna DB 5MS 30m e hélio como gás carreador à 1 ml/min, utilizando o método de ionização eletrônica (EI) afim de se determinar o espectro do pico molecular e fornecer informações a respeito das estruturas. O volume de injeção de amostra foi 1,5 µl. O protocolo de temperatura foi 150°C – 280°C a uma taxa de 3°C/min (mantido por 15 minutos).

3.4.2 Análise

Os dados foram analisados com o auxílio do programa GCMS Solutions for Windows 2.6 (Shimadzu Corporation). Os cromatogramas geralmente apresentam vários picos cromatográficos em posições diferentes devido aos diferentes tempos de retenção (RT) de cada soluto na coluna cromatográfica. Cada pico por sua vez contém todas as informações obtidas pelo espectrômetro de massa. A quantificação relativa dos compostos foi realizada com base nas áreas de pico obtidas pelos cromatogramas e a identificação dos compostos com base em seu íon molecular (Singer & Espelie, 1992).

A porcentagem dos compostos foi ajustada para 100% e cada área do pico transformada de acordo com a fórmula $Z = \ln[A_p/g(A_p)]$, onde A_p é a área do pico, $g(A_p)$ é a média geométrica para cada amostra e Z é a área do pico transformada (Aitchison, 1982).

Análise de Componentes Principais e Análise de Variáveis Canônicas foram realizadas com o auxílio do programa Past v 3.04 (Hammer *et al.*, 2001).

Para discriminar as amostras de diferentes localidades de acordo com seus perfis de hidrocarbonetos cuticulares, foi realizado teste PerMANOVA no software R (versão 3.0.0; pacote vegan: versão 2.0e7). Este teste permite analisar a dispersão das amostras em torno do centroide de cada grupo, fornecendo um resultado baseado em testes de permutação (10000 permutações). Os resultados foram plotados em um gráfico de dispersão com as duas Coordenadas Principais como eixos.

Para verificar as diferenças entre localidades de acordo com seu perfil, foi utilizado o package pvclust v. 1.3-2 (Suzuki & Shimodaira, 2006) para R (v. 3.1.2 para Mac OS). Foram realizadas 10000 replicações de *bootstrap* em cada comparação.

Esse pacote fornece o Approximately Unbiased (AU) p-values para suportes de bootstrap (BP). Agrupamentos com valores de AU superiores a 95% são considerados fortemente suportados por seus dados.

3.5 Análises Moleculares

3.5.1 Extração de DNA

Para análise do DNA mitocondrial e nuclear, uma perna de uma operária por colônia de *M. caerulea* e *P. nigriceps* foi removida com o auxílio de pinças esterilizadas (flambadas). O DNA total do tecido foi extraído segundo protocolo de extração de DNA por Chelex® 100 (Walsh *et al.*, 1991). As pernas de cada indivíduo foram colocadas em tubos de micro centrífuga contendo 100 µl de Chelex e 5 µl de proteinase K por amostra. As pernas foram aquecidas por uma hora em termociclador *Applied Biosystems geneAmp PCR System 9700* à 55°C, seguidos de 15 minutos à 99°C e 37°C por um minuto, a fim de denaturar a proteinase K, inibindo sua atividade.

3.5.2 Amplificação

Posteriormente, o material genético foi submetido a PCR para amplificação de genes mitocondriais.

Para *M. caerulea* foi analisado o gene Citocromo C Oxidase subunidade I (COI). Para isso foi utilizado o par de *primers* BarbeeF (5'- CAA CAA ATC ATA AAA ATA TTG G – 3') (Françoso & Arias, 2013) e MtD9 (5'- CCC GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC – 3') (Simon *et al.*, 1994). O *primer* BarBeeF foi desenhado com o objetivo de amplificar regiões de *barcode* de abelhas, em especial pertencentes ao grupo dos corbiculados (Françoso & Arias, 2013), o que justifica sua escolha para este estudo. O *primer* MtD9 (Simon *et al.*, 1994) foi usado para ligar-se à região 3' do COI. O tamanho de fragmento esperado gerado pelo pareamento destes *primers* é de 619 pb.

Para *P. nigriceps* foi analisado o gene Citocromo B. Para isso foi utilizado o par de *primers* MtD26 (5'- TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC – 3') e MtD28 (5'- ATT ACA CCT CCT AAT TTA TTA GGA AT – 3') (Simon *et al.*, 1994).

A reação de PCR foi realizada com 5 µl de DNA, 2 µl de *primer* FWD (10 pmol), 2 µl de *primer* REV(10 pmol), 25 µl de solução Promega PCR Master Mix 2x [*Taq* – DNA – Polymerase (0,05 unidade/µl); 2x *reaction buffer*, 400 µM de cada dNTP e 3mM MgCl²] e 16 µl de água bidestilada e autoclavada, totalizando um volume de 50µl.

A amplificação do locus foi feita em um termociclador *Applied Biosystems geneAmp PCR System 9700* com as seguintes condições: 1 ciclo inicial de 5 minutos a 94°C , seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto e 20 segundos a 40°C (para o par de *primers* BarbeeF e MtD9) ou 42°C (para o par de *primers* MtD26 e MtD28) , 2 minutos a 64°C, seguidos de 10 minutos de extensão a 64°C. Os fragmentos

amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com Gel Red™ e observados em luz UV.

3.5.3 Sequenciamento

Após a confirmação da existência do fragmento esperado por eletroforese em gel, as bandas correspondentes aos fragmentos foram recortadas e purificadas utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega) conforme protocolo recomendado pelo fabricante.

Após purificação o conteúdo de DNA das amostras foi quantificado em Nanodrop (ND 1000) e enviado para sequenciamento pelo Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da UNESP Jaboticabal.

3.5.4 Análise

As sequências obtidas foram visualizadas, editadas e alinhadas com o software Geneious 5.1.6 (Drummond *et al.*, 2011). Para o alinhamento das sequências foi utilizado o algoritmo “muscle” (Edgar, 2004) com um número máximo de oito interações. Com o auxílio deste programa também foi realizada a tradução das sequências em aminoácidos para identificar códons de parada.

O software DnaSP v.5.10 (Librado & Rozas, 2009) foi utilizado para separar os haplótipos em seus respectivos grupos e determinar o número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (H_d), índice de diversidade nucleotídica (π) e o número médio de diferenças nucleotídicas (k).

A rede de haplótipos foi construída através do programa NETWORK v. 4.6 (Polzin & Daneshmand, 2003), utilizando-se o algoritmo *Median Joining* (Bandelt *et*

al., 1999) que identifica os haplótipos mais proximamente relacionados. O número médio de sítios variáveis entre populações e intra-populacional foi calculado pelo programa MEGA versão 5.5 (Tamura *et al.*, 2011).

A matriz de distância- p (d) entre os haplótipos foi calculada usando o modelo de Kimura-two-parameter (K2P) (Nei & Kumar, 2000) e, então, utilizada para construção de um cladograma pelo método de *Neighbor Joining* através do software MEGA versão 5.05 (Tamura *et al.*, 2011).

Com o software Arlequin versão 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) foram realizado s cálculo de F_{st} par a par e análises de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), com o objetivo de estimar a variabilidade entre os grupos estudados. Para verificação de correlações significativas entre as distâncias genéticas e distâncias geográficas das localidades estudadas foi também realizado teste de Mantel, com o auxílio do software TFPGA (Miller, 1997).

Resultados

4 Resultados

4.1 *Mourella caerulea*

4.1.1 Análises Morfométricas

As amostras das asas de forrageiras de *M. caerulea* foram identificadas conforme sua localidade de origem, totalizando cinco grupos: Alegrete, Bagé, Candiota, Turuçu e Viamão. A partir da configuração consenso calculada a partir dos 13 marcos anatômicos plotados nos pontos de intersecção de nervuras nas asas, obteve-se os resíduos de Procrustes (Figura 9). Com exceção dos marcos anatômicos 8, 9, 10, 11 e 13, que variaram de forma alotrópica, os demais pontos variam de forma isotrópica.

Os marcos anatômicos que apresentaram maior variação foram, em ordem decrescente, 4, 5, 12 e 3 (Tabela 1).

Figura 9: Configuração consenso dos 13 marcos anatômicos marcados nas junções das nervuras das asas de operárias de *M. caerulea*. Pontos pretos representam os resíduos de Procrustes e pontos azuis representam a média dos resíduos de cada marco anatômico.

Tabela 1: Contribuição relativa de cada marco anatômico para a variação total dos dados encontrada entre as localidades coletadas de *M. caerulea*.

Marco anatômico	Variação %
1	1,719
2	1,936
3	9,951
4	32,500
5	20,215
6	1,363
7	4,392
8	3,183
9	3,627
10	4,506
11	6,563
12	10,039
13	0,005

As Análises de Componente Principal, a partir dos resíduos de Procrustes das coordenadas Cartesianas alinhadas dos 13 marcos anatômicos, geraram 22 medidas de deformações relativas ($k = 2n-4$, sendo “k” o número total de deformações relativas e “n” igual ao número de marcos anatômicos). A análise mostra o componente PC1 (33,16%) como principal eixo de variação na análise, seguido dos PC2 (12,87%) e PC3 (9,98%) (Figura 10).

Figura 10: Representação gráfica da porcentagem da variância das 22 medidas de deformações relativas dos Componentes Principais.

No gráfico de dispersão exibindo os dois componentes de maior variação as localidades se dividem em dois agrupamentos segundo o eixo correspondente à PC1 (Figura 11), um grupo contendo as localidades de Alegrete e Bagé, e o outro contendo as localidades de Candiota, Turuçu e Viamão. Não há separação de grupos segundo o eixo correspondente à PC2.

Figura 11: Representação gráfica da Análise de Componente Principal das localidades de *M. caerulea* obtida a partir das análises dos 13 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas.

Na Análise de Variáveis Canônicas, realizada com base na matriz de covariância de todos os grupos, foram encontrados quatro eixos que maximizam a separação significativa dessas localidades, sendo o primeiro responsável por 73,98% da variação (Tabela 2). Os valores de variância dos dois primeiros eixos canônicos somados correspondem à aproximadamente 90% de toda a variabilidade das amostras.

Tabela 2: Variação dos eixos das variáveis canônicas.

	Autovalores	% Variância	% Cumulativa
1.	3,16746594	73,98	73,98
2.	0,65497083	15,29	89,27
3.	0,28719307	6,70	95,98
4.	0,17188022	4,01	100

Segundo os valores de distância de Mahalanobis obtidos (Tabela 3), a maior proximidade morfológica é observada entre as localidades de Candiota e Turuçu, apesar de não corresponderem à menor distância geográfica entre elas. Candiota é mais próxima geograficamente à Bagé (47 km). As localidades mais distantes morfológicamente são Alegrete e Viamão.

Tabela 3: Distâncias quadradas de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre as localidades estudadas obtidas através das Análises de Variáveis Canônicas.

	Alegrete	Bagé	Candiota	Turuçu	Viamão
Alegrete		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Bagé	3,1682		<.0001	<.0001	<.0001
Candiota	4,1032	3,4624		<.0001	<.0001
Turuçu	3,845	3,1774	2,0061		<.0001
Viamão	4,4944	3,4952	2,6504	2,4948	

A distribuição dos pontos no gráfico de dispersão gerado a partir da CVA (Figura 12) nos mostra uma separação de grupos por localidade mais acentuada em relação ao resultado mostrado na PCA. Segundo o eixo CV1, podemos observar uma maior separação das localidades, já apontada pelos valores de distância de Mahalanobis. As localidades de Candiota, Turuçu e Viamão apresentam maior similaridade morfológica, dada a sua sobreposição no gráfico. Logo se observa a separação da localidade de Bagé e de Alegrete, a localidade mais diferenciada morfológicamente. Já em relação ao eixo CV2, observa-se uma separação da localidade de Bagé das demais.

A partir das distâncias quadradas de Mahalanobis foi construído um dendrograma de proximidade morfológica entre os grupos estudados (Figura 13) no qual podemos perceber que as localidades de Turuçu, Candiota e Viamão foram agrupadas em um ramo separado de Alegrete e Bagé.

Figura 12: Representação gráfica da disposição relativa das localidades de *M. caerulea* obtida a partir das análises de variáveis canônicas dos 13 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas.

Figura 13: Dendrograma de proximidade morfológica entre as localidades de *M. caerulea*, construído pelo método de *Neighbor Joining*.

O teste de Mantel indicou que as distâncias morfológicas estão correlacionadas com as distâncias geográficas entre as localidades ($r = 0,61$, $p=0,05$), podendo haver uma distribuição gradual desse caráter no espaço geográfico.

Tabela 4: Distância em linha reta (em km) entre as localidades de coleta de *M. caerulea*.

	Alegrete	Bagé	Candiota	Turuçu
Bagé	236			
Candiota	282	47		
Turuçu	392	184	144	
Viamão	462	326	302	185

Figura 14: Representação gráfica da análise de variáveis canônicas comparando as localidades de *M. caerulea* com amostras de *L. limao*, *N. testaceicornis*, *P. droryana*, *P. pugnax*, *P. remota*, *P. saiqui* e *S. quadripunctata*.

Foi observado que a distância morfológica entre as localidades de *M. caerulea* são menores do que as distâncias encontradas entre outras espécies, com exceção das distâncias entre as espécies do gênero *Plebeia*, que ainda assim apresentam valores superiores aos das localidades objeto do estudo.

Apesar da separação populacional observada na análise canônica entre localidades de *M. caerulea* (Figura 12), na análise canônica envolvendo outras espécies (Figura 14) todas as localidades se sobrepõem, ficando agrupadas e distintas de outras espécies, incluindo seu gênero irmão, *Schwarziana*.

A partir das distâncias quadradas de Mahalanobis entre as localidades de *M. caerulea* e as outras espécies utilizadas como grupo externo, foi construído um dendrograma de proximidade morfológica (Figura 15). Assim como observado na CVA, todas as localidades de *M. caerulea* se encontram em um ramo bem definido e separado das outras espécies, que também foram agrupadas de acordo com a figura 12 e com filogenia mais recente de Meliponini (Rasmussen & Cameron, 2010).

Figura 15: Dendrograma de proximidade morfológica, construído pelo método de *Neighbor Joining*, comparando as localidades de *M. caerulea* com amostras de *L. limao*, *N. testaceicornis*, *P. droryana*, *P. pugnax*, *P. remota*, *P. saiqui* e *S. quadripunctata*.

Tabela 5: Distâncias quadradas de Mahalanobis obtidas através das Análises de Variáveis Canônicas comparando as localidades de *M. caerulea* com grupos externos.

	Alegrete	Bagé	Candiota	Turuçu	Viamão	<i>S. quadripunctata</i>	<i>P. saiqui</i>	<i>P. remota</i>	<i>P. pugnax</i>	<i>P. droryana</i>	<i>L. limao</i>
Bagé	3,18										
Candiota	4,01	3,48									
Turuçu	3,77	3,20	1,88								
Viamão	4,27	3,53	2,49	2,39							
<i>S. quadripunctata</i>	13,87	14,22	13,50	13,89	14,32						
<i>P. saiqui</i>	13,40	12,04	12,47	12,43	12,79	16,73					
<i>P. remota</i>	14,08	13,03	12,95	12,68	13,37	17,24	6,23				
<i>P. pugnax</i>	15,09	14,12	14,11	14,01	14,46	17,84	5,87	4,22			
<i>P. droryana</i>	14,13	13,12	13,73	13,56	14,10	17,48	4,77	5,36	4,77		
<i>L. limao</i>	16,01	15,52	15,07	14,92	15,29	19,33	11,53	10,97	11,42	11,18	
<i>N. testaceicornis</i>	17,34	16,77	15,81	16,22	16,14	17,39	12,33	5,36	10,51	12,17	12,72

Os valores das distâncias de Mahalanobis obtidas a partir da Análise de Função Discriminante pouco diferiram dos valores obtidos a partir da Análise de Variáveis Canônicas (Tabela 6). No entanto, as relações de distâncias entre as localidades permaneceram similares.

Tabela 6: Distâncias quadradas de Mahalanobis entre as localidades estudadas obtidas através das Análises de Função Discriminante.

	Alegrete	Bagé	Candiota	Turuçu	Viamão
Alegrete		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Bagé	3,0799		<.0001	<.0001	<.0001
Candiota	3,8761	4,0995		<.0001	<.0001
Turuçu	3,8652	4,0502	2,1611		<.0001
Viamão	4,6333	4,3256	3,2254	2,6868

Figura 16: Discriminação par a par dos grupos estudados pela Análise de Função Discriminante (coluna esquerda) e pela Validação Cruzada dos dados (coluna direita).

A análise de função discriminante classificou corretamente grande porcentagem dos indivíduos quanto a sua localidade de origem (Figura 16). Os menores valores de acerto na classificação foram encontrados no teste entre as localidades de Candiota e Turuçu, com 85,71% e 89,83% de acerto, respectivamente, valores estes que caíram para 78,57% e 84,75% no teste de validação cruzada.

4.1.2 Análise de Hidrocarbonetos Cuticulares

Os perfis de hidrocarbonetos cuticulares de forrageiras de *M. caerulea* foram identificados conforme sua localidade de origem, totalizando cinco grupos: Alegrete, Bagé, Candiota, Turuçu e Viamão. Foram utilizados cinco perfis por colônia na análise. As amostras correspondentes às colônias 3, 4, 6, 7, 8, 9 e 10 coletadas em Alegrete não foram incluídas na análise devido à baixa qualidade dos cromatogramas.

No total, foram identificados 62 tipos de hidrocarbonetos (Tabela 7), consistindo em uma mistura de alcanos, alcenos e alcadienos com tamanho de cadeia entre 21 e 33 átomos de carbono C21 ao C33.

Tabela 7: Média e desvio padrão das proporções relativas de hidrocarbonetos cuticulares de forrageiras de *M. caerulea*. TR: tempo de retenção; z: alceno; zz: alcadieno, Me: metil.

n-Alcanos																
TR	Composto	Candiota			Viamão			Turuçu			Bagé			Alegrete		
17.290	C21	0,124	±	0,081	0,248	±	0,135	0,426	±	0,249	0,379	±	0,213	0,234	±	0,136
22.816	C23	3,007	±	0,528	2,861	±	0,466	3,423	±	0,861	4,382	±	0,702	2,504	±	1,169
25.509	C24	0,126	±	0,107	0,240	±	0,137	0,232	±	0,058	0,276	±	0,130	0,029	±	0,055
28.167	C25	12,440	±	2,879	13,190	±	4,259	10,365	±	2,285	14,592	±	4,065	9,863	±	2,978
30.691	C26	0,619	±	0,184	0,995	±	0,275	0,847	±	0,180	0,917	±	0,327	0,535	±	0,189
33.220	C27	21,336	±	5,994	18,148	±	3,534	16,711	±	2,982	20,734	±	6,195	23,173	±	5,279
35.565	C28	0,402	±	0,221	0,489	±	0,091	0,471	±	0,108	0,427	±	0,184	0,409	±	0,157
37.913	C29	12,116	±	2,375	9,071	±	4,609	8,665	±	2,095	8,850	±	1,605	11,069	±	1,885
40.135	C30	0,247	±	0,199	0,107	±	0,037	0,176	±	0,120	0,117	±	0,087	0,128	±	0,077
42.320	C31	3,514	±	1,093	1,460	±	0,509	2,407	±	1,279	2,322	±	0,989	3,408	±	0,773
44.482	C32	0,039	±	0,047	0,003	±	0,004	0,052	±	0,070	0,292	±	0,225	0,576	±	0,604
46.989	C33	0,238	±	0,216	0,077	±	0,107	0,213	±	0,253	0,173	±	0,159	0,001	±	0,000

Metil-Alcanos																
TR	Composto	Candiota			Viamão			Turuçu			Bagé			Alegrete		
24.484	x-MeC23a	0,478	±	0,550	0,645	±	0,205	0,755	±	0,534	0,229	±	0,178	0,072	±	0,116
24.761	x-MeC23b	0,033	±	0,049	0,001	±	0,000	0,121	±	0,053	0,040	±	0,025	0,001	±	0,000
30.002	3Me-25	0,031	±	0,042	0,001	±	0,000	0,099	±	0,031	0,017	±	0,022	0,016	±	0,055
32.249	4MeC26	0,028	±	0,033	0,009	±	0,017	0,016	±	0,028	0,069	±	0,062	0,012	±	0,028
33.959	11,13-MeC27	0,080	±	0,086	0,725	±	0,406	0,287	±	0,168	0,157	±	0,079	0,742	±	0,250
34.157	7-MeC27	0,038	±	0,049	0,009	±	0,017	0,253	±	0,117	0,055	±	0,030	0,001	±	0,000
34.382	5-MeC27	0,017	±	0,028	0,057	±	0,126	0,114	±	0,057	0,017	±	0,017	0,001	±	0,000
38.591	11,13,15MeC29	0,242	±	0,175	2,222	±	0,999	0,530	±	0,328	0,431	±	0,235	7,218	±	2,002
38.698	9MeC29	0,226	±	0,181	0,076	±	0,103	0,541	±	0,172	0,175	±	0,098	0,001	±	0,000

38.811	7MeC29	0,055 ± 0,054	0,003 ± 0,004	0,184 ± 0,086	0,019 ± 0,027	0,001 ± 0,001
39.028	5MeC29	0,108 ± 0,115	0,023 ± 0,033	0,237 ± 0,114	0,037 ± 0,039	0,002 ± 0,003
42.969	13MeC31	0,127 ± 0,173	1,153 ± 0,512	0,328 ± 0,164	0,326 ± 0,199	6,648 ± 2,439
43.386	5MeC31	0,016 ± 0,030	0,001 ± 0,000	0,060 ± 0,053	0,012 ± 0,024	1,512 ± 0,816
47.775	15,17-MeC33	0,006 ± 0,019	0,496 ± 0,263	0,030 ± 0,036	0,001 ± 0,000	0,003 ± 0,011

Alcenos						
TR	Composto	Candiota	Viamão	Turuçu	Bagé	Alegrete
32.346	zC27a	0,068 ± 0,050	0,282 ± 0,096	0,190 ± 0,131	0,167 ± 0,079	0,012 ± 0,029
32.470	zC27b	0,042 ± 0,053	0,064 ± 0,141	0,100 ± 0,083	0,110 ± 0,055	0,002 ± 0,004
32.550	zC27c	0,130 ± 0,124	1,115 ± 0,460	0,392 ± 0,208	0,229 ± 0,128	0,042 ± 0,058
32.752	zC27d	1,142 ± 0,437	1,396 ± 0,687	1,455 ± 0,391	1,120 ± 0,428	0,177 ± 0,189
34.765	zC28a	0,001 ± 0,000	0,040 ± 0,020	0,037 ± 0,028	0,053 ± 0,064	0,001 ± 0,000
34.933	zC28b	0,329 ± 0,186	0,207 ± 0,067	0,676 ± 0,165	0,247 ± 0,085	0,035 ± 0,042
35.040	zC28c	0,011 ± 0,036	0,029 ± 0,027	0,033 ± 0,073	0,011 ± 0,032	0,001 ± 0,000
35.101	zC28d	0,184 ± 0,274	0,001 ± 0,000	0,025 ± 0,046	0,020 ± 0,031	0,001 ± 0,000
37.029	zC29a	7,221 ± 2,487	12,180 ± 2,252	10,101 ± 2,490	8,522 ± 1,759	2,588 ± 1,272
37.536	zC29b	3,156 ± 0,841	3,243 ± 2,874	2,922 ± 0,885	2,390 ± 0,935	0,676 ± 0,484
39.405	zC30a	0,100 ± 0,105	0,081 ± 0,020	0,201 ± 0,087	0,124 ± 0,082	0,018 ± 0,041
39.551	zC30b	0,315 ± 0,237	0,157 ± 0,195	0,464 ± 0,181	0,132 ± 0,089	0,114 ± 0,090
41.610	zC31a	7,106 ± 2,151	4,046 ± 1,045	8,431 ± 1,610	7,586 ± 2,600	5,340 ± 1,936
41.854	zC31b	10,068 ± 1,285	9,349 ± 1,484	10,278 ± 1,419	9,764 ± 2,290	8,221 ± 2,214
42.025	zC31c	5,716 ± 1,228	2,176 ± 1,653	4,207 ± 1,752	3,315 ± 1,311	1,931 ± 0,728
43.777	zC32a	0,065 ± 0,079	0,040 ± 0,027	0,085 ± 0,060	0,072 ± 0,066	0,014 ± 0,050
43.891	zC32b	0,032 ± 0,042	0,027 ± 0,039	0,056 ± 0,038	0,096 ± 0,076	0,156 ± 0,132
44.001	zC32c	0,045 ± 0,053	0,201 ± 0,089	0,121 ± 0,059	0,014 ± 0,017	0,023 ± 0,052
46.127	zC33	4,896 ± 2,299	4,919 ± 1,930	6,176 ± 1,835	5,866 ± 2,277	8,896 ± 3,209
48.968	zC34	0,281 ± 0,332	0,047 ± 0,052	0,113 ± 0,132	0,091 ± 0,125	0,001 ± 0,000
52.305	zC35a	0,023 ± 0,057	0,141 ± 0,106	0,077 ± 0,089	0,131 ± 0,082	0,001 ± 0,000

52.440	zC35b	0,215 ± 0,255	0,181 ± 0,227	0,260 ± 0,212	0,369 ± 0,318	0,001 ± 0,000
52.635	zC35c	0,001 ± 0,000	0,003 ± 0,004	0,045 ± 0,072	0,065 ± 0,089	0,001 ± 0,000
52.887	zC35d	0,044 ± 0,061	0,263 ± 0,415	0,090 ± 0,104	0,112 ± 0,110	0,001 ± 0,000

Alcadienos						
TR	Composto	Candiota	Viamão	Turuçu	Bagé	Alegrete
26.303	zzC25	0,028 ± 0,062	0,158 ± 0,151	0,150 ± 0,119	0,056 ± 0,043	0,004 ± 0,012
31.552	zzC27	0,158 ± 0,147	0,180 ± 0,169	0,182 ± 0,119	0,009 ± 0,012	0,001 ± 0,000
36.477	zzC29a	0,123 ± 0,111	0,086 ± 0,114	0,073 ± 0,071	0,041 ± 0,053	0,001 ± 0,000
36.711	zzC29b	0,014 ± 0,033	0,851 ± 0,415	0,148 ± 0,147	0,137 ± 0,098	0,002 ± 0,005
36.900	zzC29c	0,035 ± 0,042	0,410 ± 0,345	0,073 ± 0,048	0,050 ± 0,035	0,001 ± 0,000
41.076	zzC31a	0,298 ± 0,174	0,507 ± 0,123	0,496 ± 0,214	0,425 ± 0,228	0,041 ± 0,078
41.170	zzC31b	0,202 ± 0,162	0,772 ± 0,295	0,542 ± 0,230	0,402 ± 0,240	0,006 ± 0,019
41.286	zz C31c	1,044 ± 0,430	2,720 ± 0,565	1,917 ± 0,412	1,529 ± 0,624	0,145 ± 0,243
41.455	zzC31d	0,566 ± 0,265	0,920 ± 0,259	1,073 ± 0,281	0,738 ± 0,282	0,098 ± 0,132
45.656	zzC33a	0,146 ± 0,160	0,299 ± 0,224	0,499 ± 0,230	0,346 ± 0,271	2,047 ± 1,841
45.818	zzC33b	0,497 ± 0,805	0,478 ± 0,424	0,736 ± 0,287	0,562 ± 0,333	1,155 ± 0,889
51.587	zzC35	0,001 ± 0,000	0,125 ± 0,049	0,032 ± 0,037	0,052 ± 0,055	0,087 ± 0,227

A análise de componentes principais (PCA) mostra o componente PC1 (47,4%) como principal eixo de variação na análise, seguido do PC2 (30,4%) (Figura 17). O gráfico de dispersão exibindo os dois componentes de maior variação apresenta uma separação entre a localidade de Alegrete e as demais localidades pela PC1 e a sobreposição de localidades segundo o eixo correspondente à PC2 (Figura 17).

Os cinco picos de compostos que mais contribuíram quantitativamente para a variação encontrada de acordo com a análise de PCA foram 5MeC31 (7,08%), C32 (4,85%), 13MeC31 (4,53%), zzC33a (3,83%) e 11,13,15MeC29 (3,13%) (Tabela 8).

Figura 17: Representação gráfica da Análise de Componente Principal das localidades de *M. caerulea*, obtida a partir dos compostos do perfil de hidrocarbonetos cuticulares. Legenda de cores: Alegrete (vermelho), Bagé (amarelo), Candiota (verde), Turuçu (azul) e Viamão (roxo).

Tabela 8: Contribuição em percentagem (%) de cada composto do perfil de *M. caerulea* para a variação encontrada conforme a Análise de Componentes Principais (PCA).

5MeC31	C32	13MeC31	zzC33a	11,13,15MeC29
7,0794361	4,8541565	4,5343474	3,8317161	3,1342077
ZC32b	zzC35	zzC31c	zzC31b	9MeC29
2,491242	2,4084687	2,3746876	2,1985906	2,1670191
zC35b	zzC33b	x-MeC23a	zzC31a	zzC31d
2,0860931	2,053173	1,9768474	1,9073929	1,8433919
11,13,MeC27	zC27b	zC30b	zC34	zzC29b
1,7703952	1,7622853	1,7518765	1,7501129	1,7081308
C24	4MeC26	zC27d	zC28d	C33
1,6052887	1,5916383	1,5768576	1,5617613	1,5601868
zC35d	15,17-meC33	zz-C27	ZC32c	ZZC25
1,5317828	1,5027092	1,4773198	1,4454144	1,4029742
zC35a	zC28b	5MeC29	7-MeC27	3Me-25
1,3971127	1,3971093	1,3435862	1,3348232	1,3056644
C30	zC27c	7MeC29	zC30a	zzC29a
1,2652981	1,2632622	1,2297631	1,2262647	1,2154133
zC27a	zC32a	zC35c	zC28c	x-MeC23b
1,2070686	1,2002563	1,1697708	1,1551263	1,1133817
5-MeC27	zzC29c	C31	zC33a	C27
1,1127712	1,0474892	0,9425297	0,9391169	0,9183644
C29	zC28a	C21	C25	zC31b
0,8537928	0,8427357	0,7120014	0,7095271	0,6063402
C28	C23	zC29b	zC31a	zC31c
0,5992713	0,5644154	0,56324	0,5523739	0,5458899
C26	zC29a			
0,4421859	0,2845526			

A análise de variáveis canônicas (CVA) apresentou quatro eixos de separação entre as localidades, sendo que os dois primeiros correspondem a mais de 90% da variabilidade das amostras .

O primeiro eixo canônico, responsável por 57% da variação encontrada, separa três agrupamentos: o primeiro corresponde às localidades de Alegrete, Bagé e Candiota, seguidos de um agrupamento de Turuçu e outro de Viamão. O segundo eixo canônico, responsável por 32% da variação, separa as localidades em dois grupos: um formado

por Bagé, Candiota e Turuçu, e outro por Alegrete e Viamão.

Viamão é a localidade mais afastada das demais por ambos os eixos canônicos. As localidades mais próximas, segundo seu perfil químico, são as de Candiota e Bagé, que também correspondem à menor distância geográfica entre as localidades amostradas (Figura 18).

Pelos valores das Distâncias de Mahalanobis, a maior proximidade encontrada entre duas localidades é a de Bagé e Turuçu, e a maior distância entre Turuçu e Alegrete (Tabela 9).

Figura 18: Representação gráfica da disposição relativa das localidades de *M. caerulea*, obtida a partir das análises de variáveis canônicas dos compostos do perfil de hidrocarbonetos cuticulares. Legenda das cores: Alegrete (vermelho), Bagé (amarelo), Candiota (verde), Turuçu (azul) e Viamão (roxo).

Tabela 9: Distâncias quadradas de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre as localidades estudadas obtidas através das Análises de Variáveis Canônicas.

	Alegrete	Bagé	Candiota	Turuçu	Viamão
Alegrete		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Bagé	1139,93		<.0001	<.0001	<.0001
Candiota	1380,46	292,23		<.0001	<.0001
Turuçu	1392,17	164,19	305,80		<.0001
Viamão	504,06	730,63	871,72	841,04

Figura 19: Dendrograma de proximidade química pelo método de *Neighbor Joining* entre as localidades de *M. caerulea*.

A partir dos valores das distâncias de Mahalanobis, foi calculado um dendrograma de proximidade química (Figura 19).

O teste de Mantel não apresentou evidências de correlação entre as distâncias químicas e distâncias geográficas entre as localidades ($r = 0,13$, $p > 0,05$).

Pela análise de coordenadas principais (PCoA) utilizando todos os compostos houve uma separação da localidade de Alegrete das demais localidades pela Coordenada Principal 1, que explica 39,25% da variação. Pela Coordenada Principal 2 não houve separação de grupos (Figura 20).

Figura 20: Análise das Coordenadas Principais discriminando localidades de *M. caerulea*. O centroide está marcado em vermelho para cada localidade analisada. As linhas pontilhadas conectam as amostras mais distantes do centroide. As localidades estão representadas pelos símbolos: (o) – Alegrete; (Δ) – Bagé; (+) - Candiota; (x) Turuçu e (◇) – Viamão. Teste PerMANOVA (Pseudo-F = 21.077, $p = 0.000999$).

Tabela 10: Valores de p para o teste de permutação par a par (10000 permutações) em *M. caerulea*. P-valor(abaixo da diagonal). P-valor permutado (acima da diagonal).

	Alegrete	Bagé	Candiota	Turuçu	Viamão
Alegrete		3,7163E-01	3,9960E-03	2,9970E-02	3,9760E-01
Bagé	3,8264E-01		3,3966E-02	6,6633E-01	9,8900E-01
Candiota	3,3373E-03	2,6261E-02		9,9900E-04	2,1000E-02
Turuçu	2,6472E-01	6,6598E-01	3,7479E-05		6,9330E-01
Viamão	4,1163E-01	9,9001E-01	1,0912E-02	6,9557E-01	

Quando utilizamos apenas os n-alcanos para realizar a análise, a distinção entre os grupos se mostra ainda menos aparente (Figura 21). Quando utilizamos apenas compostos insaturados na análise, ela apresenta o mesmo padrão exibido na análise total dos compostos (Figura 22).

Figura 21: Análise das Coordenadas Principais com base em n-alcenos discriminando localidades de *M. caerulea*. O centroide está marcado em vermelho para cada localidade analisada. As linhas pontilhadas conectam as amostras mais distantes do centroide. As localidades estão representadas pelos símbolos: (o) – Alegrete; (Δ) – Bagé; (+) - Candiota; (x) Turuçu e (◇) – Viamão.

Tabela 11: Valores de p para o teste de permutação par a par (10000 permutações) em *M. caerulea* utilizando apenas os perfis de n-alcenos. P-valor(abaixo da diagonal). P-valor permutado (acima da diagonal).

	Alegrete	Bagé	Candiota	Turuçu	Viamão
Alegrete		0.532468	0.394605	0.031968	0.4316
Bagé	0.500598		0.362637	0.448551	0.8112
Candiota	0.401320	0.337690		0.014985	0.3337
Turuçu	0.030406	0.434479	0.016163		0.7692
Viamão	0.409494	0.804547	0.335491	0.760118

Figura 22: Análise das Coordenadas Principais com base em compostos insaturados discriminando localidades de *M. caerulea*. O centroide está marcado em vermelho para cada localidade analisada. As linhas pontilhadas conectam as amostras mais distantes do centroide. As localidades estão representadas pelos símbolos: (o) – Alegrete; (Δ) – Bagé; (+) - Candiota; (x) Turuçu e ($\diamond$) – Viamão.

Tabela 12: Valores de p para o teste de permutação par a par (10000 permutações) em *M. caerulea* utilizando apenas os perfis de compostos insaturados. P-valor(abaixo da diagonal). P-valor permutado (acima da diagonal).

	Alegrete	Bagé	Candiota	Turuçu	Viamão
Alegrete		0.1218781	0.1388611	0.0129870	0.1908
Bagé	0.1430038		0.0619381	0.9310689	0.9880
Candiota	0.1475410	0.0620772		0.0109890	0.0599
Turuçu	0.0187811	0.9427366	0.0049839		0.9810
Viamão	0.1957262	0.9876769	0.0544321	0.9688207	

A análise de *cluster* com base nas distâncias euclidianas mostra um agrupamento das amostras de Alegrete, separado das amostras das demais localidades, e um outro grupo com as amostras de Viamão agrupadas e separadas das amostras das localidades de Turuçu, Bagé e Candiota, que estão misturadas em diversos ramos (Figura 23).

Esse resultado corrobora a separação entre grupos encontrada na análise de variáveis canônicas e a topologia do dendrograma calculado com base nas distâncias de Mahalanobis entre os grupos.

Figura 23: Dendrograma representativo das distâncias euclidianas baseadas nos perfis de hidrocarbonetos entre as amostras dentro de cada localidade de *M. caerulea*. Localidades: Alegrete (vermelho), Bagé (amarelo), Candiota (verde), Turuçu (azul) e Viamão (roxo). Valores em vermelho acima dos ramos correspondem aos valores de probabilidade para cada agrupamento. Valores em verde correspondem aos valores de *bootstrap*. Os valores em cinza correspondem às probabilidades de limites dos *clusters*.

4.1.3 Análises Moleculares

Depois de editadas as sequências dos representantes das 24 colônias amostradas (somadas a oito sequências adicionais de operárias coletadas forragendo em flores, na localidade de Bagé) obtivemos fragmentos de 546 pb, nos quais 25 sítios variáveis foram detectados. A composição nucleotídica foi de A= 32,1%, T = 45,3%, G= 10,2% e C= 12,4%.

Os dados referentes à diversidade nucleotídica(π), diversidade haplotípica (Hd), número de haplótipos encontrados (h), número de sítios polimórficos (S) e número médio de diferenças nucleotídicas (k) estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13: Diversidade genética das localidades de *M. caerulea* para os haplótipos do gene mitocondrial *COL*. (N) número de indivíduos; (S) número de sítios polimórficos; (h) número de haplótipos; (Hd) diversidade haplotípica; (π) diversidade nucleotídica; (k) número médio de diferenças.

	N	S	h	Hd	π	K
Alegrete	14	0	1	0	0	0
Bagé	9	0	1	0	0	0
Candiota	3	0	1	0	0	0
Turuçu	6	1	2	0,333	0,00061	0,333
Viamão	1	0	1	0	0	0
Total	24	25	6	0,735	0,01631	8,905

A diversidade haplotípica total (Hd) foi de 0,7348, a diversidade nucleotídica total (π) foi de 0,01631e o número médio de diferenças nucleotídicas (K) foi 8,905. Hd variou de 0 a 0,333, enquanto seu π variou de 0 a 0,00061.

Foi encontrado um total de seis haplótipos e 25 sítios polimórficos em todas as localidades (conforme Tabela 14). No entanto, apesar do grande número de passos mutacionais há apenas uma mudança de aminoácido, no H4, de uma Metionina para uma Leucina. Quando comparada com as demais espécies utilizadas como grupo

externo no estudo, foi observado um número maior de variações na sequência proteica.

Todos os haplótipos encontrados foram exclusivos. Um haplótipo corresponde à localidade de Candiota (haplótipo 1), dois haplótipos correspondem à localidade de Turuçu (haplótipos 2 e 3), um a Viamão (haplótipo 4), um à Alegrete (haplótipo 5) e um à Bagé (haplótipo 6). Turuçu foi a única localidade a apresentar mais de um haplótipo.

Segundo a rede de haplótipos gerada (Figura 24), os dois haplótipos de Turuçu se diferenciam por apenas um passo mutacional. Os haplótipos de Bagé, Turuçu e Candiota mostram-se mais próximos em relação ao número de passos mutacionais, ao contrário dos haplótipos encontrados em Viamão e Alegrete.

Figura 24: Rede de haplótipos para o gene *COI* de *M. caerulea*. O tamanho das esferas representa o número de indivíduos e os pontos entre as esferas representam os sítios polimórficos. Haplótipos de Alegrete (em vermelho), Viamão (roxo), Turucu (azul) e Candiota (verde).

Tabela 14: Haplótipos de *M.caerulea* e seus respectivos sítios variáveis. Números verticais correspondem à posição em pb dos sítios polimórficos dentro do fragmento do gene COI.

Haplótipos	3	27	45	63	117	120	132	138	141	153	183	234	255	267	288	291	333	339	354	376	415	438	453	493	537
H1	T	C	T	G	G	A	A	T	T	A	A	T	T	A	C	T	C	A	A	A	T	C	G	T	A
H2	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.
H3	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.
H4	.	T	.	A	A	.	.	.	.	.	.	A	C	C	T	.	.	.	.	T	.	T	.	.	G
H5	A	.	.	.	A	T	.	A	.	G	G	A	.	.	T	G	T	T	.	.	.	T	A	C	.
H6	.	.	G	.	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	.	C	.	.	.	.

Figura 25: Dendrograma de proximidade genética pelo método de *Neighbor Joining* entre as localidades de *M. caerulea* e espécies utilizadas como grupo externo. Números em cada ramo correspondem aos valores de *bootstrap*

O dendrograma de proximidade genética (Figura 25) entre as sequências calculado pelo método de *Neighbour Joining*, utilizando sequências de representantes de outras espécies como parâmetro de comparação (nesse caso, *Scaura latitarsis* e *Schwarziana quadripunctata*, de número de acesso NCBI GeneBank: KC853332 e KC853379, respectivamente, demais espécies sequenciadas neste trabalho) agrupou todas as sequências da mesma localidade em um mesmo ramo. A topologia mostra os agrupamentos correspondentes às amostras de Candiota, Turuçu e Bagé mais próximas, seguidos das amostras correspondentes à Alegrete e, mais externamente, a sequência correspondente à Viamão separadas das demais.

O percentual de divergência nucleotídica entre os pares de localidades comparadas variou entre 0,6% e 3,1% (Tabela 15). A menor percentagem corresponde à comparação entre as localidades de Candiota e Turuçu, e Turuçu e Bagé. Já os maiores valores correspondem à comparação entre as localidades de Alegrete e Viamão, e entre Alegrete e Bagé.

Tabela 15: Percentual (%) de divergência nucleotídica, baseada no modelo K2P calculada entre os pares de localidades e grupos externos. S qua: *Schwarziana quadripunctata*; S lat: *Scaura latitarsis*; P sai: *Plebeia saiqui*; P pug: *Plebeia pugnax*; P dro: *Plebeia droryana*.

	S qua	S lat	P sai	P pug	P dro	Candiota	Turuçu	Viamão	Alegrete
S lat	33,9								
P sai	33,8	5,5							
P pug	32,6	6,4	2,5						
P dro	33,0	6,0	1,5	1,7					
Candiota	32,8	8,3	7,7	9,3	8,6				
Turuçu	33,7	8,6	7,9	9,5	8,8	0,6			
Viamão	32,4	8,1	7,5	9,5	8,4	1,9	2,1		
Alegrete	32,8	7,5	6,1	7,7	7,0	2,7	2,9	3,1	
Bagé	34,0	9,0	8,3	10,0	9,3	1,1	0,6	2,3	3,1

O teste de Mantel indicou correlação significativa entre as distâncias genéticas e distâncias geográficas entre as localidades ($r = 0,51$, $p < 0,05$).

Os valores de F_{st} calculados entre os pares de localidades mostram grande diferenciação entre elas, devido ao não compartilhamento de haplótipos. No entanto, esses valores não foram significativos para as comparações envolvendo Viamão, provavelmente pelo fato de somente uma colônia ter sido amostrada (Tabela 16).

Tabela 16: Valores de F_{st} calculados (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre os pares das localidades de *M. caerulea* estudadas.

	Candiota	Turuçu	Viamão	Alegrete	Bagé
Candiota		0,0145	0,9999	0,0015	0,0056
Turuçu	0,9257		0,9999	0,0000	0,0003
Viamão	1,0000	0,9702		0,0671	0,0985
Alegrete	1,0000	0,9939	1,0000		0,0000
Bagé	1,0000	0,9592	1,0000	1,0000	

O resultado da AMOVA considerando todas as localidades amostradas como um único agrupamento está na tabela 17. A quase totalidade da variação encontrada está relacionada à variação interpopulacional, uma vez que não há haplótipos compartilhados entre as localidades e a maioria delas possui apenas um haplótipo. Devido ao grande número de passos mutacionais encontrados entre os haplótipos de Viamão e Alegrete e os demais, foi realizada uma AMOVA subdividindo as amostras em três grupos, considerando Candiota, Turuçu e Bagé como um grupo, Alegrete como outro e Viamão como um terceiro. Apesar do alto valor de diferenciação entre os grupos (74,38 %), o valor de Φ_{ct} encontrado não foi estatisticamente significativo.

Tabela 17: Análise de Variância Molecular (AMOVA) baseada nas sequências nucleotídicas de *COI* em *M. caerulea*. P: valor de significância do teste. Φ : índice de fixação.

Estruturação	Fonte de Variação	Variância	% do total	p	Φ
único grupo	Interpopulacional	609,735 Va	99,51		
	Intrapopulacional	0,02976 Vb	0,49	0,00000	Φ_{st} 0,99514
três grupos	Intergrupos	5,64193 Va	74,38	0,09931	Φ_{ct} 0,74378
	Interpopulacional	1,91378 Vb	25,23	0,00000	Φ_{sc} 0,98469
	Intrapopulacional	0,02976 Vc	0,39	0,00000	Φ_{st} 0,99608

4.2 *Plebeia nigriceps*

4.2.1 Análises Morfométricas

As amostras das asas de forrageiras de *P. nigriceps* foram identificadas conforme sua localidade de origem, totalizando oito grupos: Alegrete, Anta Gorda, Ivorá, Poço das Antas, Santa Maria, Riozinho, Turuçu e Westfália. A partir da configuração consenso calculada a partir dos 13 marcos anatômicos plotados nos pontos de intersecção de nervuras nas asas, obteve-se os resíduos de Procrustes (Figura 26). A maioria dos marcos anatômico variou de forma isotrópica, excetuando-se os marcos 9, 10 e 11.

Os marcos anatômicos que apresentaram maior variação foram, em ordem decrescente, 4, 5, 12 e 3 (Tabela 18).

Figura 26: Configuração consenso dos 13 marcos anatômicos marcados nas junções das nervuras das asas de operárias de *P. nigriceps*. Pontos pretos representam os resíduos de Procrustes e pontos azuis representam a média dos resíduos de cada marco anatômico.

Tabela 18: Contribuição relativa de cada marco anatômico para a variação total dos dados encontrada entre as localidades de *P. nigriceps*.

Marco anatômico	Variação %
1	2,507
2	3,142
3	8,462
4	26,584
5	18,947
6	3,819
7	8,147
8	3,657
9	3,52
10	4,228
11	7,363
12	9,618
13	0,005

As Análises de Componente Principal, a partir dos resíduos de Procrustes das coordenadas Cartesianas alinhadas dos 13 marcos anatômicos, geraram 22 medidas de deformações relativas. A análise mostra os componentes PC1 (23,58%), PC2 (16,17%) e PC3 (12,08%) os três principais eixos de maior variação dentro das amostras (Figura 27).

Figura 27: Representação gráfica da porcentagem da variância das 22 medidas de deformações relativas dos Componentes Principais.

Figura 28: Representação gráfica da Análise de Componente Principal das localidades de *P. nigriceps*, obtida a partir das análises dos 13 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas.

No gráfico de dispersão exibindo os dois componentes de maior variação observa-se grande sobreposição entre os indivíduos dos grupos analisados, tanto no eixo correspondente à PC1 como à PC2 (Figura 28).

Na Análise de Variáveis Canônicas, foram encontrados sete eixos que maximizam a separação significativa dessas localidades, sendo os dois primeiros eixos canônicos responsáveis por aproximadamente 70% da variação das localidades (Tabela 19).

Tabela 19: Variação dos dois eixos das variáveis canônicas.

	Autovalores	% Variância	% Cumulativa
1.	2,3159642	39,948	39,948
2.	1,7235458	29,729	69,677
3.	0,65008438	11,213	80,891
4.	0,52117463	8,99	89,88
5.	0,29127021	5,024	94,904
6.	0,1771691	3,056	97,96
7.	0,11824471	2,04	100

Tabela 20: Distâncias quadradas de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre as localidades estudadas obtidas através das Análises de Variáveis Canônicas.

	Alegrete	Anta Gorda	Ivora	Poco Antas	Riozinho	Santa Maria	Turucu	Westfalia
Alegrete		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Anta Gorda	4,8714		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Ivora	5,0743	3,0423		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Poco Antas	5,3886	2,1762	3,0099		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Riozinho	5,0935	2,9313	3,0981	2,9259		<.0001	<.0001	<.0001
Santa Maria	5,2795	4,6416	3,5491	4,732	3,5613		<.0001	<.0001
Turucu	6,0649	3,2188	3,2637	3,8196	2,9648	3,5239		<.0001
Westfalia	4,6363	2,1759	2,5904	2,3785	2,3533	3,7906	2,8554

Figura 29: Representação gráfica da disposição relativa das localidades de *P. nigriceps*, obtida a partir das análises de variáveis canônicas dos 13 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas.

A distribuição dos pontos no gráfico de dispersão gerado a partir da CVA (Figura 29) mostra pelo eixo CV1 uma separação gradual entre as localidades coletadas na região de Mata Atlântica do RS, com uma maior diferenciação da localidade de Santa Maria das demais. Segundo o eixo CV2 podemos observar uma total separação da localidade de Alegrete de todas as outras, o que concorda com os valores de distância de Mahalanobis (Tabela 20).

A partir das distâncias quadradas de Mahalanobis foi construído um dendrograma de proximidade morfológica entre os grupos estudados (Figura 30).

Figura 30: Dendrograma de proximidade morfológica pelo método de *Neighbor Joining* entre as localidades de *P. nigriceps*.

O teste de Mantel indicou que as distâncias morfológicas estão correlacionadas com as distâncias geográficas entre as localidades ($r = 0,67$, $p=0,007$), de modo a haver uma distribuição gradual desse caráter no espaço geográfico.

Tabela 21: Distância reta (em km) entre as localidades de coleta de *P. nigriceps*.

	Alegrete	Anta Gorda	Ivorá	P. das Antas	Riozinho	Santa Maria	Turuçu
Anta Gorda	377						
Ivorá	214	169					
Poço das Antas	400	63	186				
Riozinho	515	168	303	119			
Santa Maria	192	195	28	214	324		
Turuçu	389	272	252	226	258	250	
Westfalia	391	56	177	10	129	200	225

Figura 31: Representação gráfica da análise de variáveis canônicas comparando localidades de *P. nigriceps* com espécies do mesmo gênero (*P. flavocincta*, *P. remota*, *P. pugnax*, *P. droryana* e *P. saiqui*).

Na análise canônica envolvendo outras espécies do gênero *Plebeia*, além de *P. nigriceps* (Figura 31), as localidades de *P. nigriceps* se separam das demais espécies de *Plebeia* pelo primeiro eixo canônico, responsável por 50% da variação, enquanto é observado um gradiente de variação entre as localidades pelo segundo eixo canônico, responsável por 15% da variação total.

Ao comparar *P. nigriceps* com outras espécies pertencentes ao gênero *Plebeia*, foi observado que a distância de Mahalanobis de suas localidades entre si são menores do que as distâncias ao comparar estas localidades com as demais espécies de *Plebeia* (Tabela 22). No entanto, os valores de distância entre as espécies do grupo externo são similares aos valores encontrados entre as localidades de *P. nigriceps*.

A partir das distâncias quadradas de Mahalanobis entre as localidades de *P. nigriceps* e as outras espécies utilizadas como grupo externo, foi construído um dendrograma de proximidade morfológica (Figura 32). Assim como observado na CVA, todas as localidades de *P. nigriceps* se encontram em um ramo separado das outras espécies.

Figura 32: Dendrograma de proximidade morfológica pelo método de Neighbor Joining entre as localidades de *P. nigriceps* (Alegrete, Anta Gorda, Ivorá, Riozinho, Santa Maria, Turuçu e Westfalia) e as espécies utilizadas como grupo externo (*P. flavocincta*, *P. remota*, *P. pugnax*, *P. droryana* e *P. saiqui*).

Tabela 22: Distâncias quadradas de Mahalanobis obtidas através das Análises de Variáveis Canônicas comparando as localidades de *P. nigriceps* com grupo externos. Ale = Alegrete, Ant= Anta Gorda, Ivo=Ivorá, Rio= Riozinho, Poc= Poço das Antas, Stm= Santa Maria, Tur= Turuçu, Wes = Westfalia, Pdro = *P. droryana*, Pfla= *P. flavocincta*, Ppug= *P. pugnax*, Prem= *P. remota*, Psai= *P. saiqui*.

	Alegrete	Anta Gorda	Ivorá	P. das Antas	Riozinho	Santa Maria	Turuçu	Westfalia	<i>P. dro</i>	<i>P. fla</i>	<i>P. pug</i>	<i>P.rem</i>
Anta Gorda	4,77											
Ivorá	5,05	2,88										
Poço das Antas	5,31	2,20	2,87									
Riozinho	5,01	2,89	3,08	2,89								
Santa Maria	5,11	4,36	3,48	4,47	3,49							
Turuçu	5,96	3,16	3,21	3,79	2,99	3,40						
Westfalia	4,58	2,10	2,57	2,33	2,36	3,65	2,85					
<i>P.droryana</i>	7,96	7,73	8,05	8,43	7,54	6,78	7,10	7,67				
<i>P. flavocincta</i>	5,80	5,25	6,27	6,40	6,01	5,74	5,49	5,61	4,25			
<i>P. pugnax</i>	7,59	7,77	8,41	8,05	7,53	7,17	7,82	7,75	4,14	4,77		
<i>P.remota</i>	6,83	6,41	6,87	6,96	6,54	6,09	6,31	6,56	4,80	3,20	3,91	
<i>P.saiqui</i>	9,49	8,93	9,34	9,61	8,87	8,20	8,73	8,81	4,29	6,12	5,26	6,03

Tabela 23: Distâncias quadradas de Mahalanobis entre as localidades estudadas obtidas através das Análises de Função Discriminante.

	Alegrete	Anta Gorda	Ivora	Poco Antas	Riozinho	Santa Maria	Turucu	Westfalia
Alegrete		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Anta Gorda	5,2792		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Ivora	6,3725	3,6357		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Poco Antas	7,8925	2,438	3,8819		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Riozinho	6,8123	2,9318	3,5726	3,5932		<.0001	<.0001	<.0001
Santa Maria	6,1015	4,7757	3,9153	5,0449	4,1904		<.0001	<.0001
Turucu	6,7936	3,3792	3,3238	4,2299	3,1523	3,7319		<.0001
Westfalia	6,6946	2,7165	2,9362	3,2375	2,6936	4,0873	2,8854	

Os valores das distâncias de Mahalanobis obtidas a partir da Análise de Função Discriminante pouco diferiram dos valores obtidos a partir da Análise de Variáveis Canônicas (Tabela 23). No entanto, as relações de distâncias entre as localidades das localidades permaneceram similares. A menor distância encontrada é entre a localidade de Poço das Antas e Anta Gorda. A maior distância corresponde às localidades de Poço das Antas e Alegrete.

Figura 33: Discriminação par a par dos grupos estudados pela Análise de Função Discriminante (coluna esquerda) e pela Validação Cruzada dos dados (coluna direita).

A análise de função discriminante classificou corretamente grande porcentagem dos grupos quanto a sua localidade (Figura 33). Em média, a análise apresentou 96,3% de acerto nas classificações de indivíduos em suas respectivas localidades, e 93,2% de acerto no teste de validação cruzada. As maiores taxas de acerto na validação cruzada foram entre Alegrete e Poço das Antas, e Alegrete e Turucu (ambos 100% de acerto para o par de localidades). As menores taxas de acerto foram entre Anta Gorda e Poço das Antas, com 83,7% e 76,1% de acerto, respectivamente.

4.2.2 Análise de Hidrocarbonetos Cuticulares

Os perfis de hidrocarbonetos cuticulares de operárias de *P. nigriceps* foram agrupados conforme sua localidade: Alegrete, Anta Gorda, Ivorá, Poço das Antas, Riozinho, Santa Maria, Turuçu e Westfalia. Devido à dificuldade de obtenção do número mínimo de cinco perfis por colônia para as análises, foi utilizada a abordagem de realizar as análises comparando localidades, ao invés de considerar colônias como uma unidade.

No total, foram identificados 59 picos de hidrocarbonetos (Tabela 24), consistindo em uma mistura de n-alcanos, alcanos ramificados, alcenos e alcadienos com tamanho de cadeia entre 21 e 33 átomos de carbono.

Tabela 24: Média e desvio padrão das proporções relativas de hidrocarbonetos cuticulares de operárias de *P. nigriceps*. TR: tempo de retenção; z: alceno; zz: alcadieno, Me: metil

n-Alcanos										
TR	Composto	Santa Maria	Riozinho	Alegrete	Turuçu	Ivorá	Poço das Antas	Westfalia	Anta Gorda	
17.107	C ₂₁	0,055 ± 0,046	0,095 ± 0,039	0,016 ± 0,022	0,031 ± 0,014	0,040 ± 0,041	0,216 ± 0,157	0,009 ± 0,012	0,034 ± 0,027	
19.862	C ₂₂	0,013 ± 0,012	0,084 ± 0,020	0,130 ± 0,051	0,026 ± 0,055	0,001 ± 0,000	0,120 ± 0,080	0,001 ± 0,000	0,004 ± 0,007	
22.593	C ₂₃	0,426 ± 0,417	0,338 ± 0,213	0,319 ± 0,173	0,163 ± 0,089	0,354 ± 0,420	2,582 ± 2,162	0,190 ± 0,251	0,251 ± 0,188	
25.275	C ₂₄	0,151 ± 0,137	0,245 ± 0,045	0,279 ± 0,095	0,070 ± 0,031	0,181 ± 0,082	0,349 ± 0,207	0,023 ± 0,017	0,056 ± 0,042	
27.917	C ₂₅	13,895 ± 9,308	6,041 ± 1,670	35,875 ± 7,234	6,685 ± 1,695	27,934 ± 12,915	12,516 ± 6,186	8,371 ± 3,251	10,976 ± 2,437	
30.445	C ₂₆	0,074 ± 0,041	0,919 ± 0,198	0,426 ± 0,099	0,077 ± 0,024	0,133 ± 0,093	0,507 ± 0,288	0,026 ± 0,030	0,069 ± 0,062	
32.923	C ₂₇	1,660 ± 0,689	18,247 ± 2,537	9,300 ± 3,227	2,058 ± 0,424	4,595 ± 2,747	6,585 ± 5,365	2,032 ± 0,787	1,987 ± 0,929	
35.314	C ₂₈	0,127 ± 0,066	0,672 ± 0,629	0,476 ± 0,260	0,471 ± 0,276	0,073 ± 0,061	0,467 ± 0,167	0,127 ± 0,076	0,137 ± 0,107	
37.640	C ₂₉	5,567 ± 0,782	8,734 ± 7,518	15,508 ± 8,694	20,563 ± 6,799	7,511 ± 3,314	24,397 ± 12,288	0,182 ± 0,259	12,243 ± 6,833	
39.883	C ₃₀	0,251 ± 0,457	0,042 ± 0,070	0,065 ± 0,070	0,198 ± 0,114	0,001 ± 0,000	0,293 ± 0,176	0,116 ± 0,084	0,163 ± 0,135	
42.055	C ₃₁	1,404 ± 0,497	0,399 ± 1,375	1,174 ± 0,786	2,066 ± 0,903	0,099 ± 0,195	7,054 ± 3,388	7,921 ± 2,149	6,210 ± 3,544	
46.642	C ₃₃	0,536 ± 1,158	0,079 ± 0,383	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,118 ± 0,223	0,288 ± 1,035	0,013 ± 0,046	
Metil-Alcanos										
TR	Composto	Santa Maria	Riozinho	Alegrete	Turuçu	Ivorá	Poço das Antas	Westfalia	Anta Gorda	
28.844	9-MeC ₂₅	0,070 ± 0,054	0,336 ± 0,248	0,642 ± 0,226	0,081 ± 0,088	0,090 ± 0,042	0,539 ± 0,460	0,042 ± 0,059	0,541 ± 0,470	
29.187	7-MeC ₂₅	0,055 ± 0,079	1,648 ± 1,271	1,324 ± 0,488	0,141 ± 0,126	0,045 ± 0,017	3,759 ± 1,257	0,060 ± 0,111	0,492 ± 0,308	
33.717	?-MeC _{27a}	0,019 ± 0,024	2,151 ± 1,732	0,012 ± 0,019	0,079 ± 0,099	0,016 ± 0,030	1,238 ± 0,772	0,001 ± 0,000	0,129 ± 0,255	
33.797	?-MeC _{27b}	0,021 ± 0,031	0,001 ± 0,000	0,225 ± 0,282	0,114 ± 0,156	0,023 ± 0,026	0,265 ± 0,378	0,001 ± 0,000	0,398 ± 0,255	
33.922	?-MeC _{27c}	0,006 ± 0,007	0,289 ± 0,228	0,062 ± 0,035	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,120 ± 0,102	0,141 ± 0,231	0,234 ± 0,406	
38.331	13-MeC ₂₉	0,120 ± 0,122	1,348 ± 1,412	0,393 ± 0,188	0,995 ± 1,422	0,030 ± 0,024	5,772 ± 4,101	17,145 ± 8,750	3,348 ± 3,083	

38.560	?-MeC ₂₉	0,023 ± 0,032	0,030 ± 0,038	0,001 ± 0,000	0,023 ± 0,041	0,116 ± 0,231	0,052 ± 0,063	0,935 ± 1,546	0,479 ± 0,599
42.703	13-MeC ₃₁	0,081 ± 0,132	0,303 ± 0,352	0,001 ± 0,000	0,182 ± 0,254	0,086 ± 0,170	2,059 ± 1,725	0,301 ± 0,461	1,503 ± 2,047
Alcenos									
TR	Composto	Santa Maria	Riozinho	Alegrete	Turuçu	Ivorá	Poço das Antas	Westfalia	Anta Gorda
19.187	Z-?-C _{22a}	0,047 ± 0,077	0,008 ± 0,018	0,187 ± 0,287	0,011 ± 0,029	0,001 ± 0,000	0,005 ± 0,010	0,063 ± 0,104	0,101 ± 0,245
19.447	Z-?-C _{22b}	0,444 ± 0,959	0,528 ± 0,297	0,493 ± 0,733	0,611 ± 1,170	0,006 ± 0,010	0,038 ± 0,060	0,458 ± 0,506	0,167 ± 0,226
21.849	Z-?-C ₂₃	0,022 ± 0,033	0,047 ± 0,016	0,027 ± 0,049	0,001 ± 0,000	0,026 ± 0,050	0,013 ± 0,020	0,001 ± 0,000	0,004 ± 0,009
24.548	Z-?-C _{24a}	0,352 ± 0,368	0,113 ± 0,056	1,590 ± 1,535	0,236 ± 0,238	0,027 ± 0,050	0,073 ± 0,056	0,024 ± 0,038	0,353 ± 0,524
25.005	Z-?-C _{24b}	0,027 ± 0,025	0,082 ± 0,075	0,427 ± 0,521	0,175 ± 0,264	0,008 ± 0,015	0,010 ± 0,016	0,001 ± 0,000	0,014 ± 0,028
27.209	Z-?-C _{25a}	0,131 ± 0,154	0,107 ± 0,087	0,271 ± 0,174	0,002 ± 0,003	0,096 ± 0,142	0,624 ± 1,383	0,001 ± 0,000	0,015 ± 0,028
27.700	Z-?-C _{25b}	0,196 ± 0,152	0,200 ± 0,207	0,419 ± 0,656	0,154 ± 0,234	0,551 ± 0,474	0,222 ± 0,372	0,362 ± 0,457	0,731 ± 1,028
29.699	Z-?-C _{26a}	1,105 ± 1,179	0,854 ± 0,340	4,088 ± 3,786	0,952 ± 0,750	0,038 ± 0,056	0,296 ± 0,533	0,001 ± 0,000	0,756 ± 1,015
30.267	Z-?-C _{26b}	0,011 ± 0,012	0,190 ± 0,106	0,040 ± 0,059	0,001 ± 0,000	0,028 ± 0,038	0,001 ± 0,000	0,073 ± 0,089	0,018 ± 0,020
32.220	Z-?-C _{27a}	0,176 ± 0,384	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,029 ± 0,042	0,129 ± 0,185	0,207 ± 0,452	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000
32.295	Z-?-C _{27b}	0,080 ± 0,085	25,772 ± 6,811	0,040 ± 0,062	0,016 ± 0,022	0,091 ± 0,143	1,864 ± 3,947	0,001 ± 0,000	0,048 ± 0,088
32.768	Z-?-C _{27c}	1,114 ± 0,605	7,846 ± 3,542	0,317 ± 0,251	0,395 ± 0,269	5,654 ± 3,009	0,046 ± 0,106	0,107 ± 0,104	0,202 ± 0,219
34.588	Z-?-C _{28a}	0,372 ± 0,455	0,112 ± 0,086	0,301 ± 0,341	0,227 ± 0,158	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,070 ± 0,095	0,187 ± 0,224
34.755	Z-?-C _{28b}	0,063 ± 0,055	1,272 ± 0,582	0,065 ± 0,075	0,135 ± 0,107	0,089 ± 0,044	0,126 ± 0,098	0,002 ± 0,000	0,055 ± 0,097
35.181	Z-?-C _{28c}	0,018 ± 0,018	0,205 ± 0,100	0,001 ± 0,000	0,010 ± 0,017	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,101 ± 0,389
37.093	Z-?-C _{29a}	2,305 ± 1,256	6,711 ± 2,430	3,550 ± 1,045	0,456 ± 1,285	11,338 ± 8,871	3,764 ± 5,690	2,075 ± 1,882	0,300 ± 0,628
37.181	Z-?-C _{29b}	0,699 ± 0,353	0,103 ± 0,098	0,746 ± 0,517	6,540 ± 2,158	0,527 ± 0,781	0,001 ± 0,000	1,435 ± 0,951	1,331 ± 1,806
37.280	Z-?-C _{29c}	0,187 ± 0,205	0,085 ± 0,102	0,034 ± 0,054	1,641 ± 0,767	0,001 ± 0,000	0,487 ± 0,397	0,001 ± 0,000	1,100 ± 0,759
37.529	Z-?-C _{29d}	2,472 ± 0,949	5,554 ± 2,808	0,526 ± 0,236	1,069 ± 0,941	5,082 ± 0,935	0,156 ± 0,265	0,900 ± 0,410	0,360 ± 0,294
39.197	Z-?-C ₃₀	0,620 ± 0,476	0,211 ± 0,314	0,289 ± 0,157	1,232 ± 0,326	0,178 ± 0,136	0,391 ± 0,210	0,176 ± 0,095	0,469 ± 0,375
41.620	Z-?-C _{31a}	18,678 ± 11,771	0,381 ± 0,180	9,967 ± 2,719	30,637 ± 2,329	3,242 ± 3,897	12,476 ± 10,730	27,807 ± 3,316	22,284 ± 5,162

46.123	Z-?-C ₃₃	2,008 ± 1,704	0,135 ± 0,378	0,001 ± 0,000	1,427 ± 0,216	0,046 ± 0,090	2,619 ± 3,240	4,761 ± 0,991	5,189 ± 2,308
Alcadienos									
TR	Composto	Santa Maria	Riozinho	Alegrete	Turuçu	Ivorá	Poço das Antas	Westfalia	Anta Gorda
16.002	ZZ-?-C ₂₂	0,082 ± 0,173	0,271 ± 0,279	1,113 ± 1,241	0,868 ± 0,813	0,001 ± 0,000	0,127 ± 0,164	0,812 ± 0,889	0,462 ± 0,501
24.313	ZZ-?-C ₂₄	1,105 ± 0,975	2,456 ± 1,197	1,229 ± 1,081	1,491 ± 1,037	0,024 ± 0,026	0,570 ± 0,675	1,346 ± 1,105	1,577 ± 1,552
26.069	ZZ-?-C ₂₅	0,089 ± 0,068	0,296 ± 0,504	0,111 ± 0,067	0,283 ± 0,166	0,176 ± 0,087	0,034 ± 0,048	0,001 ± 0,000	0,164 ± 0,230
29.374	ZZ-?-C _{26a}	0,083 ± 0,136	0,100 ± 0,098	0,001 ± 0,000	0,007 ± 0,012	0,008 ± 0,015	0,001 ± 0,000	0,066 ± 0,113	0,030 ± 0,068
29.545	ZZ-?-C _{26b}	0,376 ± 0,584	0,110 ± 0,109	2,013 ± 2,338	0,044 ± 0,073	0,106 ± 0,099	0,001 ± 0,000	0,036 ± 0,074	0,430 ± 0,676
31.304	ZZ-?-C ₂₇	0,150 ± 0,164	0,108 ± 0,084	0,034 ± 0,036	0,007 ± 0,012	0,108 ± 0,072	0,133 ± 0,099	0,001 ± 0,000	0,036 ± 0,045
34.455	ZZ-?-C ₂₈	1,780 ± 1,989	0,616 ± 0,404	2,615 ± 2,753	1,059 ± 0,674	0,001 ± 0,000	0,045 ± 0,046	0,068 ± 0,094	0,926 ± 1,021
36.220	ZZ-?-C _{29a}	0,066 ± 0,058	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000	1,041 ± 0,736	0,010 ± 0,016	0,028 ± 0,049	0,068 ± 0,111
36.789	ZZ-?-C _{29b}	0,058 ± 0,061	0,063 ± 0,056	0,001 ± 0,000	0,011 ± 0,018	0,466 ± 0,341	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,407 ± 0,886
36.901	ZZ-?-C _{29c}	0,249 ± 0,147	1,525 ± 0,891	0,001 ± 0,000	0,108 ± 0,069	0,767 ± 0,356	0,616 ± 0,549	0,001 ± 0,000	0,076 ± 0,162
38.861	ZZ-?-C ₃₀	1,866 ± 2,161	0,651 ± 0,544	0,288 ± 0,376	0,829 ± 0,765	0,068 ± 0,057	0,275 ± 0,252	0,010 ± 0,022	0,426 ± 0,333
40.920	ZZ-?-C _{31a}	0,363 ± 0,896	0,027 ± 0,045	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000	7,582 ± 4,928	0,044 ± 0,106	0,001 ± 0,000	0,079 ± 0,108
41.032	ZZ-?-C _{31b}	19,081 ± 13,717	0,075 ± 0,065	2,959 ± 1,006	10,526 ± 3,104	20,925 ± 10,710	1,037 ± 1,112	3,929 ± 1,672	3,451 ± 1,619
43.079	ZZ-?-C _{32a}	0,762 ± 0,849	0,346 ± 1,187	0,001 ± 0,000	0,969 ± 0,688	0,001 ± 0,000	0,042 ± 0,051	0,027 ± 0,051	0,184 ± 0,198
43.390	ZZ-?-C _{32b}	0,453 ± 0,780	0,738 ± 2,838	0,001 ± 0,000	0,152 ± 0,113	0,001 ± 0,000	0,518 ± 0,780	0,015 ± 0,041	0,267 ± 0,580
45.526	ZZ-?-C _{33a}	14,103 ± 4,852	0,063 ± 0,191	0,001 ± 0,000	2,413 ± 0,630	0,204 ± 0,406	2,053 ± 2,918	9,258 ± 4,372	10,037 ± 4,772
45.700	ZZ-?-C _{33b}	3,652 ± 2,608	0,040 ± 0,050	0,023 ± 0,070	1,246 ± 0,313	0,031 ± 0,060	2,063 ± 3,199	8,165 ± 3,108	8,330 ± 3,722

A análise de componentes principais (PCA) mostra o componente PC1 (32,6%) como principal eixo de variação na análise, seguido do PC2 (8,8%) (Figura 34). O gráfico de dispersão exibindo os dois componentes de maior variação apresenta uma separação das localidades de Alegrete e Riozinho das demais pela PC1 e a sobreposição de localidades segundo o eixo correspondente à PC2. Anta Gorda, Santa Maria, Turuçu e Westfalia apresentam grande sobreposição em ambos os eixos (Figura 34).

Figura 34: Representação gráfica da Análise de Componente Principal das localidades de *P. nigriceps*, obtida a partir dos compostos do perfil de hidrocarbonetos cuticulares. Legenda de cores: Anta Gorda: laranja; Turuçu: roxo; Santa Maria: azul; Ivorá: verde claro; Riozinho: azul claro; Westfalia: rosa; Poço das Antas: verde; Alegrete: vermelho.

Os cinco picos de compostos que mais contribuíram quantitativamente para a variação encontrada de acordo com a análise de PCA foram ZZ-?-C33a (5,44%), Z-?-C33 (4,50%), Z-?-C27b (4,30%), ZZ-?-C33b (4,27%) e C31 (3,29%) (Tabela 25), sendo a maioria deles compostos insaturados. A maioria dos n-alcenos encontrados no perfil de *P. nigriceps* colaboraram com valores inferiores à 1% na variação encontrada

Tabela 25: Contribuição em percentagem (%) de cada composto do perfil de *P. nigriceps* para a variação encontrada conforme a Análise de Componentes Principais (PCA).

ZZ-?-C33a	Z-?-C33	Z-?-C27b	ZZ-?-C33b	C31
5,4412467	4,49624793	4,30394671	4,26833628	3,28847205
Z-?-C29a	Z-?-C29b	?-MeC27a	Z-?-C29c	ZZ-?-C29c
3,16477161	2,68768434	2,39684142	2,38520038	2,33885196
?-MeC29	13-MeC31	7-MeC25	Z-?-C27c	?-MeC27b
2,24111028	2,19091389	2,18087697	2,05009	2,04020198
ZZ-?-C31b	ZZ-?-C22	ZZ-?-C32b	Z-?-C29d	ZZ-?-C31a
1,98010616	1,93166598	1,89054256	1,88627155	1,87835121
ZZ-?-C26b	ZZ-?-C32a	Z-?-C26a	C29	Z-?-C22b
1,86053008	1,84197112	1,67198743	1,62980924	1,58842558
Z-?-C25a	ZZ-?-C29a	ZZ-?-C29b	Z-?-C24b	Z-?-C28b
1,5809155	1,51871687	1,5115578	1,47968904	1,45586278
ZZ-?-C25	13-MeC29	Z-?-C28a	Z-?-C26b	Z-?-C22a
1,44518167	1,44124246	1,40426957	1,40388264	1,39433092
?-MeC27c	Z-?-C31	C30	Z-?-C28c	ZZ-?-C26a
1,3890699	1,37961122	1,37920162	1,33113596	1,31319499
ZZ-?-C28	C22	Z-?-C25b	ZZ-?-C27	C33
1,24471459	1,17669702	1,13736472	1,10325021	1,07318842
Z-?-C24a	Z-?-C27a	ZZ-?-C30	ZZ-?-C24	Z-?-C23
0,99280704	0,9773225	0,86924156	0,84398234	0,81386738
C26	Z-?-C30	9-MeC25	C24	C21
0,76536159	0,68476592	0,65072545	0,58859743	0,58487878
C28	C27	C25	C23	
0,38939162	0,38429835	0,3414604	0,31776837	

A análise de variáveis canônicas (CVA) apresentou sete eixos de separação entre as localidades, sendo que os dois primeiros (CV1, responsável por 54% da variância encontrada e CV2, por 22 %) correspondem a mais de 70% da variabilidade das

amostras.

O gráfico de dispersão da análise de variáveis canônicas (CVA) não apresenta nenhuma sobreposição entre os perfis das localidades. O primeiro eixo canônico diferencia todas as localidades, com a exceção de uma sobreposição das amostras de Poço das Antas, Ivorá e Turuçu. O segundo eixo canônico destaca nos extremos as localidades de Alegrete e Riozinho. Westfalia é a localidade mais afastada das demais por ambos os eixos canônicos (Figura 35).

Pelos valores das Distâncias de Mahalanobis, a maior proximidade encontrada entre duas localidades é a de Anta Gorda e Santa Maria, e a maior distância entre Westfalia e Alegrete (Tabela 26). A partir das distâncias de Mahalanobis foi gerado um dendrograma de proximidade química (Figura 36).

Figura 35: Representação gráfica da disposição relativa das localidades de *P. nigriceps*, obtida a partir das análises de variáveis canônicas dos compostos do perfil de hidrocarbonetos cuticulares. Legenda de cores: Anta Gorda: laranja; Turuçu: roxo; Santa Maria: azul; Ivorá: verde claro; Riozinho: azul claro; Westfalia: rosa; Poço das Antas: verde; Alegrete: vermelho.

Tabela 26: Distâncias quadradas de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre as localidades estudadas.

	Santa Maria	Riozinho	Alegrete	Turuçu	Ivorá	P. das Antas	Westfalia	Anta Gorda
Santa Maria		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Riozinho	1110,359		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Alegrete	1213,741	812,04		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Turuçu	572,449	793,857	556,42		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Ivorá	506,157	709,894	1165,96	756,44		<.0001	<.0001	<.0001
P. das Antas	342,446	602,325	689,622	390,807	582,519		<.0001	<.0001
Westfalia	579,178	1894,04	2094,51	1328,17	1389,26	1060,436		<.0001
Anta Gorda	251,751	868,718	851,102	383,416	608,661	286,048	669,198

Figura 36: Dendrograma de proximidade química pelo método de *Neighbor Joining* entre as localidades de *P. nigriceps*.

Pela análise de coordenadas principais (PCoA) utilizando todos os compostos houve uma separação da localidade de Riozinho das demais localidades, seguido de uma sobreposição das amostras correspondentes à Ivorá e Alegrete, e outra sobreposição de Anta Gorda, Santa Maria, Turuçu e Westfalia, pela Coordenada Principal 1, que explica 32,61% da variação. Pela Coordenada Principal 2 as diferenças entre as localidades foram mais sutis, destacando apenas o maior distanciamento entre o agrupamento de Alegrete e Ivorá e as amostras correspondentes à Poço das Antas (Figura 37).

Figura 37: Análise das Coordenadas Principais discriminando localidades de *P. nigriceps*. O centroide está marcado em vermelho para cada localidade analisada. As linhas pontilhadas conectam as amostras mais distantes do centroide. As localidades estão representadas pelos símbolos: (o) – Alegrete; (Δ) – Anta Gorda; (+) – Ivorá; (x) – Poço das Antas; (◇) – Riozinho; (⊠) – Santa Maria; (∇) – Turuçu e (*) – Westfalia. Teste PerMANOVA (Pseudo-F = 17.92, p = 0.000999).

Tabela 27: Valores de p para o teste de permutação par a par (10000 permutações) em *P. nigriceps*. P-valor (abaixo da diagonal). P-valor permutado (acima da diagonal).

	Alegrete	Anta Gorda	Ivorá	P. das Antas	Riozinho	Santa Maria	Turuçu	Westfalia
Alegrete		0.72003	0.43836	0.61054	0.71923	0.93631	0.10719	0.3553
Anta Gorda	0.71561		0.58204	0.43506	0.96850	0.84132	0.13219	0.6079
Ivorá	0.44422	0.58328		0.41186	0.63144	0.61704	0.65373	0.7677
P. das Antas	0.61220	0.42154	0.40899		0.44786	0.67113	0.12479	0.2252
Riozinho	0.71400	0.96773	0.62943	0.44253		0.83532	0.16588	0.6644
Santa Maria	0.93694	0.84165	0.63090	0.67464	0.83039		0.24108	0.5649
Turuçu	0.10526	0.13535	0.65054	0.12589	0.17116	0.25169		0.2281
Westfalia	0.35180	0.59951	0.76856	0.21928	0.65610	0.56883	0.23725	

Quando utilizamos apenas os n-alcanos para realizar a análise, a distinção entre os grupos se mostra menos aparente. Apenas a localidade de Westfalia se destaca das demais por ambas coordenadas principais. A primeira coordenada principal exibe um gradiente de variação entre as localidades enquanto a segunda coordenada apresenta uma sobreposição quase total delas (Figura 38).

Quando utilizamos apenas compostos insaturados na análise, encontramos um padrão similar de separação das localidades resultante da análise utilizando todos os compostos. No entanto, a separação entre os grupos fica mais evidente (Figura 39).

Figura 38: Análise das Coordenadas Principais com base em n-alcanos discriminando localidades de *P. nigriceps*. O centroide está marcado em vermelho para cada localidade analisada. As linhas pontilhadas conectam as amostras mais distantes do centroide. As localidades estão representadas pelos símbolos: (o) – Alegrete; (Δ) – Anta Gorda; (+) - Ivorá; (x)-Poço das Antas; (◇) – Riozinho; (⊠) – Santa Maria; (∇)- Turuçu e (*)- Westfalia. Teste PerMANOVA (Pseudo-F = 22.638, p = 0.000999).

Tabela 28: Valores de p para o teste de permutação par a par (10000 permutações) em *P. nigriceps* utilizando apenas os perfis de n-alcenos. P-valor (abaixo da diagonal). P-valor permutado (acima da diagonal).

	Alegrete	Anta Gorda	Ivorá	P. das Antas	Riozinho	Santa Maria	Turuçu	Westfalia
Alegrete		0.837716	0.952105	0.919508	0.254975	0.630237	0.385861	0.0773
Anta Gorda	0.841422		0.949105	0.805319	0.109389	0.467253	0.448855	0.0305
Ivorá	0.950653	0.947687		0.902310	0.418558	0.720728	0.611339	0.2176
P. das Antas	0.921331	0.794470	0.905752		0.411859	0.739326	0.405459	0.1546
Riozinho	0.253652	0.108068	0.413999	0.402880		0.792621	0.044896	0.2986
Santa Maria	0.626719	0.467599	0.725888	0.738381	0.787244		0.306369	0.4050
Turuçu	0.382142	0.445722	0.605009	0.404932	0.045331	0.299882		0.0188
Westfalia	0.073261	0.028493	0.212460	0.151029	0.297203	0.396303	0.018619

Figura 39: Análise das Coordenadas Principais com base em compostos insaturados discriminando localidades de *P. nigriceps*. O centroide está marcado em vermelho para cada localidade analisada. As linhas pontilhadas conectam as amostras mais distantes do centroide. As localidades estão representadas pelos símbolos: (o) – Alegrete; (Δ) – Anta Gorda; (+) – Ivorá; (x) – Poço das Antas; (◇) – Riozinho; (⊠) – Santa Maria; (∇) – Turuçu e (*) – Westfalia. Teste PerMANOVA (Pseudo-F = 17.799, $p = 0.000999$).

Tabela 29: Valores de p para o teste de permutação par a par (10000 permutações) em *P. nigriceps* utilizando apenas os perfis de compostos insaturados. P-valor (abaixo da diagonal). P-valor permutado (acima da diagonal).

	Alegrete	Anta Gorda	Ivorá	P. das Antas	Riozinho	Santa Maria	Turuçu	Westfalia
Alegrete		0.366763	0.261774	0.977902	0.181782	0.552845	0.056394	0.0119
Anta Gorda	0.369247		0.428657	0.449455	0.350865	0.946105	0.035196	0.0129
Ivorá	0.264769	0.426126		0.369163	0.917608	0.667933	0.476152	0.3587
P. das Antas	0.978004	0.455408	0.372246		0.277772	0.635836	0.122788	0.0383
Riozinho	0.179706	0.352870	0.918343	0.280041		0.618838	0.224878	0.2023
Santa Maria	0.561628	0.942029	0.676179	0.636971	0.617986		0.231277	0.1359
Turuçu	0.052643	0.036667	0.478326	0.124835	0.228506	0.232239		0.7539
Westfalia	0.010393	0.010838	0.356224	0.037031	0.205504	0.138101	0.753150	

A análise de cluster com base nas distâncias euclidianas mostra um agrupamento das amostras de Anta Gorda, mais próximas às amostras de Santa Maria e Turuçu, e associado a um ramo correspondente às amostras de Westfalia. As amostras de Turuçu não formam um agrupamento único. Esse padrão foi observado também na análise de coordenadas principais utilizando todos os compostos hidrocarbonetos. Os outros agrupamentos são entre as amostras de Poço das Antas e Alegrete; e Ivorá e Riozinho (Figura 40).

Figura 40: Dendrograma representativo das distâncias euclidianas baseadas nos perfis de hidrocarbonetos entre as amostras dentro de cada localidade de *P. nigriceps*. Localidades: Anta Gorda: laranja; Turuçu: roxo; Santa Maria: azul; Ivorá: verde claro; Riozinho: azul claro; Westfalia: rosa; Poço das Antas: verde; Alegrete: vermelho. Valores em vermelho acima dos ramos correspondem aos valores de probabilidade para cada agrupamento. Valores em verde correspondem aos valores de bootstrap. Os valores em cinza correspondem às probabilidades de limites dos clusters

4.2.3 Análise Moleculares

Depois de editadas as 50 sequências desta espécie, obtivemos fragmentos de 361 pb, nos quais 28 sítios variáveis foram detectados. A composição nucleotídica foi de A= 36,9%, T = 47%, G= 4,1% e C= 11,9%.

Os dados referentes à diversidade nucleotídica (π), diversidade haplotípica (Hd), número de haplótipos encontrados (h), número de sítios polimórficos (S) e número médio de diferenças nucleotídicas (k) estão descritos na Tabela 30.

Tabela 30: Diversidade genética das localidades de *P. nigriceps* para os haplótipos do gene mitocondrial *Citocromo B*. (N) número de indivíduos; (S) número de sítios polimórficos; (h) número de haplótipos; (Hd) diversidade haplotípica; (π) diversidade nucleotídica; (k) número médio de diferenças.

	N	S	h	Hd	π	K
Alegrete	2	0	1	0,000	0,000	0,000
Anta Gorda	13	11	6	0,795	0,0075	2,692
Ivorá	3	0	1	0,000	0,000	0,000
Poço das Antas	3	0	1	0,000	0,000	0,000
Riozinho	7	2	3	0,667	0,0029	1,048
Santa Maria	8	0	1	0,000	0,000	0,000
Turuçu	9	2	3	0,639	0,0021	0,778
Westfalia	5	0	1	0,000	0,000	0,000
Total	50	28	17	0,934	0,0147	5,313

A diversidade haplotípica total (Hd) foi de 0,934 e a diversidade nucleotídica total (π) foi de 0,0147 e o número médio de diferenças nucleotídicas (K) foi 5,313. Hd variou de 0 a 0,795, enquanto seu π variou de 0 a 0,0075.

Foram encontrados 17 haplótipos e 28 sítios polimórficos em todas as localidades (conforme Tabela 31).

Foram encontradas seis mudanças de aminoácidos: de isoleucina para treonina em H5 (Westfalia), metionina para isoleucina em H13 (Ivorá) e H14(Alegrete), serina para asparagina em H13, treonina para metionina em H9 (Anta Gorda), H13 e H14, isoleucina para valina em H6 e H11 (ambos de Anta Gorda), isoleucina para valina em H13 e leucina para fenilalanina em H4 (Poço das Antas).

Todos os haplótipos encontrados foram exclusivos. Três haplótipos correspondem à Riozinho (H1, H2 e H3), um à Poço das Antas (H 4), um à Westfalia (H5), seis à Anta Gorda (H6, H7, H8, H9, H10 e H11), um à Santa Maria (H12), um à Ivorá (H13) um à Alegrete (H14) e três à Turuçu (H15, H16 e H17). Anta Gorda, Riozinho e Turuçu foram as únicas localidades a apresentar mais de um haplótipo.

Segundo a rede de haplótipos gerada (Figura 41), os dois haplótipos mais distantes dos demais são o H13 (Ivorá) e H14 (Alegrete). Os demais haplótipos mostram-se mais próximos em relação ao número de passos mutacionais.

Tabela 31: Haplótipos de *P. nigriceps* e seus respectivos sítios variáveis. Números verticais correspondem à posição em pb dos sítios polimórficos dentro do fragmento do gene *Citocromo B*.

Haplótipos	30	36	67	87	95	103	105	106	107	108	111	114	116	123	129	151	154	201	243	252	255	273	279	294	297	306	330	336
H1	A	T	T	T	T	A	A	T	C	T	A	T	C	A	T	A	A	A	T	A	T	A	C	T	T	A	A	T
H2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H3	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.
H5	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	.
H6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.
H7	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.
H8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	C	.	T	.	.	.	.	.
H10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	G	.	.	C	G	.	G	.	.	.	.	.	.
H11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	.	A
H13	.	.	.	.	.	.	T	A	A	.	T	.	T	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	C	.	T	.
H14	.	.	.	.	.	.	T	A	G	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	T	.
H15	.	.	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	.
H16	.	.	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	G	.	.
H17	.	C	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	.

Figura 41: Rede de haplótipos para o gene Citocromo B de *P. nigriceps*. O tamanho das esferas representa o número de indivíduos e os pontos entre as esferas representam os sítios polimórficos. Cores: Anta Gorda: laranja; Turuçu: roxo; Santa Maria: azul; Ivorá: verde claro; Riozinho: azul claro; Westfalia: rosa; Poço das Antas: verde; Alegrete: vermelho.

O dendrograma de proximidade genética (Figura 42) entre as sequências, calculado pelo método de *Neighbour Joining*, utilizando sequências de representantes de outras espécies como parâmetro de comparação (*Plebeia remota*, *Plebeia droryana*, *Plebeia saiqui* e *Plebeia pugnax*) agrupou quase todas as sequências da mesma localidade em um mesmo ramo. As exceções foram as sequências Anta Gorda 2 (correspondente ao H7), que agrupou em um ramo com amostras de Westfalia (H5); e Anta Gorda 9 (correspondente ao H9) que ficou externamente agrupada a um ramo que agrupou Anta Gorda, Riozinho, Westfalia, Turuçu e Santa Maria.

A topologia mostra as amostras de Anta Gorda (H6, H8, H10 e H11) e Riozinho (H1, H2 e H3) agrupados em um ramo, associado a outro ramo que agrupa Westfalia (H5) e Turuçu (H15, H16 e H17). A esse grupo associa-se um ramo correspondente às amostras de Santa Maria (H12). Mais externamente está associado um ramo correspondente às amostras de Poço das Antas (H4), seguidos de um agrupamento formado por Ivorá (H13) e Alegrete (H14).

O percentual de divergência nucleotídica entre os pares de haplótipos variou entre 0,28% e 4,11% (Tabela 32). A menor percentagem corresponde à comparação entre os haplótipos H1 e H2, e H1 e H3; todos da localidade de Riozinho; H1 (Riozinho) e H8 (Anta Gorda); H6 e H11 assim como H8 e H11, todos de Anta Gorda; e a comparação entre os haplótipos de Turuçu, H15 e 16, e H15 e H17.

A maior distância corresponde à comparação entre os haplótipos H10 (Anta Gorda) e H13 (Ivorá).

Figura 42: Dendrograma de proximidade genética pelo método de *Neighbor Joining* entre as localidades de *P. nigriceps* e espécies utilizadas como grupo externo.

Tabela 32: Percentual de divergência nucleotídica, baseada no modelo K2P calculada entre os pares de haplótipos .

	Pr	Ta	Pm	H 1	H 2	H 3	H 4	H 5	H 6	H 7	H 8	H 9	H 10	H 11	H 12	H 13	H 14	H 15	H 16
Pr																			
Ta	12,95																		
Pm	23,88	25,37																	
H 1	2,56	12,56	21,74																
H 2	2,94	12,56	21,74	0,28															
H 3	2,94	12,98	22,19	0,28	0,56														
H 4	2,57	12,58	21,70	0,56	0,84	0,84													
H 5	2,94	13,42	22,61	1,13	1,42	1,42	1,13												
H 6	3,32	12,98	23,11	0,85	1,13	1,13	1,42	2,01											
H 7	3,32	12,98	23,11	1,13	1,42	1,42	1,13	1,42	2,02										
H 8	2,56	12,98	22,19	0,28	0,56	0,56	0,84	1,42	0,56	1,42									
H 9	2,94	12,56	23,11	0,85	1,13	1,13	0,84	1,42	1,72	1,42	1,13								
H 10	4,10	13,84	24,05	1,42	1,72	1,72	2,01	2,61	0,56	2,62	1,13	2,32							
H 11	2,94	12,56	22,65	0,56	0,85	0,85	1,13	1,71	0,28	1,72	0,28	1,42	0,85						
H 12	2,19	11,72	21,22	0,84	1,13	1,13	0,84	1,41	1,70	1,41	1,13	1,13	2,30	1,41					
H 13	3,71	12,98	23,61	2,58	2,88	2,88	2,58	3,18	3,49	3,18	2,88	2,28	4,11	3,18	2,88				
H 14	3,33	12,15	23,14	1,99	2,28	2,28	1,99	2,58	2,88	2,58	2,28	1,70	3,49	2,58	2,29	0,85			
H 15	2,94	13,41	23,11	1,13	1,42	1,42	1,13	1,13	2,02	1,72	1,42	1,42	2,62	1,72	1,41	3,18	2,58		
H 16	3,32	13,84	23,58	1,42	1,72	1,72	1,42	1,42	2,32	2,02	1,72	1,13	2,93	2,02	1,70	3,49	2,88	0,28	
H 17	3,32	13,84	23,58	1,42	1,72	1,72	1,42	1,42	2,32	2,02	1,72	1,72	2,93	2,02	1,70	3,49	2,88	0,28	0,56

Com base na matriz de distâncias genéticas entre os haplótipos, foi gerado um dendrograma no qual as relações entre as localidades é mantida, com a exceção de que nesta topologia é o haplótipos H9 (de Anta Gorda) que está mais externo em relação aos H4 (Poço das Antas) (Figura 43).

Figura 43: Dendrograma de proximidade genética pelo método de *Neighbor Joining* calculada a partir da distância de K2P entre os haplótipos de *P. nigriceps* e espécie utilizada como grupo externo.

Os valores de *Fst* entre os pares de localidades variaram entre 0,3801 e 1,000 (Tabela 33). A menor diferenciação encontrada foi entre as localidades de Anta Gorda e Riozinho. Os maiores valores de diferenciação foram encontrados quando as localidades de Poço das Antas e Westfalia foram comparadas entre si e com Santa Maria, Ivorá e Alegrete; assim como quando essas três últimas foram comparadas entre si.

Com exceção dos pareamentos entre Ivorá e Poço das Antas; Alegrete e Poço das Antas; e Alegrete e Westfalia, todos os demais foram estatisticamente significativos ($\alpha < 0,05$).

Tabela 33: Valores de *Fst* calculados (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre os pares das localidades de *P. nigriceps* estudadas. Rio: Riozinho, Poc: Poço das Antas, Wes: Westfalia, Ant: Anta Gorda, Stm: Santa Maria, Ivo: Ivorá, Ale: Alegrete, Tur: Turucu.

	Rio	Poc	Wes	Ant	Stm	Ivo	Ale	Tur
Rio		0,0063	0,0011	0,0002	0,0001	0,0076	0,0286	0,0001
Poc	0,7387		0,0166	0,0019	0,0061	0,0966	0,0975	0,0046
Wes	0,8725	1,0000		0,0001	0,0011	0,0201	0,0505	0,0003
Ant	0,3801	0,5057	0,6892		0,0000	0,0013	0,0101	0,0000
Stm	0,8737	1,0000	1,0000	0,6829		0,0051	0,0216	0,0001
Ivo	0,9215	1,0000	1,0000	0,7996	1,0000		0,0985	0,0055
Ale	0,8880	1,0000	1,0000	0,7370	1,0000	1,0000		0,0196
Tur	0,8378	0,8705	0,8910	0,7173	0,9271	0,9473	0,9295	

O resultado da AMOVA considerando todas as localidades amostradas como um único agrupamento está na tabela 34. A maior parte da variação encontrada está relacionada à variação entre localidades, embora tenha uma colaboração de 17,65% de variação dentro das localidades.

Devido ao grande número de passos mutacionais encontrados entre os haplótipos

de Ivorá (H13) e Alegrete (H14) e os demais, foi realizada uma AMOVA subdividindo as amostras em dois grupos, considerando Ivorá e Alegrete como um grupo e o outro formado por Anta Gorda, Poço das Antas, Riozinho, Turuçu e Westfalia.

O valor de Φ_{ct} , que mede a diferenciação entre os grupos, foi significativo, confirmando as localidades de Alegrete e Ivorá como um grupo isolado das demais localidades, com grande percentual da divergência genética (53,15%) encontrada entre os dois grupos.

Tabela 34: Análise de Variância Molecular (AMOVA) baseada nas sequências nucleotídicas de *Cyt B* em *P.nigriceps*. P: valor de significância do teste. Φ : índice de fixação.

Estruturação	Fonte de Variação	Variância	% do total	p	Φ
único grupo	Interpopulacional	248,894 Va	82,35		
	Intrapopulacional	0,53352 Vb	17,65	0,00000	Φ_{st} 0,82348
dois grupos	Intergrupos	2,75616 Va	53,15	0,0336	Φ_{ct} 0,53154
	Interpopulacional	1,89551 Vb	36,56	0,00000	Φ_{sc} 0,78036
	Intrapopulacional	0,53352 Vc	10,29	0,00000	Φ_{st} 0,89711

Discussão

5 Discussão

5.1 Morfometria geométrica

As localidades de *M. caerulea* mostraram um padrão de similaridade morfológica congruente com características do relevo e vegetação. Candiota e Turuçu, as localidades mais próximas segundo as distâncias de Mahalanobis (2,0061) e com menor percentagem de acerto na função discriminante após a validação cruzada (78,57% e 84,75%), estão respectivamente localizadas em regiões fisiográficas chamadas Serra do Sudeste (também conhecida como Escudo Sul- Riograndense) e Encosta da Serra do Sudeste, considerada uma continuação da região anterior (Fortes, 1979). Tais regiões possuem características semelhantes tanto em termos geológicos como em relação à sua vegetação. Ambas regiões são mais úmidas que as demais regiões do Pampa, e possuem mais vegetação arbustiva (Fortes, 1979). Vale lembrar aqui que apesar de *M. caerulea* ser conhecida por estar relacionada exclusivamente ao Pampa, esse bioma não é completamente homogêneo (Roesch *et al.*, 2009).

A localidade de Viamão, que se mostrou agrupada com Turuçu e Candiota tanto no gráfico de dispersão de pontos da CVA (Figura 12) como na topologia do dendrograma calculado com base nas distâncias de Mahalanobis (Figura 13), apesar de ser geograficamente mais distante das demais, está em uma região de transição entre Pampa e Mata Atlântica (localizada na Depressão Central) (Fortes, 1979).

Alegrete e Bagé pertencem à mesma região fisiográfica denominada Campanha. É uma região de relevo suave (entre 60 e 120 metros de altitude), e os campos são formação vegetal predominante. Apresenta tendências à continentalidade, com as

maiores temperaturas no Rio Grande do Sul e poucas chuvas (UFMS/SEMA, 2007). Interessante notar que o distanciamento da localidade de Alegrete em relação às demais é condizente com a distância geográfica entre elas e que os padrões morfométricos encontrados em *M. caerulea* são congruentes, tanto com as distâncias geográficas entre as localidades, como em relação às características fisiográficas das regiões.

Em *P. nigriceps*, a Análise de Componentes Principais (PCA) apresentou grande sobreposição das localidades amostradas (Figura 28), refletindo sua grande similaridade morfológica. A Análise de Variáveis Canônicas (CVA) (Figura 29) mostra sobreposição das localidades de Anta Gorda, Ivorá, Riozinho, Poço das Antas e Westfalia pelo primeiro eixo canônico, sendo Santa Maria a localidade mais distante das demais. As localidades de Anta Gorda, Riozinho, Poço das Antas e Westfalia pertencem ao bioma Mata Atlântica. Santa Maria e Ivorá estão na Depressão Central, uma região de transição entre Mata Atlântica e Pampa (Fortes, 1979).

O segundo eixo canônico apresenta uma sobreposição destas localidades pertencentes à Mata Atlântica e região de transição, mas separa as localidades de Alegrete e Turuçu, ambas pertencentes ao bioma Pampa.

As menores distâncias de Mahalanobis foram encontradas entre Anta Gorda e Poço das Antas, e Anta Gorda e Westfalia. Essas localidades estão próximas geograficamente e pertencem ao mesmo bioma. Já a maior distância foi encontrada entre Alegrete e Turuçu. Apesar de ambas as localidades pertencerem ao bioma Pampa, Alegrete pertence à região fisiográfica da Campanha e Turuçu à Encosta da Sudeste (Fortes, 1979).

O teste de Mantel indicou que parte da diferenciação morfológica entre os grupos está relacionada à distância geográfica. No dendrograma (Figura 30) de proximidade morfológica, calculado a partir das distâncias de Mahalanobis, Anta Gorda e Poço das

Antas são localidades mais similares. Tais localidades também correspondem à menor taxa de acerto na validação cruzada, o que corrobora a proximidade morfológica entre elas. Westfalia é a localidade mais similar a elas, e o ramo com as três localidades é mais proximamente relacionado a um ramo que agrupa Riozinho e Turuçu. As demais localidades mais externamente relacionadas são Ivorá, Santa Maria e Alegrete.

Assim como encontrado para as localidades amostradas para *M. caerulea*, as localidades de *P. nigriceps* também mostraram um padrão de similaridade morfológica concordante com as características de relevo e vegetação. Com a exceção de Turuçu, que pertence ao bioma Pampa, as demais localidades agrupadas pertencem ao bioma Mata Atlântica. Seguidas de Ivorá e Santa Maria, localizadas na região de transição entre Mata Atlântica e Pampa; e finalmente Alegrete, pertencente ao bioma Pampa.

Uma das possíveis explicações de Turuçu estar mais relacionada a localidades de Mata Atlântica do que de seu próprio bioma, é a presença de florestas estacionais em seu ambiente (Manzolli *et al.*, 2013). O relevo é plano, mas pode atingir até 200 m, onde podem ser encontradas florestas latifoliadas altas (UFMS/SEMA, 2007).

Em estudos com representantes de Meliponini envolvendo morfometria geométrica tais distinções entre populações envolvendo distância geográfica e características ambientais foram relatadas. Francoy e colaboradores (2011) distinguiram *Melipona beecheii* da Costa Rica, El Salvador, Guatemala, México e Nicarágua, identificando ecótipos localmente adaptados. Em estudo com *Plebeia remota* (Francisco *et al.*, 2008) foi possível distinguir com alta taxa de acerto indivíduos oriundos de duas localidades de diferentes Estados brasileiros (Cunha-SP e Prudentópolis-PR). Em estudo com quatro espécies de meliponíneos africanos, *Dactylurina staudingeri*, *Meliponula bocandei*, *Meliponula ferrugínea* e *Hypotrigona* sp., foi possível distinguir morfometricamente as populações por zonas ecológicas (Combey *et al.*, 2013).

No trabalho de Bonatti e colaboradores (2014) foi demonstrado que a variabilidade morfométrica e genética observada entre diferentes localidades amostradas de *Melipona subnitida* no nordeste brasileiro está relacionada à distância geográfica entre elas e diferenças ambientais. Em estudo com a mesma espécie, mas apenas utilizando morfometria geométrica, foi encontrada correlação significativa entre variação na forma da asa e distância geográfica entre localidades amostradas no limite sul da distribuição de *M. subnitida* (Lima *et al.*, 2014).

Quando comparadas com outras espécies filogeneticamente próximas, todas as localidades de *Mourella caerulea* ficaram agrupadas entre si e separadas das outras espécies. *Mourella* é um gênero monoespecífico (Camargo & Pedro, 2013), e o táxon mais proximamente relacionado pertence a outro gênero. Comparando-se com *Schwarziana quadripunctata*, espécie pertencente ao gênero irmão de *Mourella* segundo a filogenia molecular de Rasmussen e Cameron (2010), *M. caerulea* apresentou valores de distâncias de Mahalanobis (Tabela 5) muito superiores aos observados entre suas localidades (entre 13,5 e 14,3, contra o intervalo de 1,8 a 4,4 encontrados nas comparações entre localidades de *M. caerulea*), provavelmente refletindo a distância evolutiva entre as espécies. Essa diferença de magnitude de valores quando comparando localidades de uma mesma espécie e estas localidades com outra espécie também foi observado nas distâncias de Mahalanobis obtidas comparando localidades de *Melipona subnitida* entre si e com outras espécies de *Melipona* (Bonatti, 2012).

No dendrograma de proximidade morfológica obtido a partir das distâncias de Mahalanobis (Figura 15) todos os grupos de *M. caerulea* estão unidos em um ramo bem definido e separado das demais espécies usadas como grupo externo. A topologia do dendrograma obtido reflete parcialmente as relações filogenéticas encontradas entre os gêneros de Meliponini (Rasmussen & Cameron, 2010).

Ao comparar *P. nigriceps* com outras espécies do gênero *Plebeia*, todas as localidades ficaram agrupadas entre si e separadas das outras espécies. No entanto, pode ser observado um gradiente de variação entre as localidades, enquanto as demais espécies de *Plebeia* utilizadas como grupo externo (*P. remota*, *P. flavocincta*, *P. droryana*, *P. pugnax* e *P. saiqui*) apresentaram sobreposição no gráfico da CVA (Figura 31).

As distâncias de Mahalanobis (Tabela 22) obtidas comparando localidades de *P. nigriceps* entre si foram menores do que os valores comparando essas localidades com outras espécies de *Plebeia*. Ao comparar estas espécies entre si, obtivemos valores similares ao das comparações entre localidades de *P. nigriceps*. *Plebeia* Schwarz, 1938, é um gênero muito diverso e com ampla distribuição tropical (Camargo & Pedro, 2013). São conhecidas 40 espécies para a região Neotropical, e pouco se sabe sobre as relações filogenéticas entre elas.

No dendrograma (Figura 32) de proximidade morfológica obtido a partir das distâncias de Mahalanobis todos os grupos de *P. nigriceps* estão unidos em um único ramo e separado das demais espécies de *Plebeia* usadas como grupo externo.

Dentro do que foi apresentado, concluímos que as análises morfométricas diferenciam as localidades de *M. caerulea* e de *P. nigriceps* quanto à distância geográfica e quanto às regiões fisiográficas ou biomas ocupados. Adicionalmente, as distâncias morfométricas entre *M. caerulea* e demais espécies de meliponíneos foram congruentes com o padrão filogenético da tribo e também foi possível distinguir *P. nigriceps* de outras espécies pertencentes ao mesmo gênero.

5.2 Hidrocarbonetos cuticulares

Foram encontrados 62 compostos no perfil de hidrocarbonetos cuticulares em forrageiras de *M. caerulea*: 12 n-alcanos, 14 metil-alcanos e 36 compostos insaturados. Destes, 24 eram alcenos e 12 alcadienos. Em *P. nigriceps*, foram encontrados 59 compostos no perfil de hidrocarbonetos cuticulares em operárias: 12 n-alcanos, 8 metil-alcanos e 39 compostos insaturados. Destes, 22 eram alcenos e 17 alcadienos. Os compostos das duas espécies variaram de tamanho entre 21 e 33 átomos de carbonos.

Em meliponíneos, é comum encontrarmos variação tanto no número de compostos como no tamanho das cadeias. Em *Schwarziana quadripunctata* este intervalo de valores foi entre 19 e 33 carbonos (Nunes *et al.*, 2009), para *Frieseomellita varia* os compostos do perfil variaram entre 24 e 31 átomos de carbono (Nunes *et al.*, 2008) e *Melipona marginata* apresenta compostos com entre 21 e 31 átomos de carbono (Ferreira-Caliman *et al.*, 2012).

Segundo o padrão de dispersão encontrado na PCA dos compostos de *M. caerulea*, Alegrete está mais distante das demais localidades, que estão sobrepostas. A CVA mostrou uma maior similaridade entre as localidades de Candiota, Turuçu e Bagé, enquanto Alegrete e Viamão mostraram-se mais distantes. A menor distância de Mahalanobis encontradas foi entre Bagé e Turuçu, e a maior entre Alegrete e Turuçu (Tabela 9).

A topologia do dendrograma de distâncias químicas (Figura 19) apresenta pontos discordantes quando comparado ao dendrograma baseado nas distâncias morfológicas (Figura 13). A análise representa Candiota e Turuçu como localidades mais próximas, seguida de Bagé; e em outro ramo Alegrete e Viamão agrupados.

Se considerarmos as distâncias geográficas entre as localidades, veremos que Candiota, Bagé e Turuçu são localidades próximas. No entanto, o dendrograma agrupa Alegrete e Viamão, que corresponde à maior distância geográfica entre as localidades estudadas.

Segundo o padrão de dispersão encontrado na PCA (Figura 34) dos compostos de *P. nigriceps*, Alegrete, Ivorá e Riozinho estão mais distantes das demais localidades, que estão sobrepostas. A CVA (Figura 35) distinguiu todas as localidades. Apesar do segundo eixo canônico ser responsável por uma variação menor, ele foi responsável pela separação das localidades do bioma Pampa (Alegrete e Turuçu) das demais. A menor distância de Mahalanobis encontradas foi entre Anta Gorda e Santa Maria e a maior entre Alegrete e Westfalia. Tais distâncias são diferentes das encontradas na análise morfométrica. Anta Gorda localiza-se na Mata Atlântica, e Santa Maria encontra-se na região de contato entre os dois biomas. Alegrete pertence ao bioma Pampa e Westfalia à Mata Atlântica.

A topologia do dendrograma de distâncias químicas (Figura 36) não é concordante com o dendrograma de distâncias morfológicas (Figura 30). A análise agrupa Riozinho e Ivorá em um ramo, e Alegrete e Turuçu em outro ramo. Esses dois ramos estão agrupados e associados mais externamente à Poço das Antas. Em outro ramo estão agrupados Santa Maria e Westfalia, seguidos de Anta Gorda.

Apenas as localidades do bioma Pampa ficaram agrupadas (Alegrete e Turuçu). As demais localidades não apresentaram grupamentos definidos de acordo com seu bioma de origem.

O teste de Mantel não apresentou correlação significativa entre distâncias químicas e geográficas para as duas espécies. Uma das razões que podem explicar a ausência de correlação entre essas variáveis é que os perfis de hidrocarbonetos

cuticulares podem sofrer influência ambiental significativa, como temperatura, alimentação e outros fatores ambientais (Gibbs, 1998; Martin *et al.*, 2012).

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) quando realizada utilizando a totalidade de compostos do perfil de *M. caerulea*, identificou Alegrete como uma localidade separada das demais. Apesar da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) usando a totalidade de compostos do perfil de *P. nigriceps* separar alguns agrupamentos de localidades, os valores de *p* permutado não são significativos.

Quando apenas *n*-alcanos são analisados na PCoA, não é possível fazer qualquer distinção de grupos em nenhuma das duas espécies. Os hidrocarbonetos possuem função primária estrutural, mas também são usados para comunicação em insetos sociais (Howard & Blomquist, 2005). Compostos saturados (*n*-alcanos) são lipídios de função estrutural, atuando como barreira contra dessecação e normalmente apresentam estrutura cristalina e altas temperaturas de fusão (Gibbs & Pomonis, 1995).

Na PCoA realizada apenas com compostos insaturados, a separação entre os grupos é similar à encontrada na análise realizada com todos os compostos para ambas as espécies. Compostos insaturados estão relacionados à comunicação, sendo geralmente usados como feromônios de contato (Gibbs, 2002; Châline, 2005). Sugere-se que, dada sua função comunicativa nos insetos sociais, tais compostos sejam os responsáveis pela distinção de grupos de diferentes localidades.

A análise de cluster (Figura 23) baseada nas distâncias euclidianas de *M. caerulea* não distingue as amostras de Turuçu, Bagé e Candiota entre si. A topologia indica que as amostras correspondentes a essas localidades são agrupadas juntas em um ramo. Este ramo está mais próximo de Viamão (considerado como um grupo, com valor de probabilidade de 97). Mais externamente, relacionado aos demais, está a localidade de Alegrete (considerada como um grupo, com valor de probabilidade 98 e valor de

bootstrap de 85).

A análise de cluster baseada nas distâncias euclidianas de *P. nigriceps* (Figura 40) apresenta topologia similar à do dendrograma baseado nas distâncias de Mahalanobis (Figura 36). Com exceção das amostras de Turuçu, que se agruparam ora com amostras de Santa Maria, ora com amostras de Anta Gorda, as demais localidades agruparam suas amostras em um mesmo ramo. Apesar dos valores de probabilidade de agrupamento de amostras de uma mesma localidade ser altos, os valores de *bootstrap* encontrados entre as localidades são baixos.

O perfil de hidrocarbonetos cuticulares foi utilizado para distinguir colônias de *Melipona marginata* de diferentes origens geográficas (Ferreira-Caliman *et al.*, 2012). A mesma metodologia foi utilizada para distinguir colônias de *Plebeia remota* de diferentes localidades por Francisco e colaboradores (2008). No entanto é importante ressaltar que tais estudos compararam colônias oriundas de duas localidades. Não foi realizada uma análise comparando mais de duas localidades com o intuito de inferir graus de similaridade entre elas.

Assim, através da análise de perfis de hidrocarbonetos cuticulares separamos as localidades de diferentes localidades, porém sem concordância com as distâncias geográficas nem com as regiões fisiográficas e biomas correspondentes.

5.3 DNA mitocondrial

A diversidade haplotípica total encontrada em *M. caerulea* (0,735) foi similar à encontrada para *Partamona mulata* (0,765) (Brito *et al.*, 2013) e *Melipona subnitida* (0,79) (Bonatti *et al.*, 2014).

A diversidade haplotípica total encontrada em *P. nigriceps* (0,934) é considerada alta, encontrado valor similar apenas para *M. quadrifasciata* (0,957) (Batalha-Filho *et al.*, 2010). Outros trabalhos com meliponíneos encontraram valores inferiores (Brito & Arias, 2010; Francisco & Arias, 2009; Assis, 2010; Gonçalves, 2010).

A diversidade haplotípica dentro das localidades variou entre 0,000 a 0,333 para *M. caerulea*, valores similares aos encontrados para *P. mulata* onde esse intervalo variou entre 0,00 e 0,50 (Brito *et al.*, 2013). A diversidade haplotípica de *P. nigriceps* variou entre 0,000 (em localidades com haplótipo único) a 0,795 (em Anta Gorda, que possui seis haplótipos).

A diversidade nucleotídica total encontrada em *M. caerulea* foi de 0,0163, e 0,0147 em *P. nigriceps*, superior aos valores encontrados em diversos estudos com meliponíneos. Em *M. quadrifasciata* a diversidade nucleotídica de COI foi de 0.00547 (Batalha-Filho *et al.*, 2010), em *M. subnitida* 0.00543 (para o COI) (Bonatti *et al.*, 2014), em *Partamona helleri* 0.0021 (RFLP de vários genes mitocondriais) (Brito & Arias, 2010), em *Partamona mulata* (COI e Cyt B concatenados) (0,00137) (Brito *et al.*, 2013) e em *Plebeia remota* 0,0082 (RFLP do genoma mitocondrial) (Francisco & Arias, 2010).

Foram encontrados 25 sítios variáveis nas sequências de Citocromo Oxidase I em *M. caerulea*. Um valor semelhante foi encontrados para a região do COI flanqueada por BarbeeF/MtD 09 em *Melipona bicolor*, com 22 sítios variáveis (Françoso & Arias, 2013). Foram também encontrados seis haplótipos, todos exclusivos em suas localidades, e separados entre si por um grande número de passos mutacionais. A menor distância entre dois háplótipos encontrada é de um passo mutacional (H2 e H3, ambos de Turuçú), mas podemos encontrar distâncias de até 16 passos mutacionais (H4 e H5, de Viamão e Alegrete, respectivamente).

A proximidade entre as localidades de Candiota, Turuçu e Bagé reflete o menor número de passos mutacionais entre seus haplótipos, assim com a similaridade química encontrada nos perfis de hidrocarbonetos cuticulares.

Em *P. nigriceps* foram encontrados 17 haplótipos, todos exclusivos. Das oito localidades amostradas, cinco apresentaram haplótipos únicos. Os haplótipos diferem desde apenas um passo mutacional até 13 passos mutacionais (entre H10 e H13, correspondentes às localidades de Anta Gorda e Ivorá, respectivamente).

A correlação entre distância genética e distância geográfica ($r=0,50$, $p<0,05$) indica isolamento por distância em *M. caerulea* (Telles & Diniz-Filho, 2005). Tal fato pode ser explicado pelas características próprias do grupo. As abelhas sem ferrão apresentam características comportamentais quanto à reprodução que influenciam sua estrutura populacional, tais como a monandria (Peters *et al.*, 1999) e a filopatria da rainha. A rainha deixa sua colônia de origem com algumas operárias e forma uma colônia em um novo local previamente determinado pelas operárias (Nogueira-Neto, 1954). A nova colônia mantém contato e depende de recursos da colônia de origem, por um longo período, que pode durar meses (Nogueira-Neto, 1997). Somado a isso, para meliponíneos o tamanho corporal atua como um fator limitante na capacidade máxima de vôo. Abelhas pequenas, como *Tetragonisca angustula* Latreille (1836), *Scaura latitarsis* Friese (1900) e *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier (1836), a distância máxima de vôo é estimada entre 621 e 951 m (Araújo *et al.*, 2004).

No entanto, o teste de Mantel ($r=0,27$, $p>0,05$) não indica correlação entre distâncias genéticas e geográficas para *P. nigriceps*. Valores similares foram encontrados para *Melipona subnitida* (Bonatti, 2012) e *P. remota* (Francisco & Arias, 2010).

A divergência nucleotídica encontrada entre as localidades de *M. caerulea* variou

entre 0,6% e 3,1%, sendo as maiores diferenças encontradas quando comparamos a localidade de Alegrete com as demais. Quando *M. caerulea* é comparada com outras espécies os valores de divergência aumentam para entre 6% e 34%.

A divergência nucleotídica encontrada entre os haplótipos de *P. nigriceps* variou entre 0,28% e 4,11%, sendo as maiores diferenças encontradas quando comparamos os haplótipos H13 e H14 com os demais. Quando *P. nigriceps* é comparada às demais espécies de *Plebeia* os valores de divergência mudam para entre 2,59% e 5,34%. Em estudo sobre *Premota* (Francisco & Arias, 2010) foram encontrados valores de divergência nucleotídica entre as localidades estudadas de 0,6% até 3,8%.

Os baixos valores interespecíficos encontrados entre as espécies de *Plebeia* podem ser atribuídos à divergência recente. Intervalos de divergência similares foram encontrados comparando *Melipona quadrifasciata*, *Melipona mandacaia* e *Melipona subnitida* (Bonatti, 2012). Baixos valores de diferenciação morfológica entre espécies de *Plebeia* também foram obtidos no presente estudo.

Pouco se sabe sobre a diversidade haplotípica e nucleotídica dentro do gênero *Plebeia*. Até o momento há estudos envolvendo aspectos populacionais de apenas uma espécie, *Plebeia remota* (Francisco *et al.*, 2008; Francisco & Arias, 2010; Francisco *et al.*, 2013) no qual se observa que suas localidades são altamente estruturadas, com 13 dos 15 haplótipos encontrados sendo exclusivos, apresentando alta diferenciação segundo os valores de F_{st} par a par. Estes resultados são muito similares aos apresentados no presente trabalho.

Hebert e colaboradores (2003) citam como limiar para variação intraespecífica entre 2 e 3% de divergência nucleotídica para o gene *Citocromo Oxidase I*. No entanto uma revisão envolvendo 62 estudos com insetos demonstram que em 28 dos casos os intervalos de variação interespecífica e intraespecífica de genes mitocondriais se

sobrepõem e em poucos casos atendem ao limiar de 2% proposto por Hebert (Cognato, 2006). Apesar do limiar de 2% de variação para delimitar espécies seja eficiente em alguns casos, é preferível uma abordagem mais ampla, utilizando um maior número de marcadores para realizar inferências quanto a delimitação de uma espécie.

É importante salientar também que, apesar das altas percentagens de divergência nucleotídica entre alguns haplótipos de *P. nigriceps*, estes se mantêm como um conjunto separado das demais espécies de *Plebeia* na análise de *Neighbour-Joining* utilizando as sequências nucleotídicas do gene em estudo.

A MANOVA mostrou que a variabilidade interpopulacional em *M. caerulea* e *P. nigriceps* é muito superior à variabilidade intrapopulacional. Isso se deve ao grande número de haplótipos exclusivos encontrados.

Em *M. caerulea* foi proposta uma separação entre as localidades de Candiota, Bagé e Turuçu das demais, no entanto os valores não foram significativos, o que pode estar relacionado à baixa amostragem na localidade de Viamão. Em *P. nigriceps* foi possível separar Ivorá e Alegrete como um haplogrupo distinto dos demais. Os valores de variação entre grupos e entre populações de um mesmo grupo foram menores dos que os encontrados para *M. subnitida* (Bonatti, *et al.*, 2014).

M. caerulea e *P. nigriceps* apresentam uma alta estruturação populacional e baixa diversidade. Em estudo com *Plebeia remota* (Francisco *et al.*, 2013), foi encontrado um padrão de baixa estruturação populacional e alta diversidade genética por marcadores microssatélites; e alta estruturação populacional e baixa diversidade genética por marcadores mitocondriais (o mesmo tipo utilizado no presente estudo). Os autores atribuem essa alta estruturação à baixa capacidade de dispersão das rainhas.

M. caerulea é uma espécie de nidificação subterrânea obrigatória, e sua distribuição está relacionada ao bioma Pampa. Dada a dificuldade de sua manutenção e

baixa sobrevivência em caixas racionais, o transporte de colônias por meliponicultores é raro. Esse fator colabora para o isolamento entre colônias e, conseqüentemente, a diferenciação entre elas. Bonatti e colaboradores (2014) encontraram dois haplótipos compartilhados entre localidades distantes, indicativo de um contato secundário após o isolamento. Esse contato provavelmente foi promovido através da atividade de meliponicultura. Uma vez que *M. caerulea* não é uma espécie adaptada ao manejo, tal interferência não ocorre.

Outra problemática para a espécie é disponibilidade de locais de nidificação. Com a intensificação das atividades agrícolas, silvicultura e más práticas de manejo agrícola (como queimadas e uso indiscriminado de pesticidas), cavidades subterrâneas não alteradas por interferência humana são cada vez mais raras em sua área de distribuição.

Por seu tamanho corporal (3,5mm) (Witter *et al.*, 2007), estima-se que *P. nigriceps* possua um raio de vôo pequeno. No entanto, seu hábito de nidificação, em frestas de rochas e muros e sem a construção de um invólucro, a favorece na busca por novos sítios para enxamear. Os enxames se adaptam facilmente a ninhos armadilha e estão bem adaptados a ambientes antrópicos (Witter *et al.*, 2007).

Pela análise do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I foi possível separar amostras de *M. caerulea* de diferentes localidades de acordo com as distâncias geográficas. Contudo não podemos estabelecer essa relação para *P. nigriceps*, através da análise do gene Citocromo B.

Conclusões

6 Conclusões

- As análises morfométricas diferenciam as localidades de *M. caerulea* e de *P. nigriceps* quanto à distância geográfica e quanto às regiões fisiográficas ou biomas ocupados;
- As distâncias morfométricas entre *M. caerulea* e demais espécies de meliponíneos foram congruentes com o padrão filogenético da tribo e também foi possível distinguir *P. nigriceps* de outras espécies pertencentes ao mesmo gênero.
- Como se trata de um marcador neutro e com pouca influência ambiental, recomendamos seu uso para estudos populacionais, além de funcionar como uma boa ferramenta taxonômica;
- Através da análise de perfis de hidrocarbonetos cuticulares separamos as amostras das diferentes localidades para ambas as espécies, porém sem concordância com as distâncias geográficas nem com as regiões fisiográficas ou biomas correspondentes, indicando que os perfis de hidrocarbonetos cuticulares podem sofrer influência ambiental significativa;
- A distinção entre localidades é melhor realizada por compostos insaturados do que saturados;

- Para estudos populacionais, recomendamos a utilização dos compostos insaturados, que geralmente estão relacionados com processos de comunicação e, pelo menos em nossos dados, apresentam uma maior variabilidade. Como n-alcenos são estruturais, sua composição é menos variável e não são tão informativos para a discriminação dos grupos;
- A partir das sequências de parte do gene mitocondrial COI foi possível separar amostras de *M. caerulea* de diferentes localidades de acordo com as distâncias geográficas. Contudo não podemos estabelecer essa relação para *P. nigriceps*, através da análise do gene Citocromo B;
- Ambas as espécies possuem grande número de haplótipos exclusivos, indicando que, pelo menos no tocante ao fluxo gênico materno, há isolamento por distância.
- *P. nigriceps* possui localidades com maior número de haplótipos do que *M. caerulea*. Isso pode estar relacionado com a amostragem diferencial entre as duas espécies ou então, refletir processos demográficos históricos, como retração e expansão populacional. As questões demográficas serão investigadas futuramente com um maior número de amostras e uma maior cobertura da área de distribuição de ambas as espécies;

- Nossos dados ainda indicam que comportamentos como a filopatria das rainhas e processo de enxameação em abelhas sem ferrão influenciam o padrão de dispersão, bem como os diferentes hábitos de nidificação, que podem influenciar a resposta destas espécies de diferentes formas à alterações ambientais e fragmentação de habitat.
- A presença de diversos haplótipos exclusivos, perfis morfométricos e de hidrocarbonetos cuticulares em populações pertencentes a diferentes biomas indicam a necessidade de uma atenção especial para estas populações no momento da definição de estratégias de conservação das espécies. Uma especial atenção às abelhas da espécie *Mourella caerulea*, que além de ser uma espécie representante única de um gênero monoespecífico, apresenta grandes distâncias populacionais entre os indivíduos de todas as localidades amostradas.

Referências Bibliográficas

- Aitchison, J. (1982). The statistical analysis of compositional data. London: Chapman & Hall.
- Alston, D. G., Tepedino, V. J., Bradley, B. A., Toler, T. R., Griswold, T. L., & Messinger, S. M. (2007). Effects of the insecticide phosmet on solitary bee foraging and nesting in orchards of Capitol Reef National Park, Utah. *Environmental Entomology*, 36(4), 811-816.
- Alves-dos-Santos, I. (1999). Abelhas e plantas melíferas da mata atlântica, restinga e dunas do litoral norte do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 43(3/4), 191-223.
- Araújo, E. D., Costa, M., Chaud-Netto, J., & Fowler, H. G. (2004). Body size and flight distance in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): inference of flight range and possible ecological implications. *Brazilian Journal of Biology*, 64(3B), 563-568.
- Arias, M. C., Francisco, F. D. O., Silvestre, D., Mello, G. A. R., & Alves-dos-Santos, I. (2003). O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. *Apoidea Neotropica (GAR Mello & I. Alves-dos-Santos, eds.)*. Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 305-309.
- Assis, A. F. D. (2010). Estudo populacional e molecular de *Nannotrigona testaceicornis* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) através do DNA mitocondrial (Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo).
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.
- Batalha-Filho, H., Waldschmidt, A. M., Campos, L. A., Tavares, M. G., & Fernandes-Salomão, T. M. (2010). Phylogeography and historical demography of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie*, 41(5), 534-547.
- Biesmeijer, J. C., Roberts, S. P. M., Reemer, M., Ohlemüller, R., Edwards, M., Peeters, T., & Kunin, W. E. (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313(5785), 351-354.
- Bonatti et al., 2014
- Brittain, C. A., Vighi, M., Bommarco, R., Settele, J., & Potts, S. G. (2010). Impacts of a pesticide on pollinator species richness at different spatial scales. *Basic and Applied Ecology*, 11(2), 106-115.
- Brito, R. M., & Arias, M. C. (2010). Genetic structure of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) from Neotropical Atlantic rainforest. *Insectes sociaux*, 57(4), 413-419.
- Brito, R. M., Francisco, F. D. O., Françoso, E., Santiago, L. R., & Arias, M. C. (2013). Very low mitochondrial variability in a stingless bee endemic to cerrado. *Genetics and molecular biology*, 36(1), 124-128.
- Bonatti, V. (2012). *Caracterização genético-morfológica de populações de Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) no nordeste brasileiro (Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo).

- Bonatti, V., Simões, Z. L. P., Franco, F. F., & Franco, T. M. (2014). Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. *Naturwissenschaften*, 101(1), 17-24.
- Brown, M. J., & Paxton, R. J. (2009). The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie*, 40(3), 410-416.
- Camargo, J. M. F. & Pedro, S. R. M. (2013). Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version*. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>.
- Camargo, J. M., & Wittmann, D. (1989). Nest architecture and distribution of the primitive stingless bee, *Mourella caerulea* (hymenoptera, apidae, meliponinae): Evidence for the origin of *Plebeia* (s. lat.) on the gondwana continent. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 24(4), 213-229.
- Carlson, D. A. (1988). Hydrocarbons for identification and phenetic comparisons: cockroaches, honey bees and tsetse flies. *Florida Entomologist*, 333-345.
- Châline, N., Sandoz, J. C., Martin, S. J., Ratnieks, F. L., & Jones, G. R. (2005). Learning and discrimination of individual cuticular hydrocarbons by honeybees (*Apis mellifera*). *Chemical senses*, 30(4), 327-335.
- Cognato, A. I. (2006). Standard percent DNA sequence difference for insects does not predict species boundaries. *Journal of Economic Entomology*, 99(4), 1037-1045.
- Combey, R., Teixeira, J. S. G., Bonatti, V., Kwapong, P., & Franco, T. M. (2013). Geometric morphometrics reveals morphological differentiation within four African stingless bee species. *Annals of Biological Research*, 4(11).
- Danforth, B. N., Sipes, S., Fang, J., & Brady, S. G. (2006). The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(41), 15118-15123.
- Drummond, A. J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., & Wilson, A. (2011). Geneious v5. 4.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3), 564-567.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.
- Ferreira, P., & Boldrini, I. I. (2011). Potential reflection of distinct ecological units in plant

- endemism categories. *Conservation Biology*, 25(4), 672-679.
- Ferreira-Caliman, M. J., Nascimento, F. S., Turatti, I. C., Mateus, S., Lopes, N. P., & Zucchi, R. (2010). The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. *Journal of insect physiology*, 56(7), 800-804.
- Ferreira-Caliman, M. J., Zucchi, R., & Nascimento, F. S. (2012). Cuticular Hydrocarbons Discriminate Distinct Colonies of *Melipona marginata* (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Sociobiology*, 59(3), 783.
- Fortes, A. B. (1979). *Compêndio de Geografia do Rio Grande do Sul*. Sulina.
- Francisco, F. O., Nunes-Silva, P., Franco, T. M., Wittmann, D., Imperatriz-Fonseca, V. L., Arias, M. C., & Morgan, E. D. (2008). Morphometrical, biochemical and molecular tools for assessing biodiversity. An example in *Plebeia remota* (Holmberg, 1903)(Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux*, 55(3), 231-237.
- Francisco, F. O. & Arias, M. C. (2010). Inferences of evolutionary and ecological events that influenced the population structure of *Plebeia remota*, a stingless bee from Brazil. *Apidologie*, 41(2), 216-224.
- Francisco, F. D. O., Santiago, L. R., & Arias, M. C. (2013). Molecular genetic diversity in populations of the stingless bee *Plebeia remota*: A case study. *Genetics and molecular biology*, 36(1), 118-123.
- Francisco, F. O., Santiago, L. R., Brito, R. M., Oldroyd, B. P., & Arias, M. C. (2014). Hybridization and asymmetric introgression between *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi*. *Apidologie*.
- Françoso, E., & Arias, M. C. (2013). Cytochrome c oxidase I primers for corbiculate bees: DNA barcode and mini-barcode. *Molecular ecology resources*, 13(5), 844-850.
- Franck, P., Cameron, E., Good, G., Rasplus, J. Y., & Oldroyd, B. P. (2004). Nest architecture and genetic differentiation in a species complex of Australian stingless bees. *Molecular Ecology*, 13(8), 2317-2331.
- Franco, T. M., Wittmann, D., Drauschke, M., Müller, S., Steinhage, V., Bezerra-Laure, M. A., & Gonçalves, L. S. (2008). Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. *Apidologie*, 39(5), 488-494.
- Franco, T. M., Silva, R. A. O., Nunes-Silva, P., Menezes, C., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2009). Gender identification of five genera of stingless bees (Apidae, Meliponini) based on wing morphology. *Genetics and molecular research: GMR*, (8), 207-14.
- Franco, T. M., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2010). A Morfometria geométrica de asas e a identificação automática de espécies de abelhas. *Oecologia Australis*, 14(1), 317-321.
- Franco, T. M., Grassi, M. L., Imperatriz-Fonseca, V. L., de Jesús May-Itzá, W., & Quezada-Euán, J. J. G. (2011). Geometric morphometrics of the wing as a tool for assigning genetic lineages and geographic origin to *Melipona beecheii* (Hymenoptera: Meliponini).

- Apidologie*, 42(4), 499-507.
- Freitas, B. M., Imperatriz-Fonseca, V. L., Medina, L. M., Kleinert, A. D. M. P., Galetto, L., Nates-Parra, G., & Quezada-Euán, J. J. G. (2009). Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*, 40(3), 332-346.
- Fürst, M. A., McMahon, D. P., Osborne, J. L., Paxton, R. J., & Brown, M. J. F. (2014). Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature*, 506(7488), 364-366.
- Giannini, T. C., Acosta, A. L., Garófalo, C. A., Saraiva, A. M., Alves-dos-Santos, I., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2012). Pollination services at risk: Bee habitats will decrease owing to climate change in Brazil. *Ecological Modelling*, 244, 127-131.
- Gibbs, A., & Pomonis, J. G. (1995). Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: the effects of chain length, methyl-branching and unsaturation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 112(2), 243-249. Gibbs, 1998
- Gibbs, A. G. (1998). Water-proofing properties of cuticular lipids. *American Zoologist*, 38(3), 471-482.
- Gibbs, A. G. (2002). Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. *Journal of Insect Physiology*, 48(4), 391-400.
- Gonçalves, P. H. P. (2010). Análise da variabilidade genética de uma pequena população de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas (Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo).
- Goulson, D., Lye, G. C., & Darvill, B. (2008). Decline and conservation of bumble bees. *Annu. Rev. Entomol.*, 53, 191-208.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis Palaeontol. Electronica 4: 1–9.
- Harter, B. (1999). Bienen und ihre Trachtpflanzen im Araukarien-Hochland von Rio Grande do Sul. (Tese de Doutorado, Universidade de Tübingen).
- Hasenack, H., Weber, E., Boldrini, I. I., & Trevisan, R. (2010). Mapa de sistemas ecológicos da ecorregião das Savanas Uruguaias em escala 1: 500.000 ou superior e relatório técnico descrevendo insumos utilizados e metodologia de elaboração do mapa de sistemas ecológicos. *Porto Alegre: UFRGS*.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., & Ball, S. L. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & de Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal*

- Society of London B: Biological Sciences*, 270(Suppl 1), S96-S99.
- Hickling, R., Roy, D. B., Hill, J. K., Fox, R., & Thomas, C. D. (2006). The distributions of a wide range of taxonomic groups are expanding polewards. *Global change biology*, 12(3), 450-455.
- Howard, R. W., & Blomquist, G. J. (2005). Ecological, Behavioral, and Biochemical Aspects of Insects Hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.*, 50, 371-393.
- Klein, A. M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303-313..
- Klingenberg, C. P., & McIntyre, G. S. (1998). Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution*, 1363-1375.
- Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11(2), 353-357.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
- Lima, C. B., Nunes, L.A., Ribeiro, M.F., & Carvalho, C. A. (2014). Population Structure of *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) at the Southern Limit of its Distribution Based on Geometric Morphometrics of Forewings. *Sociobiology*, 61(4), 478-482.
- Lockey, K. H. (1988). Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 89(4), 595-645.
- Machado et al. 2008
- Machado, A. B. M., Drummond, G. M., & Paglia, A. P. (2008). *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção*. Ministério do Meio Ambiente-MMA.
- Malagodi-Braga, K. S., & Kleinert, A. D. M. P. (2004). Could *Tetragonisca angustula* Latreille (Apinae, Meliponini) be effective as strawberry pollinator in greenhouses?. *Crop and Pasture Science*, 55(7), 771-773.
- Manzolini, R. P., Portz, L., & Tagliani, C. R. A. (2013) Subsídios Técnicos para o Planejamento Ambiental do Município de Turuçu, Planície Costeira do Rio Grande do Sul. *Gravel*, 11(1), 19-35.
- Martin, S. J., Shemilt, S., & Drijfhout, F. P. (2012). Effect of time on colony odour stability in the ant *Formica exsecta*. *Naturwissenschaften*, 99(4), 327-331.
- Memmott, J., Craze, P. G., Waser, N. M., & Price, M. V. (2007). Global warming and the disruption of plant–pollinator interactions. *Ecology letters*, 10(8), 710-717.
- Mendes, M. F. M., Franco, T. M., Nunes-Silva, P., Menezes, C., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2007). Intra-populational variability of *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier 1836

- (Hymenoptera, Meliponini) using relative warps analysis. *Bioscience Journal*, 23.
- Mikich, S.B. & Bérnils, R. S. (2004). Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná. Disponível em: < <http://www.pr.gov.br/iap>>.
- Miller, M. P. (1997). Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. *Computer software distributed by author*, 4, 157.
- MMA, 2012. Monitoramento dos Biomas Brasileiros: Bioma Pampa. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/182/arquivos/pampa2002_2009_182.pdf>.
- Monteiro, L. R., Diniz-Filho, J. A. F., Reis, S. F., & Araújo, E. D. (2002). Geometric estimates of heritability in biological shape. *Evolution*, 56(3), 563-572.
- Morse, R. A., & Calderone, N. W. (2000). The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. *Bee culture*, 128(3), 1-15.
- Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). (2007) *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version*. Disponível em: <<http://www.moure.cria.org.br/catalogue>>.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press.
- Nogueira-Neto, P. (1954). Notas bionômicas sobre meliponíneos: III—Sobre a enxameagem. *Arq. Mus. Nac*, 42, 419-451.
- Nogueira Neto, P. (1997). Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. Editora Nogueirapis, São Paulo.
- Nunes, T. M., Nascimento, F. S., Turatti, I. C., Lopes, N. P., & Zucchi, R. (2008). Nestmate recognition in a stingless bee: does the similarity of chemical cues determine guard acceptance? *Animal Behaviour*, 75(3), 1165-1171.
- Nunes, T. M., Turatti, I. C. C., Mateus, S., Nascimento, F. S., Lopes, N. P., & Zucchi, R. (2009). Cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): differences between colonies, castes and age. *Genet. Mol. Res*, 8, 589-595.
- Oliveira-Filho, A. T., & Fontes, M. A. L. (2000). Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate. *Biotropica*, 32(4b), 793-810.
- Packer, L., Gibbs, J., Sheffield, C., & Kevan, P. (2008). Barcoding the Bees of the World. *Anais do VIII Encontro sobre Abelhas Ribeirão Preto-SP, Brasil*.
- Peters, J. M., Queller, D. C., Imperatriz-Fonseca, V. L., Roubik, D. W., & Strassmann, J. E. (1999). Mate number, kin selection and social conflicts in stingless bees and honeybees. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 266(1417), 379-384.
- Pitts-Singer, T. L., & Cane, J. H. (2011). The Alfalfa Leafcutting Bee, *Megachile rotundata*: The

- World's Most Intensively Managed Solitary Bee. *Annual review of entomology*, 56, 221-237.
- Polzin, T., & Daneshmand, S. V. (2003). On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters*, 31(1), 12-20.
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in ecology & evolution*, 25(6), 345-353.
- Rasmussen, C., & Cameron, S. A. (2010). Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99(1), 206-232.
- Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J., & Hirota, M. M. (2009). The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological conservation*, 142(6), 1141-1153.
- Roesch, L. F. W., Vieira, F. C. B., Pereira, V. A., Schünemann, A. L., Teixeira, I. F., Senna, A. J. T., & Stefenon, V. M. (2009). The Brazilian Pampa: a fragile biome. *Diversity*, 1(2), 182-198.
- Rohlf, F.J. (2005a) tpsDig, version 2.04. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.
- Rohlf, F.J. (2005b) tpsRelw, version 2.04. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.
- Rohlf, J. F. (2009). tps Utility program. *Ecology and Evolution, SUNY at Stony Brook*.
- Rohlf, F. J., & Marcus, L. F. (1993). A revolution morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(4), 129-132.
- Rosa, A. D. S., Blochtein, B., & Lima, D. K. (2011). Honey bee contribution to canola pollination in Southern Brazil. *Scientia Agricola*, 68(2), 255-259.
- SEMA-RS, 2014. Conservação da Mata Atlântica. Disponível em: <<http://www.sema.rs.gov.br/>>
- Sheffield, C. S., Hebert, P. D., Kevan, P. G., & Packer, L. (2009). DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies. *Molecular Ecology Resources*, 9(s1), 196-207.
- Silva, R.A.O. (2006). A morfometria geométrica e as espécies do gênero *Plebeia* (Apidae, Meliponini). Monografia apresentada à FFCLRP. 42p.
- Silveira, F. A., Melo, G. A., & Almeida, E. A. (2002). *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. Belo Horizonte (MG, Brazil): Fernando A. Silveira.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the entomological Society of*

- America*, 87(6), 651-701.
- Singer, T. L., Camann, M. A., & Espelie, K. E. (1992). Discriminant analysis of cuticular hydrocarbons of social wasp *Polistes exclamans* Viereck and surface hydrocarbons of its nest paper and pedicel. *Journal of chemical ecology*, 18(5), 785-797.
- SOS Mata Atlântica, INPE. (2014). Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica 2012-2013. 61p.
- Suzuki, R., & Shimodaira, H. (2006). Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics*, 22(12), 1540-1542.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Tavares, M. G., Dias, L. A. D. S., Borges, A. A., Lopes, D. M., Busse, A. H. P., Costa, R. G., & Campos, L. A. D. O. (2007). Genetic divergence between populations of the stingless bee uruçú amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais?. *Genetics and Molecular Biology*, 30(3), 667-675.
- Telles, M. P.C., & Diniz-Filho, J. A. F. (2005). Multiple Mantel tests and isolation-by-distance, taking into account long-term historical divergence. *Genet. Mol. Res*, 4(4), 742-748.
- Thummajitsakul, S., Klinbunga, S., Smith, D., & Sittipraneed, S. (2008). Genetic diversity and population structure of *Trigona pagdeni* Schwarz in Thailand. *Apidologie*, 39(4), 446-455.
- UFSM/SEMA-RS (2007) Inventário Florestal Contínuo do Rio Grande do Sul. Disponível em : <http://w3.ufsm.br/ifcrs/frame.htm>.
- Vogler, A. P., & Monaghan, M. T. (2007). Recent advances in DNA taxonomy. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 45(1), 1-10.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10(4), 506-513.
- Waugh, J. (2007). DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*, 29(2), 188-197.
- Williams, P., Colla, S., & Xie, Z. (2009). Bumblebee vulnerability: common correlates of winners and losers across three continents. *Conservation Biology*, 23(4), 931-940.
- Wilms, W., Wendel, L., Zillikens, A., Blochtein, B., & Engels, W. (1997). Bees and other insects recorded on flowering trees in a subtropical Araucaria forest in southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 32(4), 220-226.

- Witter, S., & Blochtein, B. (2003). Efeito da polinização por abelhas e outros insetos na produção de sementes de cebola. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(12), 1399-1407.
- Witter, S., Blochtein, B., Andrade, F., Wolff, L. F., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2007). Meliponicultura no Rio Grande do Sul: contribuição sobre a biologia e conservação de *Plebeia nigriceps* (Fries 1901)(Apidae, Meliponini). *Bioscience Journal*, 23.
- Witter, S., Radin, B., Lisboa, B. B., Teixeira, J. S. G., Blochtein, B., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2012). Desempenho de cultivares de morango submetidas a diferentes tipos de polinização em cultivo protegido. *Pesq. Agropec. Bras*, 47, 58-65.
- Wittmann, D., & Hoffmann, M. (1990). Bees of Rio Grande do Sul, southern Brazil (Insecta, Hymenoptera, Apoidea). *Iheringia, Série Zoologia*, 70, 17-43.