



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR

Filogeografia de *Partamona helleri* Friese, 1900 (Hymenoptera:  
Apidae: Meliponini)

Tecavita Ananda Rodrigues Cardoso

SÃO CARLOS – SP

– 2016 –

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR

Filogeografia de *Partamona helleri* Friese, 1900 (Hymenoptera:  
Apidae: Meliponini)

Tecavita Ananda Rodrigues Cardoso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre, Área de Concentração: Genética Evolutiva.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

SÃO CARLOS – SP

– 2016 –

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C268f      Cardoso, Tecavita Ananda Rodrigues  
            Filogeografia de *Partamona helleri* Friese, 1900  
(Hymenoptera: Apidae: Meliponini) / Tecavita Ananda  
Rodrigues Cardoso. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
            81 p.

            Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2016.

            1. Abelhas sem ferrão. 2. Filogeografia. 3.  
Marcadores mitocondriais. 4. Mata Atlântica. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Tecavita Ananda Rodrigues Cardoso, realizada em 06/07/2016:

---

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama  
UFSCar

---

Dr/ Prof. Dr. Elder Assis Miranda  
UESC

---

Prof. Dr. Fernando de Faria Franco  
UFSCar

---

Dr/ Prof. Dr. Tiago Maurício Franco  
USP

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de concluir mais essa etapa. Sei que sem Ele nada poderia ter acontecido. A Ele seja dada toda honra e glória, hoje e sempre.

Ao meu esposo, colega de profissão, de mestrado e de vida Pedro Cardoso, pelo amor, companheirismo, cuidado e apoio que me concedeu durante essa trajetória. A tua presença é e sempre será fundamental na minha vida. Sei que além de um esposo, tenho um amigo que sempre posso contar. Amo-te!

À minha maravilhosa família, agradeço. Aos meus pais Cida e Gilvan Rodrigues por todo incentivo que, mesmo à distância, dispensaram a mim. Aos meus irmãos, Rabi, Cíntira e Isaías e ainda à minha cunhada-irmã Débora e ao príncipe Nicolás que ela nos deu. Nos momentos mais difíceis, recebi palavras de força que me ajudaram a superar os obstáculos que surgiram no caminho. Vocês são muito importantes em minha vida e me deram suporte para chegar até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Antônio Del Lama, primeiramente pela confiança em aceitar me orientar antes mesmo de me conhecer pessoalmente. Agradeço por toda paciência, dedicação, disponibilidade, incentivo e conselhos que, com certeza, levarei para toda vida. Em frente, sempre.

À CAPES, pela bolsa de pesquisa concedida e à FAPESP pelo auxílio financeiro para que este trabalho pudesse ser desenvolvido.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGev) e à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pelo apoio institucional. Ainda, aos professores, por todo aprendizado em cada disciplina cursada ao longo desses dois anos.

À Dra. Silvia Regina de Menezes Pedro, da FFCLRP – USP, pela identificação morfológica dos exemplares.

A todos os que ajudaram na coleta do material biológico e também àqueles que cederam amostras que foram usadas nessa pesquisa.

Ao amigo Elder Miranda, pelo grande auxílio e por todas as discussões e dicas que tanto me ajudaram na elaboração desse trabalho. Valeu mesmo, “Elder Elder”!

Aos demais colegas do Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros (LGEH): Diana Machado, Antônio Carvalho, Jamile Miranda, Danielle Lucena, Kátia Ferreira, Isabel Godói, Camila Sabadini, Mariana Dessi, Gabriele Freiria, Aline Andrade e Luana Bataglia. Agradeço por toda ajuda e por terem tornado esse tempo tão mais agradável. Foi um prazer trabalhar com vocês.

Aos amigos e familiares que deixei em Jequié-BA e que sempre torceram por mim.

Enfim, a todos os que direta ou indiretamente ajudaram na conclusão desse trabalho.

Sou muito grata por tudo.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	VI
LISTA DE TABELAS .....	IX
RESUMO .....	X
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. O DNA mitocondrial como marcador molecular .....	4
1.2. Padrões filogeográficos na Mata Atlântica .....	5
1.3. Espécie modelo: <i>Partamona helleri</i> .....	9
2. OBJETIVO.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1. Obtenção dos espécimes.....	15
3.2. Obtenção de dados genéticos mitocondriais .....	16
3.3. Edição, análise e caracterização das sequências nucleotídicas .....	20
3.4. Inferências filogenéticas.....	20
3.5. Estrutura genética populacional e filogeográfica .....	22
3.6. Inferência demográfica.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Caracterização das sequências .....	24
4.2. Inferências filogenéticas.....	26
4.3. Estrutura populacional e inferência filogeográfica .....	30
4.4. Demografia histórica .....	41
5. DISCUSSÃO.....	44
5.1. Caracterização das sequências .....	44
5.2. Estrutura populacional.....	45
5.3. Estrutura filogeográfica.....	47
5.4. Inferências demográficas.....	53
5.5. Hipótese sobre a origem e dispersão da espécie.....	54
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59
APÊNDICE .....	72

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação das cinco categorias propostas por Avise (2000) para explicar diferentes padrões filogeográficos. Figura extraída de Martins & Domingues (2011).....3
- Figura 2.** Ninhos de *P. helleri* construídos sobre diferentes substratos. **A)** Em ninho do pássaro João-graveto (Foto: Miranda EA); **B)** Bromélia epífita; **C)** Tronco de árvore; **D)** Janela de casa abandonada; **E)** Parede de casa habitada; **F)** Condicionador de ar (Extraída de Ferreira 2011)..... 12
- Figura 3.** Vista frontal (A) e lateral (B) de uma operária da espécie *P. helleri*. A barra de escala corresponde a 1 mm. Foto: Dessi MC (LGEH).....13
- Figura 4.** Mapa evidenciado as 67 localidades amostradas para *P. helleri* e sua distribuição na Mata Atlântica e áreas de transição entre Mata Atlântica e Cerrado. O mapa foi gerado pelo programa Diva-Gis (<http://www.diva-gis.org/>).....16
- Figura 5.** Eletroferogramas de fragmentos dos genes COI (a), CytB (b) e 12S (c) de amostras de *P. helleri*.....25
- Figura 6.** Reconstrução filogenética obtida por Inferência Bayesiana com base em 1508 pb dos genes COI, CytB e 12S concatenados da espécie *P. helleri* e um grupo externo (*P. cupira*). Os suportes nos ramos mostram valores de probabilidade posterior.....27
- Figura 7.** Reconstrução filogenética de populações de *P. helleri* obtida por Máxima Verossimilhança com base em 1508 pb dos genes COI, CytB e 12S concatenados e um grupo externo (*P. cupira*). Os suportes nos ramos mostram os valores de *bootstrap*. As cores

utilizadas correspondem aos clados estabelecidos na topologia por Inferência Bayesiana.....29

**Figura 8.** **A)** Rede haplotípica gerada com base nas sequências concatenadas dos três genes mitocondriais (1508 pb) de *P. helleri*. Os traços indicam passos mutacionais entre os haplótipos. Nenhum traço equivale a um passo mutacional. Dois traços na diagonal indicam mais de quatro passos mutacionais. **B)** Mapa indicando a localização geográfica dos pontos de coleta. As cores utilizadas correspondem aos filogrupos obtidos pela análise bayesiana implementada pelo programa BAPS.....34

**Figura 9.** Análise espacial da variância molecular (SAMOVA). **A)** Estimativa dos índices de fixação obtida para cada número de k. **B)** Porcentagem da variação genética contida nos níveis hierárquicos da SAMOVA obtido para cada número de k.....36

**Figura 10.** **A)** Agrupamentos para as populações de *P. helleri* inferidos através da análise bayesiana implementada pelo programa BAPS. **B)** Mapa indicando a localização geográfica das amostras. As cores indicam os *clusters* em que cada população foi agrupada.....39

**Figura 11.** Mapa mostrando as localidades de cada filogrupos de *P. helleri* ao longo das regiões norte, central e sul da distribuição de *P.helleri*.....41

**Figura 12.** Inferências do *Coalescent Bayesian Skyline Plot* (BSP) para a história demográfica dos grupos de populações de *P. helleri* baseada nas regiões mitocondriais concatenadas (1508pb): **A)** Grupo Centro-Oeste; **B)** Grupo Centro-Sul. A linha preta representa a mediana estimada e os intervalos azuis mostram o limite inferior e superior de 95% de HPD (*Highest Posterior Density*).....43

**Figura 13.** Rede de haplótipos do gene COI verificados em 347 amostras da espécie *P. helleri* coletadas em 67 localidades. As cores identificam os filogrupos gerados pelo BAPS. Os traços indicam os passos mutacionais entre os haplótipos. Nenhum traço equivale a um passo mutacional. Dois traços na diagonal indicam mais de quatro passos mutacionais.....80

**Figura 14.** Rede de haplótipos do gene 12S verificados em 344 amostras da espécie *P. helleri* coletadas em 66 localidades. As cores identificam os filogrupos gerados pelo BAPS. Os traços indicam os passos mutacionais entre os haplótipos. Nenhum traço equivale a um passo mutacional. Dois traços na diagonal indicam mais de quatro passos mutacionais.....80

**Figura 15.** Rede de haplótipos do gene CytB verificados em 339 amostras da espécie *P. helleri* coletadas em 64 localidades. As cores identificam os filogrupos gerados pelo BAPS. Os traços indicam os passos mutacionais entre os haplótipos. Nenhum traço equivale a um passo mutacional. Duas barras na diagonal indicam mais de quatro passos mutacionais.....81

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequência dos primers utilizados para amplificação por PCR.....	17
<b>Tabela 2.</b> Localidades amostradas para a espécie <i>P. helleri</i> , sigla de cada localidade, número de colônias amostradas por localidade e número de colônias analisadas para os três genes mitocondriais (COI, CytB e 12S).....	18
<b>Tabela 3.</b> Partições e modelos evolutivos selecionados pelo programa <i>PartitionFinder</i> . As partições foram utilizadas nas análises de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança e os modelos de substituição foram utilizados somente para a análise por Inferência Bayesiana.....	21
<b>Tabela 4.</b> Índices de diversidade: Tamanho do amplicon (pb), conteúdo GC, número de sítios variáveis (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) para cada gene mitocondrial, bem como para genes concatenados de amostras de <i>P. helleri</i> .....	26
<b>Tabela 5.</b> Análise de Variância Molecular (AMOVA) para dois níveis hierárquicos usando os três genes concatenados da espécie <i>P. helleri</i> .....	30
<b>Tabela 6.</b> Análise de Variância Molecular (AMOVA) para três níveis hierárquicos testando os agrupamentos inferidos pela árvore filogenética e pelo BAPS.....	38
<b>Tabela 7.</b> Índices de diversidade nucleotídica observados em amostras de <i>P. helleri</i> de diferentes regiões.....	40
<b>Tabela 8.</b> Estimativa de variação no tamanho efetivo das populações de <i>P. helleri</i> através dos testes de neutralidade $F_s$ de $F_u$ e $R_2$ .....	42
<b>Tabela 9.</b> Distribuição dos haplótipos nas localidades amostradas.....	72

## RESUMO

Meliponini é uma tribo de abelhas conhecidas popularmente como abelhas sem ferrão que possuem distribuição em áreas tropicais e subtropicais do globo, sendo mais diversificada nas regiões neotropicais e Indo-Malaia. No Brasil, estão descritos atualmente 29 gêneros e 244 espécies. Até o presente momento, poucos foram os estudos filogeográficos realizados com espécies da tribo. O gênero *Partamona* Schwarz, 1939 agrupa 33 espécies com ocorrência exclusiva na região Neotropical. A espécie *Partamona helleri* apresenta ampla distribuição ao longo de toda a Mata Atlântica e ainda em parte do Cerrado no estado de Minas Gerais, razão de sua escolha como organismo modelo. Este estudo teve por objetivo elucidar o padrão filogeográfico das populações da espécie ao longo de sua área de distribuição. Para tal, foram coletadas amostras de 347 ninhos em 67 localidades situadas desde o norte da Bahia até Santa Catarina. Foram analisados três fragmentos gênicos mitocondriais - COI, CytB e 12S - e as análises foram realizadas utilizando 339 sequências dos três genes concatenados. A reconstrução filogenética por Inferência Bayesiana (IB) apresentou várias linhagens em uma politomia pouco resolvida, o que comprometeu a verificação das relações filogenéticas entre os haplótipos. A rede haplotípica ilustrou as relações entre os 73 haplótipos identificados, sendo 64 deles exclusivos de localidade. A AMOVA mostrou que 91,7% da variação genética é resultado de diferenças interpopulacionais, indicando alta estruturação entre as populações. Foi verificada uma correlação baixa, porém significativa, entre distâncias genéticas e geográficas ( $r = 0,2487$ ;  $P < 0,0010$ ). A análise de estrutura populacional pelo método bayesiano implementada no software BAPS mostrou que a probabilidade posterior mais adequada para explicar a estruturação genética foi de cinco agrupamentos. Tal resultado foi, em parte, concordante com as linhagens estabelecidas na topologia obtida por IB e com os resultados observados na rede haplotípica. Os resultados mostraram que as populações ao norte da distribuição são bastante diferenciadas entre si e também das demais populações

observadas ao longo da parte central e sul. No entanto, não foi possível acessar como a variação genética dessas populações está organizada, podendo haver a divisão das mesmas em dois ou mais filogrupos. Quanto às demais populações, a existência de três possíveis filogrupos foi verificada, dois na região central e um terceiro ocupando as regiões Central e Sul. Os resultados obtidos para a história demográfica dos filogrupos não foram conclusivos, porém, é provável que o filogrupo que ocupa as regiões central e sul esteja em processo de expansão populacional. Foi ainda verificado que o nível de variação observada por filogrupo diminui no sentido norte/sul, o que permitiu que uma hipótese sobre origem e dispersão da espécie fosse proposta.

**Palavras-chave:** Abelhas sem ferrão, filogeografia, marcadores mitocondriais, Mata Atlântica.

## ABSTRACT

Meliponini is a tribe of bees popularly known as stingless bees that occurs in tropical and subtropical areas of the world, being more diversified in Neotropical and Indo-Malaya regions. Currently, 29 genus and 244 species are present in Brazil. Only a few phylogeographic studies were realized with species of this tribe. The genus *Partamona* Schwarz, 1939 clusters 33 species with exclusive occurrence in the Neotropical region. The species *Partamona helleri* presents wide distribution throughout Atlantic forest and part of the Cerrado from the State of Minas Gerais, reason of the choice of this species as our model organism. This study aimed to elucidate the phylogeographic pattern of *P. helleri* populations throughout its distribution area. For this purpose, samples of 347 nests from 67 localities situated from Northern Bahia to Santa Catarina were collected. Three mitochondrial genes fragments (COI, CytB and 12S) were analysed, which resulted in 339 concatenated sequences. The phylogenetic reconstruction by Bayesian Inference (IB) showed several lineages in a little resolved polytomy, what hampered the definition of the phylogenetic relationships among haplotypes. The haplotype network illustrated the relationship between 73 haplotypes identified, being 64 of them exclusive of localities. The AMOVA showed that 91.7% of the genetic variation is due to interpopulacional differences, indicating high structuring among populations. A low significant correlation between genetic and geographic distances was observed ( $r = 0,2487$ ;  $P < 0,0010$ ). The Bayesian population analysis implemented by BAPS showed that five groups were more suited to explain that genetic structuring. Such result was partly compliant with established lineages in the topology obtained by IB and with the results observed in the haplotype network. The results showed that the northern populations of *P. helleri* distribution are quite differentiated among themselves and also from the others populations observed along the central and southern regions. However, it was not possible to access how the genetic variation of the northern

populations is organized, and there may be a division in two or more phylogroups. For other populations, the existence of three possible phylogroups was verified, two in the central region and a third occupying the central and southern regions. The results obtained for the demographic history of these phylogroups were not conclusive, however, it is likely that the phylogroup occupying the central and southern regions is in an expansion process. It was also verified that the level of variation observed by phylogroup decreases towards north/south, which allowed to raise a hypothesis about the origin and dispersion of this species.

**Keywords:** Atlantic Forest, molecular markers, phylogeography, stingless bees.

## 1. INTRODUÇÃO

A filogeografia é definida como o estudo dos princípios e processos que determinam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas (Avice *et al.* 1987). Essa área de conhecimento lida com os arranjos espaciais de linhagens genéticas dentro e entre espécies relacionadas proximamente e tem por objetivo evidenciar a história evolutiva de uma linhagem, relacionando-a com sua distribuição geográfica (Avice 2009).

Esses estudos são realizados a partir de várias populações que se distribuem ao longo de uma paisagem e que podem ou não sofrer impedimentos físicos ou comportamentais para sua dispersão, tanto no presente como no passado. Em espécies com baixa capacidade de dispersão, por exemplo, as populações podem permanecer parcialmente isoladas devido à distância geográfica entre elas. Já barreiras físicas podem bloquear parcial ou completamente o fluxo gênico entre populações por consideráveis períodos de tempo. Nesse último caso, os padrões genealógicos dependeriam do tempo de duração dessas barreiras, bem como da história demográfica das populações disjuntas (Avice 2009).

Segundo Avice (2000), mediante a análise de árvores de genes mitocondriais, os diferentes padrões filogeográficos podem ser classificados em cinco categorias (Figura 1). São elas:

**Categoria I.** Refere-se a linhagens alopátricas com grande diferenciação genética entre elas, ou seja, à presença de diferentes grupos de haplótipos mitocondriais isolados geograficamente e diferenciados por grande número de mutações. Longas barreiras geográficas que impeçam o fluxo gênico é a explicação mais provável para esse padrão. Em espécies com ampla distribuição, baixa dispersão e baixo fluxo gênico, outra explicação para tal descontinuidade seria a extinção de haplótipos intermediários.

**Categoria II.** Normalmente, é observada em casos de grande diferenciação genética em que as principais linhagens estão co-distribuídas ao longo de uma ampla área geográfica. Esse

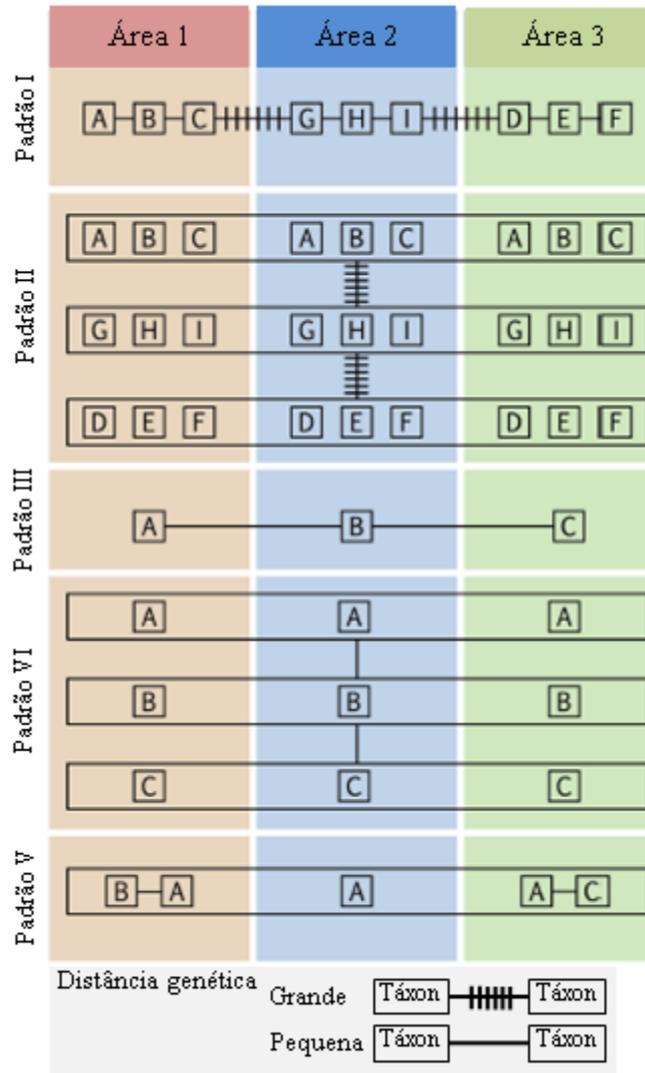
padrão pode ser observado em espécies com grande tamanho efetivo e altos níveis de fluxo gênico, onde diferentes linhagens podem ter sido mantidas ao acaso enquanto genótipos intermediários foram perdidos. A seleção balanceadora pode favorecer a continuidade dessas linhagens de haplótipos. Esse padrão também pode ser observado devido à presença de zonas de contato secundário entre populações ou espécies alopátricas que, devido ao desaparecimento de barreiras ao fluxo gênico, retomam a simpatria.

**Categoria III.** Caracteriza-se pela presença de linhagens proximamente relacionadas que ocupam diferentes regiões geográficas. Essas populações podem ter tido contato histórico recente e atualmente possuem baixo nível de fluxo gênico. Dessa forma, as novas mutações estariam limitadas aos grupos ao longo da distribuição da espécie.

**Categoria IV.** É um padrão esperado para populações que apresentam haplótipos proximamente relacionados e sem nenhum isolamento geográfico. Uma explicação para tal padrão seria a inexistência de barreiras à dispersão e alto nível de fluxo gênico entre as populações, o que limita o surgimento de grande divergência entre as linhagens.

**Categoria V.** Apresenta padrão intermediário entre as categorias III e IV. Envolve linhagens amplamente distribuídas e outras exclusivas e restritas em determinadas regiões geográficas. A principal explicação para tal padrão é o fluxo gênico contemporâneo baixo ou ausente em populações historicamente relacionadas. Haplótipos mais comuns são, muitas vezes, os estados mais ancestrais, enquanto que aqueles mais raros são os estados mais derivados.

Espécies que ocupam uma mesma região geográfica podem apresentar semelhantes padrões filogeográficos, o que leva ao surgimento de hipóteses sobre os eventos históricos que podem ter influenciado na atual composição da biodiversidade (Avice 2000). Além disso, comparações entre estudos filogeográficos de diferentes espécies têm revelado muito sobre a natureza demográfica e história da evolução intraespecífica (Avice 2009).



**Figura 1.** Representação das cinco categorias propostas por Avise (2000) para explicar diferentes padrões filogeográficos. Figura extraída de Martins & Domingues 2011.

A filogeografia possui grande importância para o desenvolvimento de estratégias de conservação, pois, mediante esses estudos, podem ser identificadas populações geneticamente diferenciadas que podem ser consideradas como unidades evolutivas (Avise 2000). Essas novas linhagens podem estar muito ameaçadas e, caso exista um padrão geral de distribuição geográfica entre elas, é possível ser feita a identificação de áreas geneticamente isoladas, o que pode orientar na formulação de estratégias e prioridades para a conservação (Moritz 2002).

### 1.1. O DNA mitocondrial como marcador molecular

O marcador molecular escolhido no início dos estudos filogeográficos com animais foi o DNA mitocondrial (mtDNA), uma vez que este possui características peculiares como a herança materna, ser haplóide, não sofrer recombinação, possuir alta taxa de evolução e ainda ser de fácil extração (Avice *et al.* 1987). Esse marcador tem sido empregado na inferência de padrões filogeográficos em diferentes espécies (Avice 2000).

O mtDNA é uma pequena molécula circular que contém 16 Kb, aproximadamente. Em células animais, ele é constituído de 37 genes, dos quais 22 são genes codificadores de RNAs transportadores, 13 codificam proteínas, e dois para subunidades ribossômicas, além de incluir uma região de controle onde é iniciada a replicação. O mtDNA possui também uma região não codificadora chamada D-loop em vertebrados e equinodermas ou região rica em A+T em invertebrados. Essa região parece exercer controle sobre a replicação e transcrição do mtDNA. Esse genoma é altamente compacto, raramente apresentando sequências espaçadoras, sequências repetitivas, pseudogenes ou introns. Além disso, o conteúdo gênico e a organização dos genes no genoma usualmente são bastante conservados.

Esse genoma apresenta herança materna, com raras exceções, o que evita que mutações acumuladas sejam confundidas por meio da recombinação, acumulando diferenças entre matrilineas que podem ser usadas para inferir genealogias de genes (Avice *et al.* 1987).

O mtDNA animal apresenta taxa de evolução mais alta do que a apresentada pelo genoma nuclear (Brown *et al.* 1979), podendo essa taxa chegar a ser 10 vezes maior em alguns genes (Brown *et al.* 1979; Vawter & Brown 1986). Na maioria das espécies animais, a rápida evolução é refletida na grande variação de sequências nucleotídicas observada no genoma mitocondrial (Avice 2009).

No entanto, o uso do marcador mitocondrial em estudos filogeográficos apresenta certas limitações (Ballard & Whitlock 2004), apesar da validade de tal marcador ser influenciada

pela estrutura das populações a serem analisadas. No caso das abelhas da tribo Meliponini, características como a limitada capacidade de dispersão (Araújo *et al.* 2004), a filopatria das fêmeas (Wille & Orozco 1975) e ainda o fato das colônias serem compostas principalmente por fêmeas fazem com que o DNA mitocondrial constitua um marcador adequado para um estudo sobre a história evolutiva do grupo, uma vez que a história das fêmeas, mais especificamente das rainhas, provavelmente determina o sucesso reprodutivo e a sobrevivência das populações. Apesar do marcador mitocondrial não abranger toda a história demográfica e evolutiva de uma espécie, ele tem se mostrado uma ferramenta útil no estudo de populações proximamente relacionadas (Gilbert *et al.* 2008, Alberdi *et al.* 2015, Miranda 2016).

## **1.2. Padrões filogeográficos na Mata Atlântica**

A Mata Atlântica se distribui por todo o leste do território brasileiro, leste do Paraguai e Misiones na Argentina, abrigando mais de 60% das espécies terrestres do planeta (Galindo-Leal & Câmara 2005). Originalmente, sua extensão era de 1.360.000 km<sup>2</sup> com distribuição em 17 estados brasileiros (MMA 2002). Ela abriga altos índices de biodiversidade e é um dos biomas com maior grau de degradação do planeta, sendo reconhecido com um dos 25 *hotspots* de biodiversidade (Myers *et al.* 2000). Ribeiro *et al.* (2009) estimaram que atualmente a Mata Atlântica encontra-se reduzida entre 11,4% a 16% de sua extensão original.

Estudos filogeográficos realizados com espécies da Mata Atlântica indicam descontinuidades filogeográficas recorrentes para diferentes grupos, sendo a teoria de refúgios florestais uma importante hipótese sobre diversificação utilizada para explicar tais descontinuidades (Batalha-Filho & Miyaki 2011). No entanto, estudos sobre a diversificação das espécies nesse bioma ainda são escassos, não existindo uma concordância sobre os mecanismos gerais que originaram sua biodiversidade (Thomé *et al.* 2010).

A teoria de refúgios florestais foi proposta por Haffer (1969), Vanzolini & Williams (1970) e Brown & Ab'Saber (1979). Segundo essa teoria, durante os períodos glaciais nos quais predominavam clima seco e baixas temperaturas, os refúgios eram áreas de floresta tropical onde temperatura e umidade eram mantidas (Whitmore & Prance 1987, Ab'Sáber 1990). Durante esses períodos secos, havia expansão das savanas e retração das florestas úmidas que ficavam restritas a regiões periféricas (Raven & Axelrod 1974, Silva & Bates 2002, Roig-Juñent *et al.* 2006); já quando temperaturas mais elevadas predominavam, as savanas se retraíam, enquanto as florestas tropicais se expandiam (Langenheim *et al.* 1973). Espécies mais dependentes dos ambientes florestados teriam acompanhado a expansão e retração dos refúgios durante o Pleistoceno (Haffer 1969, Vanzolini & Williams 1970, Brown & Ab'Saber 1979) e essas drásticas mudanças de vegetação e clima ocorridas durante o Pleistoceno teriam levado à diversificação da fauna local. A existência, tamanho e localização desses refúgios dependeriam da tolerância ambiental e ecológica das espécies (Moritz *et al.* 2000).

De acordo com registros paleopalínológicos, o último máximo glacial na Mata Atlântica ocorreu entre 18 e 48 mil anos A.P. (Behling & Pillar 2007). Durante esse período, houve uma expansão das áreas abertas desde o sul até o sudeste brasileiro, entre as latitudes 28°/27° S a 20° S (Behling & Lichte 1997, Behling 2002).

Carnaval & Moritz (2008) realizaram um estudo de modelagem paleoclimática do último máximo glacial ocorrido na Mata Atlântica e os resultados apontaram a existência de dois possíveis refúgios pleistocênicos no bioma, um menor ao norte do rio São Francisco (refúgio Pernambuco) e outro maior, localizado no corredor central da Mata Atlântica ao norte do Rio Doce (refúgio Bahia). Esse mesmo estudo ainda apontou a possível existência de uma região de floresta instável no estado de São Paulo durante o final do Pleistoceno.

Cabanne *et al.* (2008), em um estudo filogeográfico com a espécie de ave *Xiphorhynchus fuscus* endêmica da Mata Atlântica, encontraram resultados que apontaram para a teoria dos refúgios florestais como possível explicação de grande parte da divergência observada na espécie. Em outro estudo realizado com a espécie de ave da Mata Atlântica, *Sclerurus scansor*, foi observado um padrão geográfico da variação genética intrapopulacional compatível com o proposto pela hipótese de refúgios (d'Horta *et al.* 2011). Carnaval *et al.* (2009) também encontraram resultados concordantes com tais refúgios florestais em três espécies de sapos. Além disso, em uma das espécies estudadas, esses autores encontraram resultados que apontam para a existência de um terceiro refúgio localizado no estado de São Paulo (refúgio São Paulo). Ademais, um estudo realizado com a abelha sem ferrão *Schwarziana quadripunctata* apontou a existência de estruturação das populações em quatro filogrupos, podendo tal estruturação ser explicada pelas mudanças climáticas durante as glaciações ocorridas no Pleistoceno (Luz 2011). Ao que os dados indicam, a história evolutiva da Mata Atlântica foi fortemente influenciada por esses máximos glaciais ocorridos no Pleistoceno (Batalha-Filho & Miyaki, 2014).

A hipótese de diversificação por neo-tectonismo de placas também é utilizada para explicar discontinuidades filogeográficas observadas na Mata Atlântica (Batalha-Filho e Miyaki 2011). Segundo essa hipótese, uma falha denominada de Lineamento de Guapiara, localizada na região do Vale do Ribeira do Iguape (Saadi *et al.* 2002), teve sua atividade tectônica contínua durante todo o Quaternário, levando a deformações de terraço na região do vale (Saadi *et al.* 2002, Melo *et al.* 1989). Segundo Pereira & Almeida (1996), essas falhas geológicas podem ter causado alterações na biota florestal, originando barreiras geográficas que desencadearam eventos vicariantes sobre as espécies.

Utilizando a espécie de abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata*, Batalha-Filho *et al.* (2010) recorreram à hipótese de diversificação por neo-tectonismo para explicar uma

descontinuidade filogeográfica localizada próximo ao Vale do Ribeira do Iguape, no sul do estado de São Paulo, separando as populações nos clados Sul e Norte. Thomé *et al.* (2010) também utilizaram tal hipótese para explicar os resultados encontrados em estudo realizado com um grupo de sapos da espécie *Rhinella crucifer*, endêmico da Mata Atlântica.

A distribuição das espécies na Mata Atlântica ainda pode ser delimitada pela presença de bacias hidrográficas ou cadeias de montanhas; no entanto, poucos estudos têm mostrado tais eventos como causadores da diversificação neste bioma (Thomé *et al.* 2010). Um estudo com lagartos da espécie *Gymnodactylus darwinii* apontou o padrão geral de estrutura genética dos principais clados como sendo concordante com a presença do rio Doce e outros rios da Mata Atlântica, que atuaram como barreiras primárias ao fluxo gênico (Pellegrino *et al.* 2005).

Resende *et al.* (2010) observaram um padrão filogeográfico para a espécie de formiga *Dinoponera lucida* que parece ter sido moldado em diferentes tempos geológicos e por diferentes eventos climáticos e geológicos. Nesse estudo, os autores observaram dois eventos geológicos associados aos rios Doce e Mucuri, ocorridos no Plioceno médio e no início do Pleistoceno, respectivamente, e ainda um terceiro evento de alterações climáticas ocorridas ao final do Pleistoceno que levou a uma drástica redução do tamanho efetivo populacional da espécie.

Há ainda um estudo que revelou estabilidade demográfica durante o último máximo glacial em populações de Mata Atlântica da ave *Basileuterus leucoblepharus*, pois, por ser mais generalista, a espécie teria conseguido atravessar possíveis barreiras, mantendo o fluxo gênico entre as subpopulações (Batalha-Filho *et al.* 2012). O estudo realizado por Cabanne *et al.* (2013) com a espécie de ave *Schiffornis virescens* também apontou estabilidade demográfica durante o último máximo glacial. Esse padrão de baixa estrutura genética é

esperado para as espécies com alto fluxo gênico entre populações e com baixa sensibilidade aos eventos de fragmentação da floresta (Cabanne *et al.* 2013).

Na Mata Atlântica parece existir uma série de padrões e processos de diversificação que, provavelmente, podem estar relacionados com as peculiaridades de cada organismo, como dependências ecológicas e as necessidades de hábitat, o que revela que as barreiras históricas ao fluxo gênico não influenciaram da mesma forma as espécies estudadas (Batalha-Filho *et al.* 2012). De acordo com este autor, esses fatos sugerem a necessidade de realização de outros estudos filogeográficos com diferentes espécies, permitindo que possam ser detectados novos padrões que ajudem a estabelecer melhor os mecanismos que promoveram a diversificação na biota da Mata Atlântica.

Até o presente momento, poucos estudos filogeográficos foram realizados em abelhas (p. ex. Diniz-Filho *et al.* 1999, Soucy e Danforth 2002, Dick *et al.* 2004), sendo apenas três com espécies da tribo Meliponini (Batalha-Filho *et al.* 2010; Luz 2011; Miranda 2016), das quais apenas duas espécies apresentam distribuição ao longo da Mata Atlântica (Batalha-Filho *et al.* 2010; Luz 2011).

### **1.3. Espécie modelo: *Partamona helleri***

A ordem Hymenoptera é constituída por 125.000 espécies descritas, sendo as formigas, vespas e abelhas os grupos mais conhecidos da ordem. Esses insetos possuem a tendência de formar comunidades sociais polimórficas e, juntamente com os cupins, perfazem aproximadamente 80% da biomassa da Terra (Brusca & Brusca 2007).

Dentre as abelhas, a família Apidae é a mais diversa e seus espécimes possuem padrões de comportamentos que variam desde insetos solitários a colônias altamente sociais. Essa família está subdividida em três subfamílias: Xylocopinae, Nomadinae e Apinae, sendo a

tribo Meliponini representante da última (Michener 2007). Os meliponíneos possuem acúleo atrofiado e são popularmente conhecidos como abelhas sem ferrão (Nogueira-Neto 1997).

As abelhas sem ferrão possuem distribuição em áreas tropicais e subtropicais do globo, sendo mais diversificada nas regiões neotropicais e Indo-Malaia. Atualmente são descritos no Brasil 29 gêneros e 244 espécies (Pedro 2014).

As abelhas possuem fundamental importância no processo de polinização e produção de sementes dentro do ecossistema de determinada região que integram (Kerr *et al.* 1996). Elas são responsáveis pela manutenção da flora e, conseqüentemente, da fauna associada a essa flora (Kerr *et al.* 2001), o que constitui uma preocupação de se preservar esses insetos. A depender do habitat, as abelhas brasileiras sem ferrão chegam a ser responsáveis por cerca de 30% a 80% da polinização de plantas nativas (Kerr *et al.* 2001). No entanto, grandes alterações e fragmentação do habitat, além de outras causas como o uso de agrotóxicos, competição com espécies invasoras e alterações no clima tem levado ao declínio das populações de abelhas (Thomson 2004; Whitehorn *et al.* 2012; Tylianakis 2013).

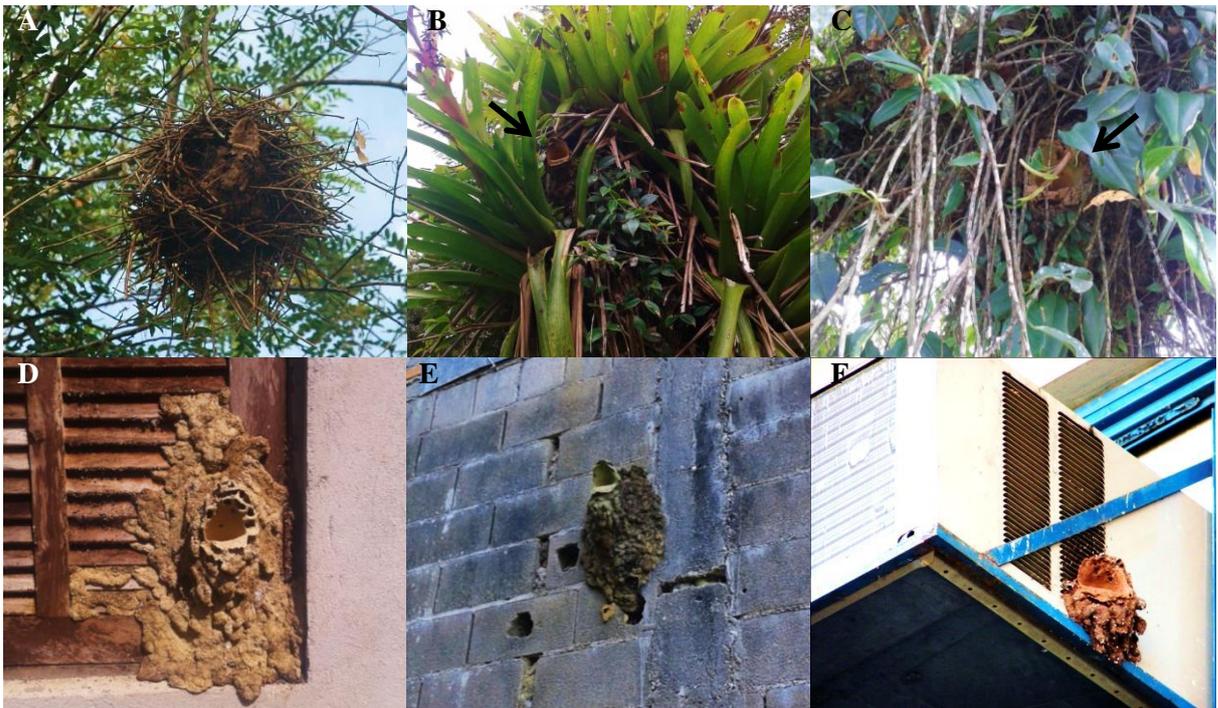
O gênero *Partamona* Schwarz, 1939 está incluído na tribo Meliponini, agrupando atualmente 33 espécies descritas. A ocorrência do gênero é exclusivamente Neotropical, desde o sul do território brasileiro até o México, em locais como matas, caatingas, cerrados e regiões montanhosas, como as Cordilheiras Centro-Americana e Andina, podendo chegar a regiões com mais de 2.000 metros de altitude. As espécies desse gênero constroem ninhos com ornamentações de entrada bem elaboradas e com formas bastante variadas. A nidificação é feita em cavidades pré-existentes, sendo que a maioria nidifica obrigatoriamente em termiteiros ativos ou inativos (Pedro & Camargo 2003, Camargo & Pedro 2003). Novas rainhas da espécie de *Partamona* têm baixa capacidade de dispersão e apresentam comportamento filopátrico durante o processo de fundação de novos ninhos, sendo os ninhos

filhos construídos próximo ao ninho mãe, havendo uma dependência temporária entre o novo ninho e o ninho materno (Wille & Orozco 1975).

De acordo com a filogenia proposta para o gênero, *Partamona* tem cinco clados, sendo eles *bilineata/epiphytophila*, *pearsoni*, *testacea*, *nigrior* e *cupira* (Camargo & Pedro 2003). O primeiro estudo filogenético foi realizado com base em características morfológicas (Pedro & Camargo 2003); no entanto, a grande similaridade morfológica entre as espécies prejudicava a definição destas relações. Um segundo estudo incluiu na análise informações sobre hábitos de nidificação e estrutura de entrada dos ninhos das espécies (Camargo & Pedro 2003). Esse novo trabalho possibilitou uma melhor definição de alguns grupos em relação à hipótese inicial, porém, não definiu de forma precisa as relações entre os grupos. No primeiro estudo filogenético, a espécie *Partamona helleri* foi incluída no clado *cupira*. Já no segundo estudo, foi levantada a hipótese de que *P. helleri* poderia constituir um grupo basal, irmão de todas as demais espécies termitófilas do gênero, isso considerando que essa espécie não constrói seus ninhos em associação com termiteiros. *P. helleri* nidifica em uma ampla variedade de substratos, como em ocos de árvores, ninhos abandonados de *Phacellodomus* sp., – ave popularmente conhecida como João-graveto – e em associações com raízes de epífitas, ou até mesmo em ninhos livres apoiados em galhos de árvores. Essa espécie também nidifica em áreas sob influência antrópica, construindo seus ninhos em beirais e cumeeiras de casas, no interior de condicionadores de ar, em máquinas abandonadas, vasos de plantas e frestas de paredes (Camargo & Pedro 2003, Pedro & Camargo 2003) (Figura 2). Um exemplar da espécie *P. helleri* pode ser visualizado na Figura 3.

A distribuição geográfica de *P. helleri* se dá ao longo de grande parte da Mata Atlântica, desde o nordeste de Santa Catarina até a Bahia, na região de Salvador; ocorre também no cerrado de Minas Gerais, chegando a oeste até o vale do São Francisco (Pedro & Camargo 2003).

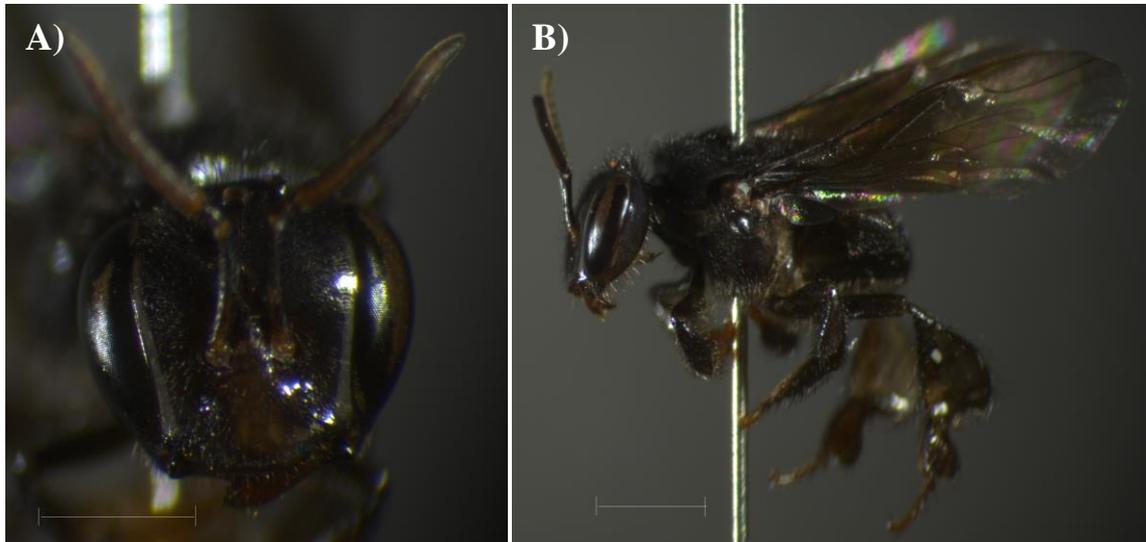
As abelhas dependem de condições ambientais específicas para sobreviver, tais como materiais e locais apropriados para a construção de seus ninhos e recursos alimentares que podem ser distintos para as formas jovens e adultas (Silveira *et al.* 2002). A disponibilidade e a competição por esses recursos são determinantes para a presença de uma espécie em determinado local (Cane 2001).



**Figura 2.** Ninhos de *P. helleri* construídos sobre diferentes substratos. **A)** Em ninho do pássaro João-graveto (Foto: Miranda EA); **B)** Bromélia epífita; **C)** Tronco de árvore; **D)** Janela de casa abandonada; **E)** Parede de casa habitada; **F)** Condicionador de ar (Extraída de Ferreira 2011).

Devido ao processo acelerado de urbanização e à degradação ambiental, algumas espécies de abelhas encontraram nos ambientes urbanos locais propícios para nidificação e obtenção de alimentos. Nas áreas urbanas, abelhas generalistas, ao contrário das especialistas, possuem maior chance de sobrevivência, já que são menos sensíveis às perturbações ambientais e não encontram nos centros urbanos limitações quanto à capacidade de dispersão e obtenção de recursos (Zanette *et al.* 2004, Nates-Parra 2005). Segundo Pedro & Camargo

(2003), algumas abelhas toleram bem ambientes modificados pela ação humana, como é o caso de *P. helleri*.



**Figura 3.** Vista frontal (A) e lateral (B) de uma operária da espécie *P. helleri*. A barra de escala corresponde a 1 mm. Foto: Dessi MC (LGEH).

Diante disso, verifica-se que *P. helleri* é uma abelha com ampla distribuição, com capacidade de colonizar áreas abertas e fechadas sob diferentes temperaturas; além disso, não apresenta limitações quanto aos locais de nidificação. Graças a esta plasticidade, ela está presente em ambientes urbanos, não sendo uma espécie totalmente dependente de florestas. Devido a essas características, a espécie foi escolhida no presente trabalho para um estudo filogeográfico, de modo a traçar um cenário para a evolução recente dessa espécie, averiguando os processos envolvidos no padrão de distribuição geográfica atual da mesma. Acreditamos que, devido a tais características, possíveis quebras filogenéticas sejam resultados da dispersão e de fatores históricos de ocupação e não devido a grandes barreiras físicas ao fluxo gênico entre as populações.

## 2. OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi elucidar o padrão filogeográfico das populações da espécie *P. helleri*.

Para cumprir tal objetivo, fêmeas adultas de ninhos amostrados em toda a área da distribuição da espécie tiveram três de seus genes mitocondriais sequenciados. A partir destes dados, os seguintes passos foram executados:

- i) Estabelecimento das relações filogenéticas entre as linhagens caracterizadas pelas sequências gênicas;
- ii) Verificação da associação entre as linhagens e as áreas geográficas onde as mesmas foram observadas;
- iii) Inferência sobre a história demográfica dos grupos de populações de *P. helleri*;
- iv) Elaboração de uma hipótese sobre origem e dispersão da espécie.

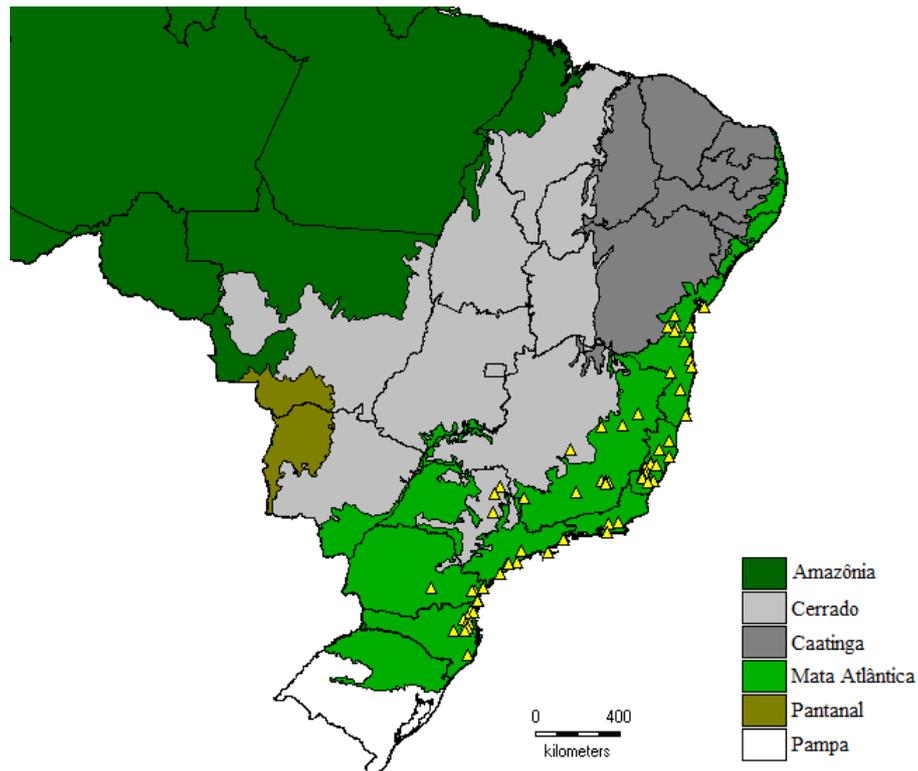
### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Obtenção dos espécimes**

Uma parte do material utilizado nesse estudo já se encontrava disponível no Laboratório de Genética Evolutiva de Hymenoptera (LEGH) – UFSCar, decorrente de coletas anteriores para concretização de trabalhos já realizados no laboratório. Este material fora proveniente de 32 localidades distribuídas pelos estados da Bahia (BA), Espírito Santo (ES), São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ), Minas Gerais (MG), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC). Entre os meses de Agosto e Setembro de 2015, foram realizados novos esforços de coleta em 27 localidades distribuídas pelos estados do Espírito Santo (ES), São Paulo (SP), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC). Em Janeiro de 2016, foram coletados 15 novos ninhos de nove localidades, sete ao sul do estado da Bahia e duas ao norte de Minas Gerais. Ao todo, foram coletadas amostras de 347 ninhos em 67 localidades (a cidade de Guaraqueçaba/PA foi amostrada duas vezes) (Figura 4; Tabela 2).

Os novos pontos de coleta foram estabelecidos com base na procedência dos espécimes depositados nos Museus da USP-RP (Coleção “Camargo”) e da UFPR (Coleção “Moure”).

As coletas foram realizadas por busca ativa, com esforços de, no mínimo, 12 horas por sítio visitado. Os ninhos foram georreferenciados e fotodocumentados. Foram coletadas entre 10 e 15 operárias adultas de cada colônia e sacrificadas em etanol 95% em tubos de 50 ml etiquetados. Posteriormente, os espécimes foram estocados em etanol absoluto e armazenados a -20°C. Cerca de 5 a 6 espécimes de cada ninho foram coletados em tubos de 1,5 ml etiquetados, sacrificados em acetato de etila e montados para confirmação taxonômica pela Dra. Sílvia Regina Pedro (FFCLRP-USP).



**Figura 4.** Mapa evidenciado as 67 localidades amostradas para *P. helleri* e sua distribuição na Mata Atlântica e áreas de transição entre Mata Atlântica e Cerrado. O mapa foi gerado pelo programa Diva-Gis (<http://www.diva-gis.org/>).

### 3.2. Obtenção de dados genéticos mitocondriais

De cada colônia coletada foi extraído o DNA total de uma operária adulta. A princípio, a extração de DNA foi realizada a partir de três pernas das operárias, utilizando o método de Chelex 100 (Walsh *et al.* 1991). Posteriormente, para a obtenção de resultados mais satisfatórios, a extração foi feita a partir de tórax, por meio do protocolo de fenol-clorofórmio (Sheppard & McPherson 1991).

Regiões correspondentes aos genes mitocondriais Citocromo B (CytB), Citocromo Oxidase I (COI) e rDNA12S foram amplificadas a partir de *primers* descritos para *Apis mellifera* (Afonso 2012, Crozier *et al.* 1991, Dick *et al.* 2004, Simon *et al.* 1994) e os amplicons obtidos foram sequenciados. As sequências dos pares de oligos utilizados estão apresentadas na Tabela 1.

A amplificação dos três fragmentos gênicos foi feita por PCR, com um passo inicial de 94°C por três minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 20 segundos e 72°C por 1 minuto - e um passo final a 72°C por 10 minutos. As reações foram feitas com volume final de 25 µL contendo água bidestilada estéril, 1X tampão de reação, 250 µM de cada dNTP, 2,5 mM de cloreto de magnésio, 1 µM de cada primer, 1U de Taq DNA polimerase (Promega) e 1 µL do DNA extraído. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 1% corados com Gel Red<sup>TM</sup> e submetidos à luz ultra-violeta.

**Tabela 1.** Sequência dos primers utilizados para amplificação por PCR.

<b>Região</b>	<b>Primer</b>	<b>Referência</b>
<b>COI</b>	F: 5' - GGA GAT CCA ATT CTT TAT CAA C - 3' R: 5' - GAT ATT AAT CCT AAA AAA TGT TGA GG - 3'	Afonso 2012, Dick <i>et al.</i> 2004
<b>CytB</b>	F: 5' - TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC - 3' R: 5' - ATT ACA CCT CCT AAT TAA TTA GGA AT - 3'	Crozier <i>et al.</i> 1991
<b>12S</b>	F: 5' - TAC TAT GTT ACG ACT TAT - 3' R: 5' - AAA CTA GGA TTA GAT ACC C - 3'	Simon <i>et al.</i> 1994

A purificação dos amplicons foi feita a partir de 5µL do DNA e 2µL de Illustra<sup>TM</sup> ExoProStar<sup>TM</sup> 1-Step (GE). A purificação foi feita em passo inicial de 37°C por 40 minutos, 80°C por 15 minutos e 20°C por cinco minutos. A visualização dos fragmentos amplificados e purificados foi através de gel de agarose 1% corado com Gel Red<sup>TM</sup> e submetidos à luz ultra-violeta.

A reação de sequenciamento foi realizada em nosso laboratório. Nesse processo, foram utilizados 1µL do produto de PCR purificado, 3µL de tampão de sequenciamento (Save Money 2,5 X), 1µL de BigDye v3.1 (Applied Biosystems), 1µM de cada *primer* e 4,6µL de água bidestilada estéril completando 10µL de reação final. A reação consistiu de um passo inicial de 96°C por um minuto e 40 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e

60°C por um minuto. Ao fim das reações, foram adicionados 80µL de isopropanol 75%. Após 15 minutos à temperatura ambiente, os tubos de reação foram centrifugados por 30 minutos a 3040 xg. Após precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e foram realizadas duas lavagens, adicionando-se 200µL de etanol 70% gelado, seguido por centrifugação a 3040 xg por 10 minutos a 4°C.

As sequências *forward* e *reverse* foram obtidas após corrida das amostras em sequenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems) junto ao Laboratório de Biotecnologia da FCAV – UNESP de Jaboticabal, SP.

Trabalhos anteriores realizados no LGEH resultaram em 135 indivíduos sequenciados para os genes mitocondriais COI e CytB. Esses resultados foram somados aos resultados obtidos durante o andamento desse estudo. No presente estudo, foram sequenciados 212 indivíduos para o gene COI, 204 para o gene CytB e 344 indivíduos para o gene 12S. O número total de indivíduos analisados por gene é detalhado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Localidades amostradas para a espécie *P. helleri*, sigla de cada localidade, número de colônias amostradas por localidade e número de colônias analisadas para os três genes mitocondriais (COI, CytB e 12S).

Localidades	Sigla	Nº de Colônias	Nº de col. analisadas por gene		
			COI	CytB	12S
01 Salvador – BA	SAL	09	09	09	09
02 Camamu – BA	CMU	01	01	01	01
03 Cravolândia – BA	CRA	05	05	05	05
04 Jequié – BA	JEQ	04	04	03*	04
05 Jitaúna – BA	JIT	02	02	-	02
06 Apuarema – BA	APU	01	01	01	01
07 Ubatã – BA	UBA	01	01	01	01
08 Uruçuca – BA	URU	02	02	02	02
09 Una – BA	UMA	01	01	01	01
10 Canavieiras – BA	CNV	02	02	02	02
11 Itapevi – BA	ITP	02	02	02	02
12 Porto Seguro – BA	PSE	03	03	03	03
13 Caravelas – BA	CAR	02	02	02	02

**Tabela 2.** Continuação.

14	Maricá – RJ	MAR	04	04	04	04
15	Petrópolis – RJ	PET	02	02	-	-
16	Aldeia Velha – RJ	ALV	01	01	01	01
17	Paratí – RJ	PAR	01	01	01	01
18	Cachoeira do Macacu – RJ	CAM	01	01	01	01
19	São Sebastião – SP	SSE	01	01	01	01
20	São Paulo/USP – SP	USP	11	11	11	11
21	Ribeirão Preto/USP – SP	URP	17	17	17	17
22	São Carlos/UFSCar – SP	UFS	24	24	24	24
23	Iguape – SP	IGP	10	10	10	10
24	Itanhaém – SP	ITN	10	10	10	10
25	Itariri – SP	ITRR	10	10	10	10
26	Pedro de Toledo – SP	PDT	03	03	03	03
27	Batatais – SP	BAT	01	01	01	01
28	Muzambinho – MG	MUZ	12	12	12	12
29	Rio Vermelho – MG	RIV	08	08	08	08
30	Itambacuri – MG	ITB	01	01	01	01
31	Carlos Chagas – MG	CCH	01	01	01	01
32	Paraopeba – MG	PPB	03	03	03	03
33	Porto Firme – MG	POR	08	08	08	08
34	Viçosa – MG	VIC	35	35	35	35
35	Silvestre – MG	SIL	04	04	04	04
36	Teixeiras – MG	TEI	05	05	05	05
37	São Miguel do Anta – MG	SMA	17	17	17	17
38	Tiradentes – MG	TIR	03	03	03	03
39	Governador Lindenberg - ES	GVL	05	05	05	05
40	Jaguareé – ES	JAG	01	01	01	01
41	Vargem Alta – ES	VAL	10	10	10	10
42	Venda Nova do Imigrante - ES	VNO	09	09	09	09
43	Castelo – ES	CAS	06	06	06	06
44	Itaguaçu – ES	ITG	06	06	06	06
45	Itarana – ES	ITR	10	10	10	10
46	Santa Tereza – ES	STE	09	09	09	09
47	Conceição do Castelo – ES	CCA	07	07	07	07
48	Afonso Cláudio – ES	AFC	02	02	02	02
49	Alfredo Chaves – ES	ALF	01	01	01	01
50	Linhares – ES	LIN	05	05	05	05
51	Guaraqueçaba – PR	GUA	06	06	06	06
52	Telêmaco Borba – PR	TLM	03	03	03	03
53	Matinhos – PR	MAT	03	03	03	03
54	Antonina – PR	ANT	08	08	08	08
55	Guaratuba – PR	GRT	03	03	03	03
56	Morretes – PR	MOR	01	01	01	01
57	Rio do Sul – SC	SIG	04	04	03*	03*

**Tabela 2.** Continuação.

58	Armazém – SC	ARM	02	02	01*	02
59	Florianópolis – SC	FLO	01	01	-	01
60	Botuverá – SC	BTV	01	01	01	01
61	Joinville – SC	JOI	10	10	10	10
62	Pomerode – SC	POM	01	01	01	01
63	Guabiruba – SC	GBR	01	01	01	01
64	Blumenau – SC	BLU	01	01	01	01
65	Massaranduba – SC	MSS	01	01	01	01
66	Araquari – SC	ARQ	01	01	01	01
67	Gaspar – SC	GAS	01	01	01	01
			<b>N=347</b>	<b>N=347</b>	<b>N=339</b>	<b>N=344</b>

\* Nem todas as colônias tiveram um indivíduo sequenciado.

- Nenhum indivíduo da(s) colônia(s) foi sequenciado.

### 3.3. Edição, análise e caracterização das sequências nucleotídicas

Os eletroferogramas foram analisados utilizando a versão 5.0.1 do programa CodonCode (CodonCode, Dedham, MA, USA). Após edição, as sequências foram alinhadas utilizando a ferramenta *CLUSTAL W* (Thompson *et al.* 1994). Os alinhamentos foram editados no programa BioEdit (Hall 1999).

A ferramenta BLAST (Altschul *et al.* 1990) foi utilizada para identificar similaridades entre sequências obtidas e sequências disponíveis em bancos de dados similares ao GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

O polimorfismo intraespecífico foi estimado pelos índices conteúdo de GC, número de sítios variáveis (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (HD) (Nei 1987) e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) (Nei & Miller 1990), com a utilização do programa DNASP versão 5.10 (Librado & Rozas 2009).

### 3.4. Inferências filogenéticas

Foram realizadas reconstruções filogenéticas utilizando os haplótipos dos segmentos gênicos mitocondriais concatenados, a partir de análises de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB).

Através do software *PartitionFinder* (Lanfear *et al.* 2012), utilizando-se o critério de seleção Akaike Information Criterion (AIC), foram definidas partições para o conjunto de dados e os seus respectivos modelos de substituição foram estimados (Tabela 3). Além disso, os dados foram particionados por gene (12S, CytB e COI) e por posição de códon (apenas para os genes COI e CytB). Para a análise de MV, apenas as partições foram utilizadas.

**Tabela 3.** Partições e modelos evolutivos selecionados pelo programa *PartitionFinder*. As partições foram utilizadas nas análises de IB e MV e os modelos de substituição foram utilizados somente para a análise por IB.

<b>Partições</b>	<b>Modelo p/ análise IB</b>
<b>12S</b>	TrN + I
<b>CytB_1</b>	HKY + I + G
<b>CytB_2 , COI_2</b>	HKY + I
<b>CytB_3 , COI_3</b>	GTR + G
<b>COI_1</b>	TrN + I

A análise de MV foi realizada usando o RAxML (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) (Stamatakis 2006), sob o modelo GTRCAT. Foram estimados sítios invariáveis e distribuição gama para cada partição durante a corrida. O RAxML implementa um algoritmo de buscas heurísticas com pseudo-réplicas de bootstrap. O suporte de nó foi estimado em 10000 réplicas de bootstrap.

A análise Bayesiana foi feita no programa Mr. Bayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001), utilizando análises de cadeias de MCMC, com duas corridas independentes, sendo cada uma delas com quatro cadeias amostradas a cada 1000 gerações em um total de 200 milhões de gerações. Mediante o programa Tracer 1.5 (Rambaut & Drummond 2009), foram acessados a convergência e o ponto de corte (*burn-in*). Após descartar o ponto de corte de 10%, foi calculado o consenso *majority-rule* a partir da amostragem das análises subsequentes.

As árvores pelos métodos de MV e IB foram editadas utilizando o programa FigTree 1.4.2 (Rambaut 2014).

### **3.5. Estrutura genética populacional e filogeográfica**

Para verificar a estrutura populacional foi realizada a Análise de Variância Molecular (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992) para dois níveis hierárquicos, sendo possível averiguar a distribuição da variação dentro e entre populações. A análise foi implementada utilizando o programa *Arlequin* 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010), com significância de 5% e 1000 permutações.

Para verificar a existência de correlação entre distâncias genética e geográfica das populações e testar o isolamento por distância, foi realizado o teste de Mantel implementado no programa Isolation by Distance Web Service 3.23 (IBDWS) (Jensen *et al.* 2005). A significância estatística foi feita com um teste de 1000 permutações.

Para inferir as relações genealógicas entre os haplótipos, redes haplotípicas foram obtidas utilizando o método *Median-joining network*. A análise foi implementada no software *Network* 4.6.1.3. O algoritmo para construção da rede se baseia no critério de redes com mínima abrangência (*minimum spanning network*) e utiliza *median vectors* (mv) para conectar dados de haplótipos mediante o método de máxima parcimônia.

A fim de verificar a distribuição espacial da variabilidade genética nas populações foi realizada a Análise de Variância Molecular Espacial (SAMOVA), implementada pelo programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.* 2002). Tal análise infere a existência de grupos genéticos entre localidades geograficamente homogêneas, porém diferenciadas geneticamente. A análise foi computada variando o número de grupos a serem testados (K) e o agrupamento que recupera a maior estrutura genética entre localidades é o que apresenta

maior valor de índice de fixação  $\Phi_{ST}$ , sendo, portanto o K mais provável. Foram testadas 1000 simulações para cada valor de K.

A verificação da estruturação das populações em grupos também foi realizada através do método bayesiano pelo programa BAPS (*Bayesian Analysis of Genetic Population Structure*) versão 4.14 (Corander *et al.* 2003).

### **3.6. Inferência demográfica**

Foram realizados testes de neutralidade pelo método  $R_2$  (Ramos-Onsins & Rozas 2002), e estimativa do parâmetro  $F_s$  de Fu (Fu 1997). Esses testes foram utilizados a fim de verificar a possível ocorrência de expansão demográfica ou gargalos populacionais. As análises foram implementadas pelo programa DnaSP 5.10 (Librado & Rozas 2009). A significância dos testes foi obtida após 1000 simulações de coalescência.

Quando possível, foi construída a demografia histórica da linhagem filogenética a partir de *Coalescent Bayesian Skyline Plot* (BSP), implementada no programa BEAST 1.8 (Heled & Drummond 2010). A corrida foi implementada pressupondo um relógio molecular estrito e um comprimento de cadeias de MCMC de 80 e 200 milhões (dependendo do conjunto de dados), amostrando a cada 1000 gerações. Para essa análise, foram utilizados os fragmentos gênicos COI e CytB e uma taxa de divergência para o gene mitocondrial COI proposta para insetos, que varia entre 1,3-1,9% por milhão de ano (Machado *et al.* 2001, Moreau *et al.* 2006). O modelo de substituição utilizado na abordagem Bayesiana foi selecionado com base no programa JModeltest versão 2.1.5 (Darriba *et al.* 2012), com critérios de informação Akaike (AIC). Os modelos utilizados foram TrN+I e GTR+I. O programa BEAUTi 1.8 (Heled & Drummond 2010) foi utilizado para elaborar o input data do BEAST. A qualidade da corrida e a construção do gráfico da análise de coalescência foi verificada através do programa Tracer 1.5 (Rambaut & Drummond 2009).

## 4. RESULTADOS

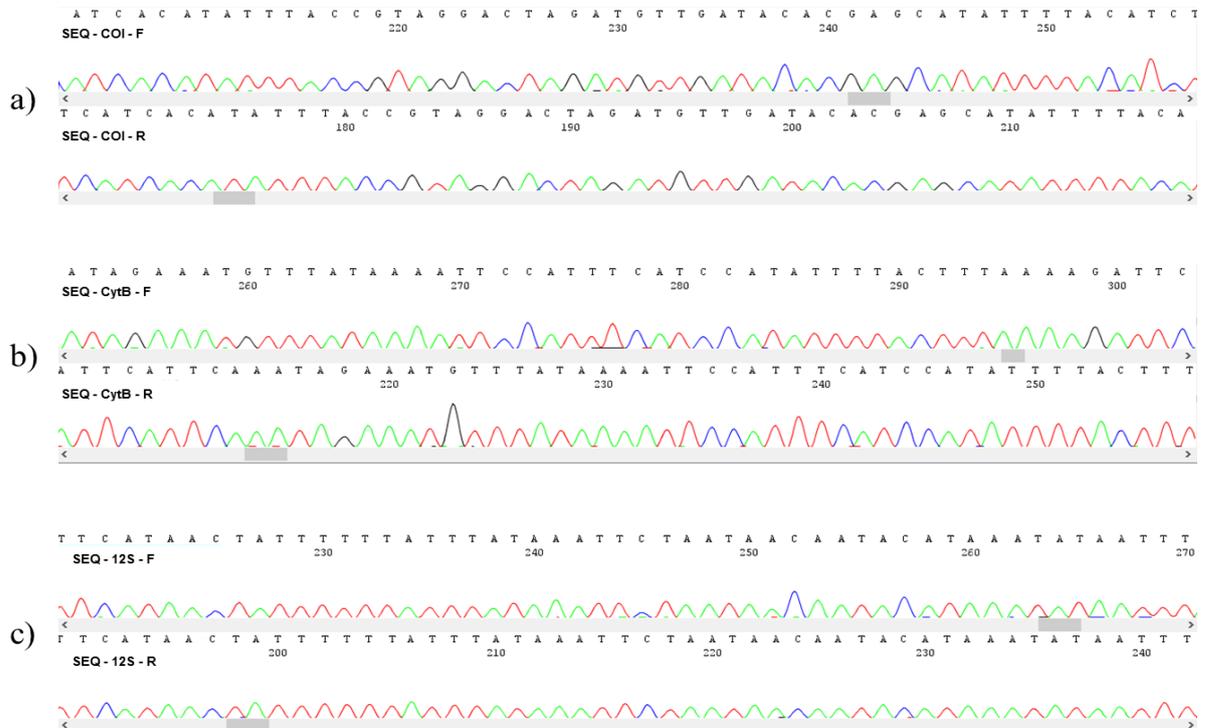
### 4.1. Caracterização das sequências

Foram amplificados e sequenciados fragmentos dos genes mitocondriais COI (611 pb), CytB (485 pb) e 12S (412 pb). Todas as amostras foram amplificadas para o gene COI, totalizando 347 sequências para este fragmento gênico. No entanto, não tivemos sucesso na amplificação do gene CytB de oito amostras, provenientes de duas colônias de Jitaúna/BA, duas de Petrópolis/RJ, uma de Florianópolis/SC, uma de Jequié/BA, uma colônia do Rio do Sul/SC e uma de Armazém/SC, totalizando 339 sequências para esse fragmento. Para o gene 12S, não foi possível a amplificação de três amostras, duas provenientes de colônias de Petrópolis/RJ e uma do Rio do Sul/SC, totalizando 344 sequências para esse gene. As sequências obtidas para as três regiões gênicas apresentaram excelente qualidade, sendo possível identificar inequivocamente as bases nitrogenadas, o que conferiu acurácia aos dados analisados (Figura 5). O número de indivíduos sequenciados para cada gene, assim como a localidade de origem das amostras, estão descritos na Tabela 2.

Foram verificados 59 sítios variáveis e 50 haplótipos para o gene COI, 47 sítios variáveis e 40 haplótipos para o gene CytB, enquanto que para o gene ribossomal 12S foram observados 14 sítios polimórficos e 15 haplótipos. Os três genes analisados se mostraram bastante conservados, apresentando baixos valores de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), o que indica alta similaridade entre os haplótipos, e altos índices de diversidade haplotípica ( $H_d$ ) devido ao alto número de haplótipos observados e à presença de haplótipos exclusivos de localidade (Tabela 4). Quanto à composição nucleotídica, foi observado que guanina e citosina perfazem cerca de 20% a 25% das bases (Tabela 4).

Para o gene COI foram observadas 56 mutações sinônimas e três mutações que resultaram em mudança de aminoácidos, sendo elas Ile  $\leftrightarrow$  Leu, Ile  $\leftrightarrow$  Met, Val  $\leftrightarrow$  Ile nas posições 79, 84 e 427, respectivamente. No gene CytB, foram observadas 35 mutações

sinônimas e 11 substituições não sinônimas, sendo Tre ↔ Trp na posição 105, Ile ↔ Val nas posições 172, 187, 205, 253, 298 e 397, Phe ↔ Leu na posição 184, His ↔ Asn na posição 238, Phe ↔ Ser na posição 311 e Ile ↔ Met na posição 357.



**Figura 5.** Eletroferogramas de fragmentos do gene COI (a), CytB (b) e 12S (c) de amostras de *P. helleri*.

As amostras não amplificadas para os genes CytB e 12S foram excluídas da análise de genes concatenados, totalizando 339 sequências dos fragmentos gênicos COI, CytB e 12S concatenados (1508 pb). Como as amostras dos ninhos de Jitaúna/BA e Florianópolis/SC não foram sequenciadas para o gene CytB, bem como a amostra de Petrópolis/RJ para os genes CytB e 12S, o número de localidades incluídas na análise passou de 67 para 64 (Tabela 2). Para os genes concatenados (1508 pb), foram observados 112 sítios polimórficos e 73 haplótipos, verificando-se igualmente baixo valor de diversidade nucleotídica ( $0,00560 \pm$

0,00024) e alto índice de diversidade haplotípica ( $0,968 \pm 0,003$ ). Quanto à composição nucleotídica, adenina e timina perfizeram 79% das bases (Tabela 4).

**Tabela 4.** Índices de diversidade: Tamanho do amplicon (pb), conteúdo GC, número de sítios variáveis (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) para cada gene mitocondrial, bem como para genes concatenados de amostras de *P. helleri*

Gene	Tam(pb)	G+C	S	H	$\pi$ /sd	Hd/sd
COI	611	0,224	59	50	$0,00764 \pm 0,00030$	$0,928 \pm 0,009$
CytB	485	0,223	47	40	$0,00602 \pm 0,00037$	$0,860 \pm 0,016$
12S	412	0,183	14	15	$0,00236 \pm 0,00017$	$0,642 \pm 0,024$
COI + CytB + 12S	1508	0,213	112	73	$0,00560 \pm 0,00024$	$0,968 \pm 0,003$

sd, desvio padrão

#### 4.2. Inferências filogenéticas

As análises filogenéticas (MV e IB) foram realizadas a partir dos 73 haplótipos obtidos para os três genes concatenados, além de uma sequência da espécie *Partamona cupira* utilizada como grupo externo.

A topologia obtida pela Inferência Bayesiana mostrou várias linhagens em uma politomia pouco resolvida, impossibilitando a verificação de todas as relações filogenéticas entre elas. Apenas quatro filogrupos apresentaram valores de probabilidade posterior (pp) acima de 70% (Figura 6).

Dois desses filogrupos são constituídos por haplótipos de amostras oriundas do estado da Bahia, sendo 11 haplótipos identificados em amostras de 10 localidades acima do Rio Jequitinhonha e dois haplótipos de duas localidades abaixo deste rio, com suportes de 93% (representado na árvore pela cor vermelha) e 100% (representado na árvore pela cor vermelho claro), respectivamente.



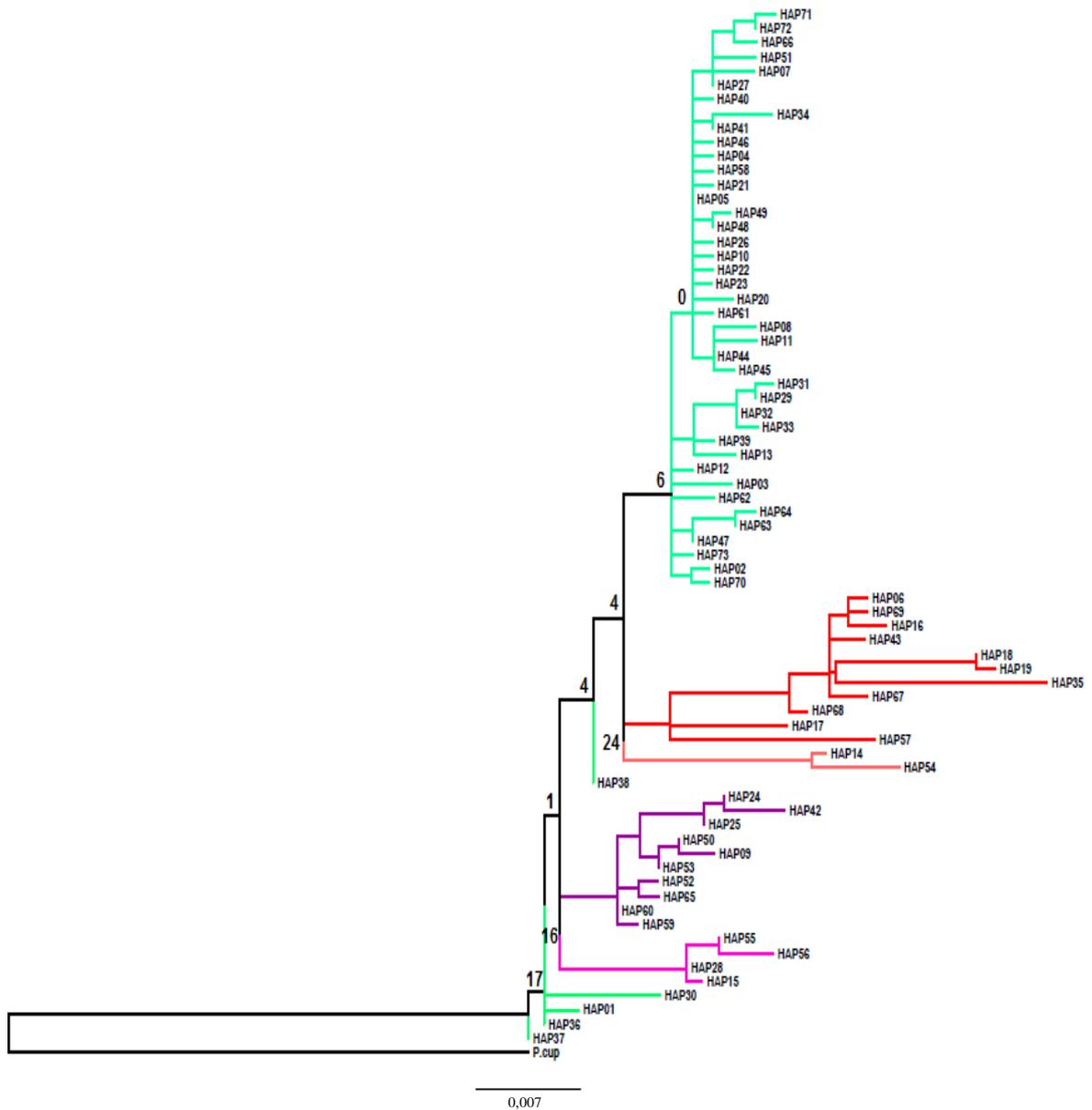
02

**Figura 6.** Reconstrução filogenética obtida por Inferência Bayesiana com base em 1508 pb dos genes COI, CytB e 12S concatenados da espécie *P. helleri* e um grupo externo (*P. cupira*). Os suportes nos ramos mostram valores de probabilidade posterior.

O terceiro filogrupo (roxo) agrupa 10 haplótipos de amostras distribuídas entre oito localidades ao sul do estado de Minas Gerais, duas localidades ao norte do Rio Doce e uma localidade ao norte do estado de São Paulo. Esse filogrupo apresentou probabilidade posterior de 74%. O quarto filogrupo (em rosa) é formado por quatro haplótipos de amostras de três localidades ao norte de Minas Gerais com suporte de 100%.

Os haplótipos caracterizados em amostras das demais localidades, que se estendem do Espírito Santo, abaixo do Rio Doce, até Santa Catarina, estão representados na árvore filogenética pela cor verde. Tais haplótipos compõem filogrupos com baixo suporte ou são apresentados como linhagens individuais na árvore.

A topologia obtida pelo método de Máxima Verossimilhança apresentou suporte dos valores de *bootstrap* (*bp*) muito abaixo de 50% para os clados definidos (Figura 7). Apesar do baixo suporte, os clados verificados são, em parte, semelhantes aos obtidos na topologia por IB.



**Figura 7.** Reconstrução filogenética obtida por Máxima Verossimilhança com base em 1508 pb dos genes COI, CytB e 12S concatenados da espécie *P. helleri* e um grupo externo (*P. cupira*). Os suportes nos ramos mostram valores de *bootstrap*. As cores utilizadas correspondem aos clados estabelecidos na topologia por IB.

### 4.3. Estrutura populacional e inferência filogeográfica

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) mostrou que 91,7% da variação genética é resultado de diferenças interpopulacionais ( $\Phi_{ST} = 0,9166$ ;  $P = 0,0000$ ), sugerindo que as populações analisadas são altamente diferenciadas para os genes mitocondriais (Tabela 5). Os valores de  $\Phi_{ST}$  par a par observados foram, no geral, bem elevados ( $\Phi_{ST} \approx 1$ ), indicando uma alta divergência genética entre as populações. Alguns valores próximos a zero foram observados; no entanto, tais valores não foram significativos ao nível de 5%.

O teste do modelo de isolamento por distância (IBD) apontou uma correlação baixa, porém significativa, entre distâncias genéticas e geográficas ( $r = 0,2487$ ;  $P < 0,0010$ ).

**Tabela 5.** Análise de Variância Molecular (AMOVA) para dois níveis hierárquicos usando os três genes concatenados da espécie *P. helleri*.

Fonte da Variação	d.f.	Variação (%)	$\Phi_{ST}$	Valor de P
Entre populações	63	91,66		
Dentro de populações	275	8,34	$\Phi_{ST} = 0,9166$	$P = 0,00$
<b>Total</b>	<b>338</b>			

Com o objetivo de averiguar a relação entre os haplótipos, foi construída uma rede haplotípica utilizando as 339 sequências dos genes concatenados (Figura 8A). A rede é composta de 73 haplótipos, dos quais 61 são exclusivos das localidades onde foram caracterizados e, dentre estes, 27 são únicos, ou seja, em uma determinada localidade, apenas um haplótipo foi identificado em todas as colônias. O H5 foi o mais compartilhado e o mais frequente, sendo encontrado em amostras de 11 das 64 localidades utilizadas na geração da rede concatenada. Dessas 11 localidades, duas estão situadas na parte central (MAR e IGP) e nove estão ao Sul da distribuição (ANT, MAT, GUA, GRT, GBR, JOI, MSS, POM e SIG) (O

nome completo e a sigla de cada localidade encontram-se na tabela 2). Na rede, podem ser observados outros três haplótipos que parecem ser muito frequentes (H66, H59 e H12); no entanto, cada um deles foi observado apenas em amostras de três localidades (Anexo/ Tabela 9). A razão deste elevado número se deveu à análise de um grande número de colônias destas localidades, pois se buscava demonstrar que a espécie estudada ocupa certa área via um número muito reduzido de fêmeas fundadoras, hipótese esta confirmada, dado que uma mesma sequência foi caracterizada em todas as amostras dos ninhos de cada uma destas localidades. Ademais, todas as outras localidades amostradas também apresentaram um ou poucos haplótipos (Apêndice / Tabela 9), o que também pode ser verificado nas redes dos genes individuais COI, CytB e 12S (Apêndice / Figuras 13, 14 e 15)

Os haplótipos observados ao norte da distribuição (estado da Bahia, representados na rede pelas cores vermelho escuro e vermelho claro) não são compartilhados por amostras de qualquer outra localidade amostrada ao longo das regiões central e sul. Além disso, há uma acentuada diferenciação entre eles próprios e em relação aos demais haplótipos observados na rede. As localidades, com exceção de CRA que apresentou dois haplótipos, apresentaram um haplótipo único e exclusivo. Os haplótipos das amostras de SAL (H57), PSE (H54), CAR (H14) e CNV (H17) são os mais diferenciados, sendo observados mais de 10 passos mutacionais entre eles e os demais observados em amostras do norte (Figura 8A). A identificação por especialista corroborou que tais espécimes pertencem à espécie em estudo. Na rede, o haplótipo 17 identificado em amostra de CNV está muito distante dos demais haplótipos verificados nas amostras de localidades ao norte, sendo mais relacionado a H66 verificado nas localidades UFS, URP e TLM (Figura 8A e B), do qual difere em oito passos mutacionais. Pela observação da rede haplotípica, tais haplótipos poderiam estar agrupados em, pelo menos, quatro grupos, assim definidos: grupo 1, composto por H57 (SAL); grupo 2, composto por H17 (CNV); grupo 3, constituído de H14 (CAR) e H54 (PSE) e grupo 4,

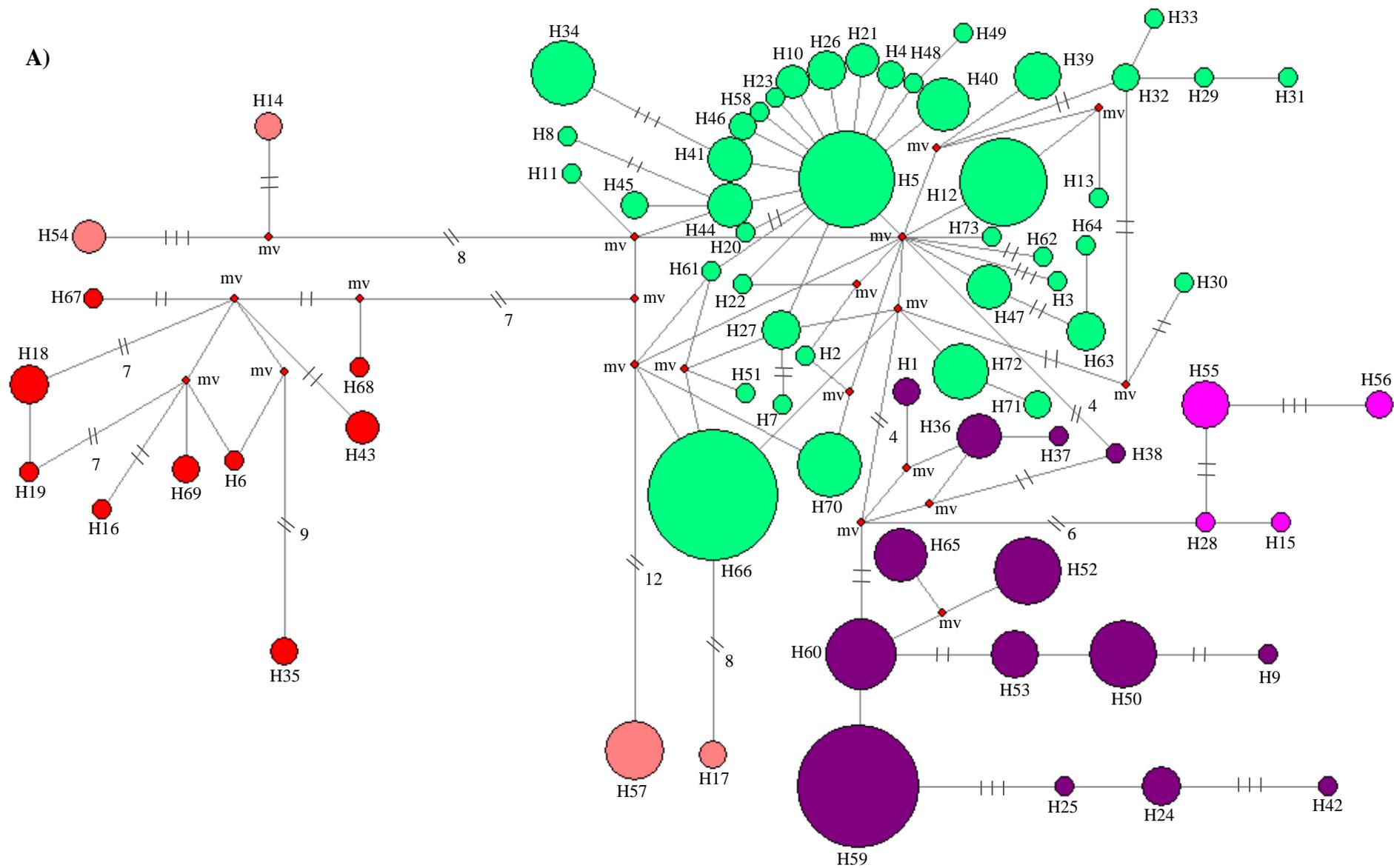
constituído por todos os haplótipos das demais localidades da Bahia. Esses haplótipos compõem dois filogrupos na topologia obtida por Inferência Bayesiana, um formado por CAR e PSE (pp = 100%) e o segundo incluindo todas as demais localidades da Bahia (pp = 93%), representadas nas cores vermelho claro e vermelho, respectivamente (Figura 6).

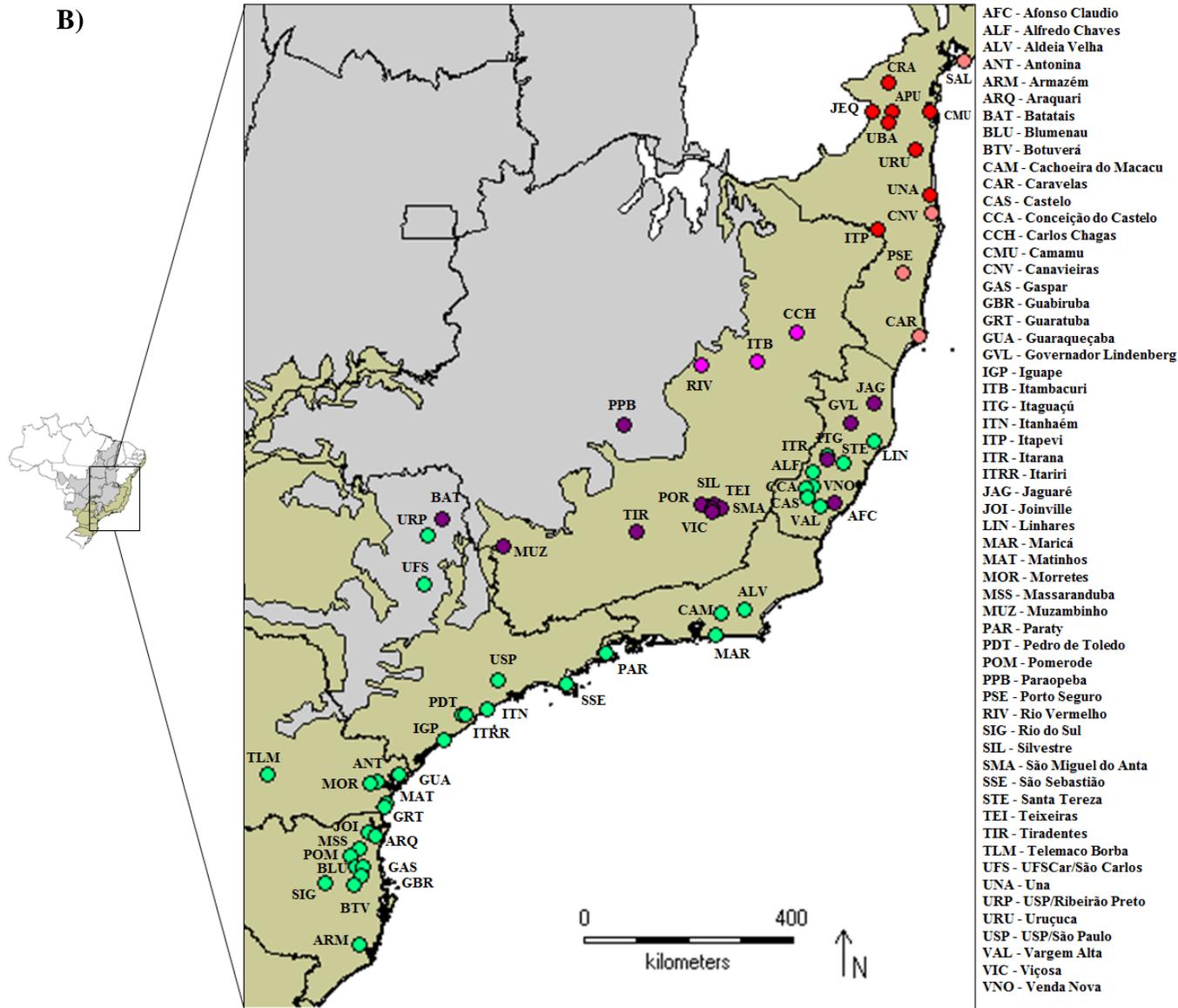
Os haplótipos observados em amostras no interior da região Central da distribuição (representados na rede pelas cores rosa e roxo), exceto aqueles de duas localidades ao norte do estado de São Paulo (UFS e URP), são mais relacionados entre si e consideravelmente diferenciados dos demais observados nas amostras do Norte, Sul e até mesmo do leste da região Central. Os haplótipos de quatro localidades do Espírito Santo (JAG, GVL, ITR e AFC) são mais relacionados a esses haplótipos do interior da região central do que os demais haplótipos observados no estado. Observando a rede, é possível separar esses haplótipos em dois grupos: um ao norte de Minas Gerais, composto pelos haplótipos 15, 28, 55 e 56 das localidades de CCH, ITE e RIV, e um segundo grupo composto pelos haplótipos das demais localidades de Minas Gerais, das localidades JAG (H42), GVL (H24 e H25), ITR (H36, H37 e H38) e AFC (H1) no Espírito Santo e pelo haplótipo de BAT (H9), do interior de São Paulo. Tais haplótipos, com exceção dos observados em ITR e AFC, formam dois clados na topologia por inferência Bayesiana, um bem suportado, constituído por CCH, ITE e RIV (pp = 100%) e outro formado pelos haplótipos das demais localidades de Minas Gerais, BAT e outras duas localidades do Espírito Santo (JAG e GVL), situadas ao norte do Rio Doce (pp = 74%). Os dois clados descritos estão representados nas cores rosa e roxo, respectivamente (Figura 6).

Os demais haplótipos da região Central e os observados na região Sul são mais relacionados, diferenciando-se entre si por um ou poucos passos mutacionais e, de acordo com a rede, poderiam compor um único grupo. A parte da rede composta pelos haplótipos dessa região apresenta forma de estrela, com um haplótipo mais compartilhado (H5) do qual

derivam vários outros haplótipos que se diferenciam por, no máximo, dois passos mutacionais e um *median vector* (*mv*) do qual derivam haplótipos que se diferenciam por até quatro passos mutacionais. No geral, os haplótipos das localidades de São Paulo e do Sul derivam de H5, enquanto que os haplótipos das localidades do Espírito Santo e Rio de Janeiro derivam de um *median vector* (Figura 8A).

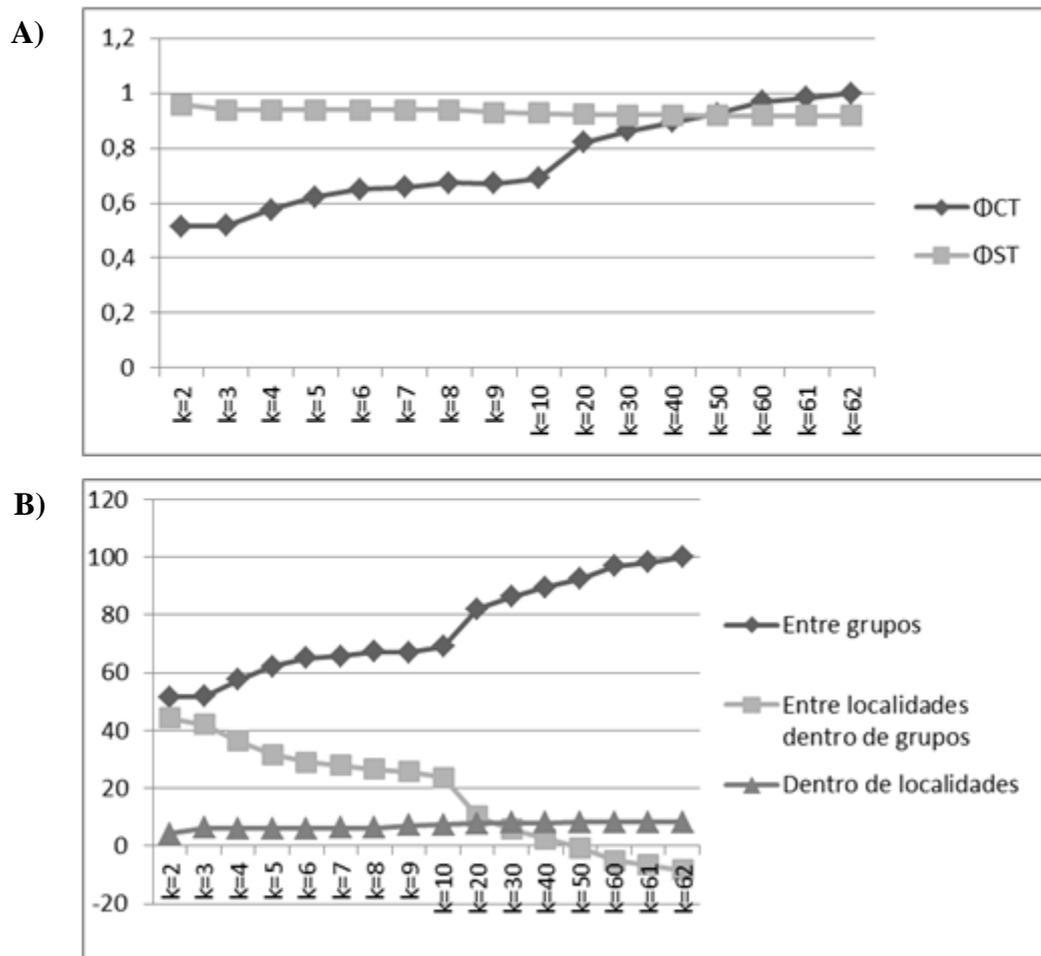
O mapa apresentado na Figura 8B mostra a distribuição geográfica das localidades amostradas.





**Figura 8.** A) Rede haplotípica gerada com base nas seqüências concatenadas dos três genes mitocondriais (1508 pb) de *P. helleri*. As barras indicam os passos mutacionais entre os haplótipos. Nenhuma barra equivale a um passo mutacional. Duas barras na diagonal indicam mais de quatro passos mutacionais. **B)** Mapa indicando a localização geográfica dos pontos de coleta. As cores utilizadas correspondem aos filogrupos obtidos pela análise bayesiana implementada pelo programa BAPS.

A Análise Espacial de Variância Molecular (SAMOVA) não recuperou a estrutura geográfica entre grupos de populações. Os valores de  $\Phi_{CT}$  aumentaram com o aumento do número de agrupamentos estabelecidos (K). O maior valor de  $\Phi_{CT}$  foi observado em K=62 ( $\Phi_{CT} = 100,00$ ) (Figura 9). Como mencionado anteriormente, nossa amostra é proveniente de 64 localidades e este resultado indica que os haplótipos exclusivos de cada localidade parecem constituir grupos filogeográficos distintos.



**Figura 9.** Análise espacial da variância molecular (SAMOVA). **A)** Estimativa dos índices de fixação obtida para cada número de k. **B)** Porcentagem da variação genética contida nos níveis hierárquicos da SAMOVA obtido para cada número de k.

A análise de estrutura populacional pelo método bayesiano implementada no software BAPS mostrou que a probabilidade posterior mais adequada para explicar a estruturação genética foi de cinco agrupamentos (*clusters*) (Figura 10), resultado, em parte, concordante com as linhagens estabelecidas na topologia gerada por IB.

Foram observados dois grupos nas populações do norte, porém, SAL e CNV, antes agrupadas com as localidades ao norte do Rio Jequitinhonha, foram agrupadas com PSE e CAR (localidades ao sul do rio). Analisando a rede haplotípica (Figura 8A), é possível verificar que os haplótipos observados nessas duas localidades (H17 e H57) são bastante diferenciados de todos os demais encontrados na região norte, tanto acima como abaixo deste rio.

No interior da região central da distribuição também foram observados dois grupos, um ao norte do estado de Minas Gerais, que corresponde ao clado rosa na árvore filogenética, e o segundo correspondente ao clado roxo. Nesse último grupo, no entanto, foram agrupadas duas localidades do Espírito Santo localizadas ao sul do Rio Doce (AFC e ITR). Na árvore, os haplótipos observados nessas localidades estavam entre as linhagens que não apresentaram suporte na conformação dos clados.

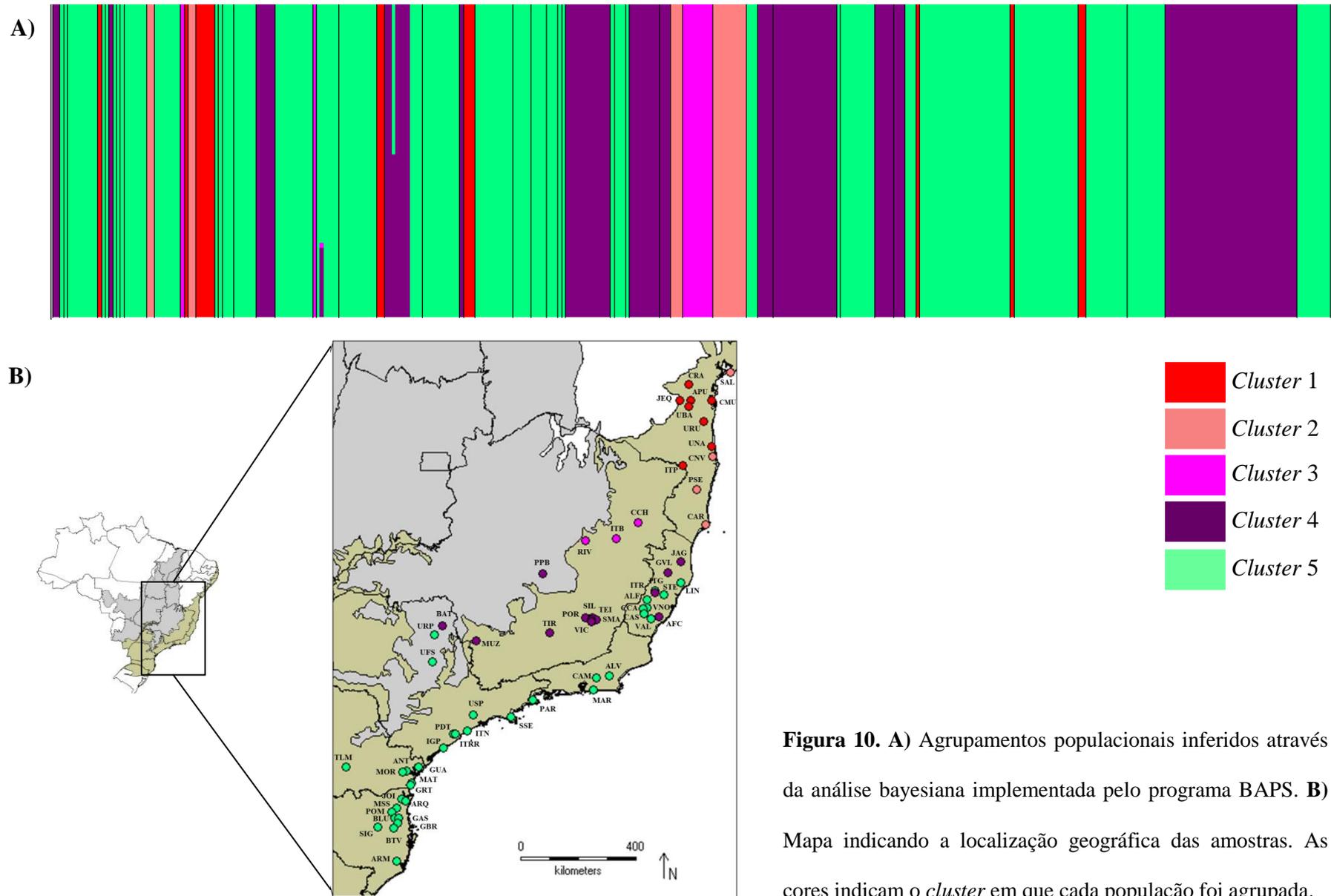
As demais localidades abaixo do Rio Doce até a região sul foram agrupadas no quinto e maior grupo, o qual na árvore filogenética corresponde às linhagens apresentadas em verde.

A topologia obtida pela análise por inferência filogenética e os agrupamentos fornecidos pelo BAPS sugerem duas possibilidades de agrupamentos, com algumas diferenças entre elas. As duas alternativas foram testadas por meio de uma AMOVA para três níveis hierárquicos e os valores de  $\Phi_{CT}$  foram significativos ( $P = 0,00000$ ), sendo o valor obtido para o agrupamento do BAPS levemente maior. Os valores indicam que aproximadamente 60% da variação genética é explicada pela diferenciação entre os grupos (Tabela 6).

**Tabela 6.** Análise de Variância Molecular (AMOVA) para três níveis hierárquicos testando os agrupamentos inferidos pela árvore filogenética e pelo BAPS.

<b>Fonte da Variação</b>	<b>d.f.</b>	<b>Variação (%)</b>	<b>Valor de P</b>
<i>Agrupamento do BAPS</i>			
<b>Entre grupos</b>	4	59,88	P = 0,00
<b>Entre populações dentro de grupos</b>	59	33,77	
<b>Dentro de populações</b>	275	6,35	
<b>Total</b>	338		
<i>Agrupamento da Árvore</i>			
<b>Entre grupos</b>	4	58,55	P = 0,00
<b>Entre populações dentro de grupos</b>	59	35,17	
<b>Dentro de populações</b>	275	6,28	
<b>Total</b>	338		

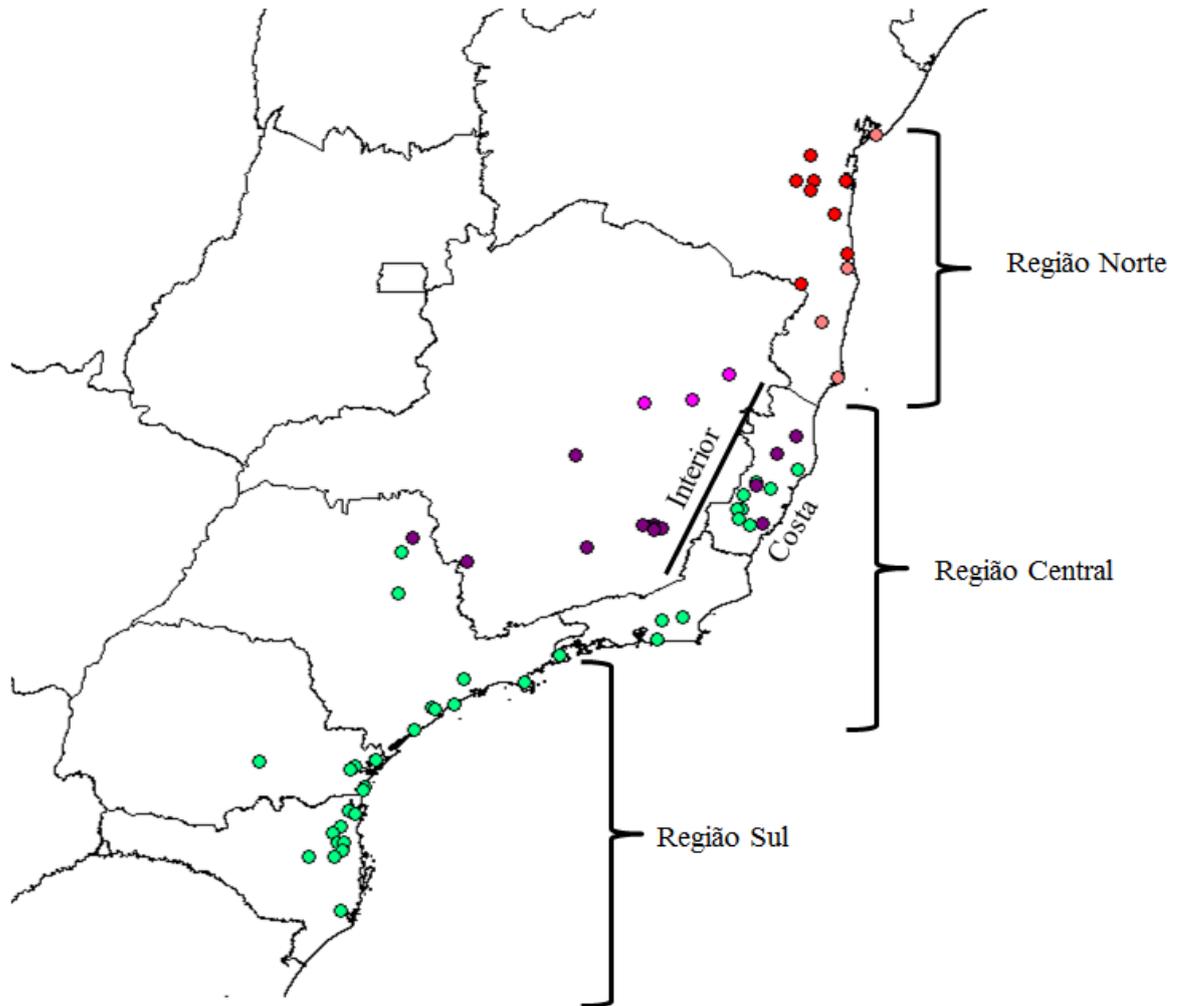
Os resultados obtidos pela árvore filogenética, rede de haplótipos e BAPS mostram que as populações ao norte da distribuição são bastante diferenciadas entre si e também em relação às demais populações do centro e sul da distribuição. No entanto, não foi possível estabelecer como a variação genética das populações ao norte está geograficamente estruturada. Por isso, essas populações foram consideradas integrando um único filogrupos, denominado de Filogrupos Norte. As três análises foram concordantes quanto à existência de um filogrupos ao norte de Minas Gerais (RIV, CCH e ITP), denominado Filogrupos Centro-Norte, mas em relação aos grupos a oeste da região Central e na região Sul, houve concordância somente entre o resultado obtido pelo BAPS e pela rede haplotípica. Esse agrupamento será considerado, uma vez que ele foi confirmado por duas análises e o  $\Phi_{CT}$  gerado pela AMOVA foi um pouco superior. Esses filogrupos foram denominados Centro-Oeste e Centro-Sul, respectivamente. Sendo assim, a estrutura filogeográfica das populações de *Partamona helleri* não foi totalmente recuperada.



Para verificar o nível de variação por filogruppo, os índices de diversidade nucleotídica foram estimados para os haplótipos de cada filogruppo individualmente. Foi verificada uma diminuição da variação no sentido norte/sul, enquanto na região central foi verificada diminuição da variação no sentido costa/interior. Dessa forma, o  $\pi$  foi então calculado por região, considerando três divisões: norte, central e sul. A região central foi subdividida em costa e interior (Tabela 7). Na costa, estão os haplótipos do grupo Centro-Sul localizados nos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro e alguns haplótipos do grupo Centro-Oeste amostrados no Espírito Santo; já no interior, estão os haplótipos dos filogrupos Centro-Norte e os haplótipos do Centro-Oeste amostrados nas localidades de Minas Gerais. Por fim, a região sul inclui os haplótipos do filogruppo Centro-Sul amostrados em localidades de São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Figura 11). Os resultados também podem ser verificados pela rede haplotípica (Figura 8A).

**Tabela 7.** Índices de diversidade nucleotídica observados em amostras de *P. helleri* de diferentes regiões.

<b>Região</b>	<b><math>\pi</math> /sd</b>
<b>Norte</b>	0,00959 $\pm$ 0,00047
<b>Central</b>	0,00456 $\pm$ 0,00017
<b>Central/Costa</b>	0,00361 $\pm$ 0,00032
<b>Central/Interior</b>	0,00298 $\pm$ 0,00034
<b>Sul</b>	0,0192 $\pm$ 0,00010



**Figura 11.** Mapa mostrando as localidades de cada filogrupos ao longo das regiões norte, central e sul da distribuição de *P. helleri*.

#### 4.4. Demografia histórica

Os testes de neutralidade  $F_s$  de  $F_u$  e  $R_2$  apresentaram valores positivos e maiores que zero, respectivamente, para os filogrupos Norte e Centro-Norte. Já para os filogrupos Centro-Oeste e Centro-Sul, foi verificado um indicativo de expansão populacional, sendo o resultado do  $F_s$  negativo e do  $R_2$  próximo de zero, embora apenas o grupo Centro-Sul tenha apresentado resultado significativo (Tabela 8).

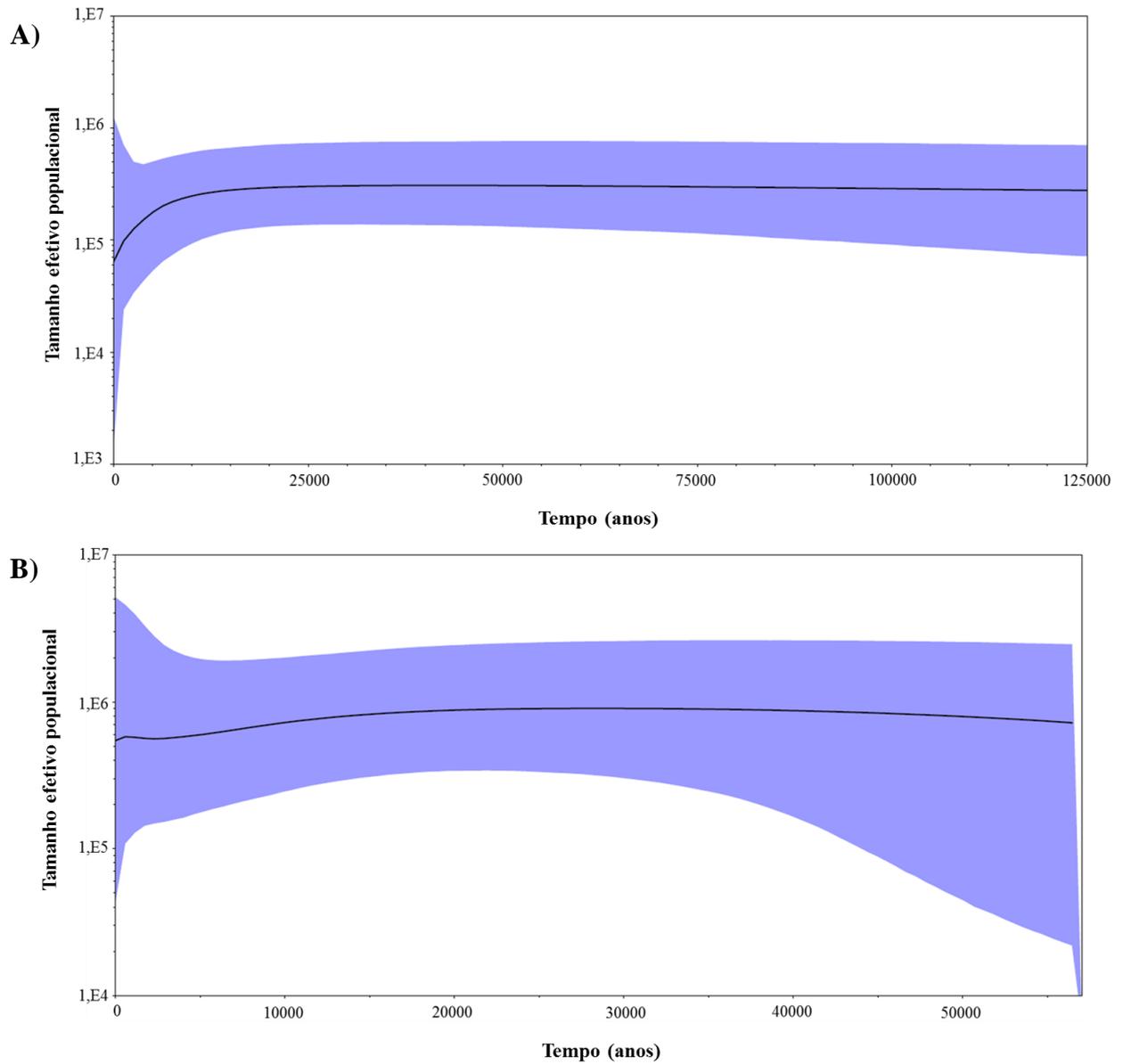
O *Coalescent Bayesian Skyline Plot* (BSP) não foi realizado para as populações do grupo Norte, uma vez que não foi possível recuperar como este está estruturado. Para o grupo

Centro-Oeste, foi verificada uma redução do tamanho efetivo a partir de aproximadamente 10 mil anos, enquanto foi evidenciada uma estabilidade ao longo do tempo para o grupo Centro-Sul (Figura 12); no entanto, estes resultados devem ser tratados com cautela, já que houve também um aumento nos intervalos de confiança. Estimativa quanto à demografia histórica do grupo Centro-Norte não pode ser realizada pelo BSP devido ao pequeno número amostral (N=10).

**Tabela 8.** Estimativa de variação no tamanho efetivo das populações de *P. helleri* através dos testes de neutralidade  $F_s$  de  $F_u$  e  $R_2$ .

<b>Grupos</b>	<b>Tamanho amostral</b>	<b>Número de populações</b>	<b>Fu's <math>F_s</math></b>	<b><math>R_2</math></b>
Norte	32	12	3,3469 <sup>ns</sup>	0,1313 <sup>ns</sup>
Centro-Norte	10	3	0,5676 <sup>ns</sup>	0,1564 <sup>ns</sup>
Centro-Oeste	106	13	-1,1257 <sup>ns</sup>	0,0662 <sup>ns</sup>
Centro-Sul	191	36	-27,9936**	0,0352*

\*  $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,00001$ ; <sup>ns</sup> não significativo.



**Figura 12.** Inferências do *Coalescent Bayesian Skyline Plot* (BSP) para a história demográfica dos grupos de populações de *P. helleri* baseada nas regiões mitocondriais concatenadas (1508pb): **A)** Grupo Centro-Oeste; **B)** Grupo Centro-Sul. A linha preta representa a mediana estimada e os intervalos azuis mostram o limite inferior e superior de 95% de HPD (*Highest Posterior Density*).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização das sequências

De acordo com os níveis de polimorfismo estimado, os genes CytB e COI foram os mais variáveis dentre as três regiões mitocondriais analisadas para *P. helleri*, sendo verificados 40 haplótipos em amostras de 64 localidades (n=339) para o primeiro e 50 haplótipos em amostras de 67 localidades (n=347) para o segundo. O gene ribossomal 12S foi o menos variável, tendo sido encontrados 15 haplótipos em amostras de 66 localidades (n=344). A análise de genes concatenados mostrou a presença de 73 haplótipos nas 64 localidades amostradas (n=344), dos quais 61 são exclusivos de localidade.

Os fragmentos gênicos apresentaram alto índice de diversidade haplotípica e baixo índice de diversidade nucleotídica. Quanto à diversidade haplotípica, tal valor se deve ao número elevado de haplótipos observados. Já o baixo índice de diversidade nucleotídica para os genes mitocondriais de *P. helleri* sugere alta similaridade entre os haplótipos encontrados. Valores similares foram reportados para outras espécies de meliponíneos (Batalha-Filho *et al.* 2010, Luz 2011, Brito *et al.* 2013, Francisco *et al.* 2015, Cardoso 2016, Miranda 2016).

Segundo Miranda (2016), esses valores podem ser explicados pelo baixo acúmulo de mutações devido à recente origem das espécies do gênero *Partamona*. Esse mesmo autor, comparando os valores de diversidade nucleotídica obtidos para duas espécies do gênero, *P. rustica* e *P. helleri*, observou que a primeira possui valores inferiores ao da segunda, o que seria explicado pela distribuição mais restrita e endêmica apresentada por *P. rustica*, enquanto *P. helleri* apresenta uma ampla distribuição ao longo de toda a Mata Atlântica. O índice de diversidade nucleotídica obtido para *P. ailyae* (Cardoso 2016), outra espécie do gênero com ampla distribuição, corrobora a justificativa apresentada por Miranda (2016), uma vez que tal índice é superior ao apresentado por *P. rustica* e muito similar ao apresentado por *P. helleri*.

Quanto aos tipos de substituições observadas, o gene CytB apresentou um maior número de mutações não sinônimas (12) em relação ao COI (3). A maior parte das mutações não sinônimas observadas no CytB resultou na troca entre Valina e Isoleucina. Ferreira (2011) também verificou para *P. helleri* um maior número de mutações não sinônimas nas sequências do gene CytB. Para o gene COI, a autora observou 12 sítios polimórficos, porém nenhum que resulta em alteração de aminoácidos. Já para o fragmento do gene CytB, ela observou sete alterações de aminoácidos em quatro posições do fragmento gênico, sendo principalmente entre fenilalanina e leucina.

A composição nucleotídica tem alto percentual de A+T, o que corrobora com o descrito na literatura para o genoma mitocondrial de *Apis mellifera* (Crozier & Crozier 1993) e de meliponíneos (Batalha-Filho *et al.* 2010, Luz 2011, Ferreira 2011, Cardoso 2016, Miranda 2016).

## 5.2. Estrutura populacional

As populações se mostraram altamente diferenciadas quando analisadas para genes mitocondriais, sendo verificado através da AMOVA que 91,7% da variação genética são resultado da diferenciação entre as mesmas. Resultados semelhantes foram verificados em estudos realizados com *P. rustica* (Miranda 2016) e *P. ailyae* (Cardoso 2016).

Em trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório, algumas colônias de *P. helleri* foram analisadas para locos microssatélites. Tais análises foram realizadas por Ferreira (2011) com as colônias dos *campi* da USP de Ribeirão Preto, USP de São Paulo e UFSCar de São Carlos e por Bergamo (dados não publicados) em colônias do Estado de Minas Gerais (TEI, SMA, SIL, TIR e VIC). Bergamo realizou uma análise de variância molecular (AMOVA) considerando todas as colônias analisadas por ela e por Ferreira (2011) e verificou que 8% ( $\Phi_{ST} = 0,08$ ;  $P = 0,001$ ) da variação total observada é variação entre populações, o que mostra

certo grau de diferenciação entre as mesmas. Além disso, a autora verificou divergência entre os valores de  $\Phi_{ST}$  observados para genes mitocondriais e para microssatélites, tendo o primeiro apresentado maior estruturação do que o segundo. Diferenças entre estes valores também foram reportadas para outras espécies de *Partamona* (Ferreira 2011, Cardoso 2016, Miranda 2016). Quando comparados o valores de  $\Phi_{ST}$  estimados no presente trabalho para os genes mitocondriais (COI, CytB e 12S) e o obtido por Bergamo para locos de microssatélites, é possível verificar um maior grau de diferenciação para os genes mitocondriais.

A análise de  $\Phi_{ST}$  par a par estimou valores no geral bastante elevados, indicando alta divergência entre pares de populações. Os valores que indicaram pouca divergência não foram significativos ao nível de 5%. Esses índices elevados indicam uma forte diferenciação e sugerem fluxo gênico baixo ou ausente entre as localidades analisadas. Tal resultado é reflexo do alto número de haplótipos exclusivos de localidade observados.

O teste de Mantel mostrou baixa correlação entre distâncias genética e geográfica, indicando que pouco da diferenciação genética entre populações é representada pela distância geográfica entre elas. Em um estudo realizado com *P. ailyae*, Cardoso (2016) também verificou baixa correlação entre estas variáveis. Diferentemente, Miranda (2016) não observou evidência de isolamento por distância em *P. rustica*, sendo os valores do teste de Mantel não significativos.

A divergência entre os resultados de estruturação para os genomas mitocondrial e nuclear, a alta diferenciação observada entre os pares de populações, bem como a baixa correlação entre distâncias genéticas e geográficas podem ser resultados de características inerentes às espécies do gênero, tal como a dispersão sexo-assimétrica em que as fêmeas apresentam comportamento filopátrico, enquanto os machos constituem o sexo dispensor, introduzindo material genético novo nas populações.

A reprodução das colônias das espécies de abelhas sem ferrão se dá por enxameagem, onde a colônia-filha é fundada próxima à colônia-mãe, pois mantém com ela uma relação de dependência por alimentos e operárias até que seja completamente estabelecida (Nogueira-Neto 1954). Dessa forma, as futuras rainhas não dispersam longas distâncias no processo de formação de uma nova colônia (Engels & Imperatriz-Fonseca 1990). A filopatria das rainhas de *Partamona* foi confirmada por Wille & Orozco (1975). As novas rainhas apresentam capacidade de dispersão limitada, migrando menos de 300 metros no processo de fundação de novas colônias (Araújo *et al.* 2004). Enquanto as fêmeas de *Partamona* colonizam novas áreas, os machos realizam o papel de dispersores, promovendo o fluxo gênico entre as populações (Fernandes *et al.* 2012, Cardoso 2016, Miranda 2016).

Os resultados obtidos corroboram ainda com os resultados de estudos sobre ocupação de área realizados em nosso laboratório com espécies do gênero *Partamona* (Fernandes *et al.* 2012, Cardoso 2016, Miranda 2016), inclusive com a espécie *P. helleri* (Ferreira 2011, Miranda 2016), suportando a hipótese de que um sítio de ocorrência é ocupado por uma ou poucas linhagens maternas, o que também é confirmado pela presença de poucos haplótipos por sítio e a o grande número de haplótipos únicos e/ou exclusivos de localidades aqui verificados.

### **5.3. Estrutura filogeográfica**

A estrutura filogeográfica recuperada para a espécie *P. helleri* se mostrou bastante complexa. A análise bayesiana implementada pelo programa BAPS e a análise filogenética (IB) apontaram a existência de cinco filogrupos, porém, as análises não foram totalmente concordantes quanto a alguns haplótipos de determinadas localidades estarem em um ou em outro grupo. A AMOVA para três níveis hierárquicos mostrou uma pequena diferença nos valores de  $\Phi_{CT}$  obtidos para as duas possibilidades de agrupamento, sendo o maior valor obtido para o resultado gerado pelo BAPS. A rede de haplótipos não foi totalmente

concordante com os dois possíveis agrupamentos no que diz respeito às localidades ao norte da distribuição (estado da Bahia). Quanto às demais localidades, a rede se mostrou concordante com o agrupamento gerado no BAPS.

Ao que parece, as populações de *P. helleri* podem estar estruturadas em, pelo menos, cinco filogrupos, embora a estrutura filogeográfica dessas populações não tenha sido claramente recuperada. Segundo as análises (árvore filogenética, BAPS e rede de haplótipos), os haplótipos das localidades ao norte podem estar agrupados em dois ou mais filogrupos, enquanto aqueles distribuídos na região central e sul parecem compor três filogrupos que são mais relacionados entre e si e distintos dos possíveis filogrupos das localidades do norte.

A região norte detém a maior variação observada. Todas as localidades apresentaram haplótipos exclusivos e, com exceção de Cravolândia, todas apresentaram um único haplótipo, o que mostra alta estruturação entre elas. Observando na rede, é possível perceber que esses haplótipos apresentam um padrão diferenciado dos demais no que diz respeito ao número de passos mutacionais. Foram verificadas até 21 substituições entre os haplótipos amostrados ao norte (SAL) e ao sul (PSE) da Bahia. Além disso, localidades próximas como CNV e UNA também apresentam haplótipos que se distanciam geneticamente por 12 passos mutacionais, o que mostra grande acúmulo de mutações nas amostras desta região. Esses haplótipos também são bastante diferenciados dos observados na região central e na região sul. Parece haver lacunas filogenéticas pronunciadas tanto entre algumas localidades dentro da própria região norte, como entre essa região e a região central.

Analisando fragmentos de genes mitocondriais por RFLP-PCR em colônias de *P. helleri* coletadas em cinco estados brasileiros (BA, ES, MG, SP e SC), Brito (2005) verificou 10 haplótipos pouco divergentes entre si, sete deles exclusivos de determinadas localidades. As duas localidades amostradas no estado da Bahia apresentaram haplótipos exclusivos. Já as demais localidades, além de haplótipos exclusivos, apresentaram haplótipos compartilhados

inclusive entre os estados. A autora levanta a possibilidade de a diferenciação da população do norte ser devido ao baixo número amostral coletado no estado da Bahia (N=3). Porém, essa diferenciação, inclusive mais acentuada, pode ser verificada entre as 33 colônias do estado da Bahia e as demais aqui analisadas.

Em estudos com cromossomos B também foram verificados padrões diferenciados em populações de *P. helleri* do estado da Bahia. Analisando um grande número de colônias do presente trabalho ao longo de toda a distribuição da espécie, Machado (2016) verificou maior frequência de cromossomos B nas populações ao norte. A diversidade de cromossomos B, bem como a quantidade desses cromossomos por indivíduos também foram maiores nas populações da Bahia (Martins *et al.* 2009, 2014).

O filogrupo Centro-Norte é composto por quatro haplótipos que se diferenciam um do outro por até três passos mutacionais. As amostras das localidades que constituem este filogrupo, assim como aquelas do filogrupo Norte, não compartilham haplótipos entre si. Oito passos mutacionais separam os haplótipos mais próximos desse filogrupo e os do filogrupo Centro-Oeste, com o qual é mais proximamente relacionado.

O filogrupo Centro-Oeste é composto por três haplótipos compartilhados por, no máximo, três localidades geograficamente próximas e outros 11 haplótipos exclusivos. No geral, os haplótipos desse filogrupo se distinguem por um ou poucos passos mutacionais. Duas localidades ao sul do Rio Doce (ITR e AFC), que na inferência filogenética não foram incluídos nesse filogrupo, apresentam na rede haplótipos intermediários ao filogrupo Centro-Sul (H1, H36, H37 e H38), do qual se distanciam por até oito passos mutacionais. Na localidade ITR, foi observado também H39, compartilhado por amostra de localidade ao sul do Rio Doce (STE), mas que pertence ao filogrupo Centro-Sul. Nove passos mutacionais separam H39 dos demais haplótipos de ITR. Considerando a rede de haplótipos e o resultado

gerado pelo BAPS, esses dois filogrupos se sobrepõem ao sul do Rio Doce no estado do Espírito Santo.

O filogrupo Centro-Sul é o mais amplo e inclui, quase que completamente, as localidades abaixo do Rio Doce até Santa Catarina. Nesse filogrupo foi observado um haplótipo mais compartilhado (H5), presente em amostras de 10 localidades, das quais oito estão distribuídas entre Paraná e Santa Catarina, uma no Rio de Janeiro e uma em São Paulo. Também foi observado compartilhamento de outros haplótipos por localidades geograficamente próximas, além da presença de muitos haplótipos exclusivos. A maior parte dos haplótipos observados em São Paulo e em toda a região Sul está associada a H5 por um ou dois passos mutacionais, apresentando essa região a menor variação observada. Porém, os haplótipos observados nas localidades do Espírito Santo que estão situadas abaixo do Rio Doce, em duas localidades do Rio de Janeiro e em três localidades do estado de São Paulo estão ligados a haplótipos não amostrados (mv) situados no centro da rede. Nesses casos, a diferenciação dos haplótipos é maior do que entre aqueles ligados a H5 e é possível observar pequenas estruturações entre grupos de haplótipos, geralmente de uma mesma localidade, que são mais parecidos entre si e consideravelmente diferenciados dos demais (p. ex: H29, H31, H32 e H33). A quantidade de variação entre essas localidades só não foi maior do que aquela entre as localidades do norte.

A distribuição de haplótipos observada em *P. helleri* sugere que a espécie esteja incluída na categoria I proposta por Avise (2000) para definir os padrões filogeográficos. Tal como a categoria I, é verificado grupos de haplótipos proximamente relacionados que se distanciam uns dos outros por muitos passos mutacionais e que ocupam diferentes áreas geográficas, ou seja, estão em alopatria. Porém, esse padrão não foi verificado na região norte, uma vez que há grande acúmulo de substituições entre grande parte dos haplótipos das

diferentes localidades. Caso essa região seja realmente composta por diferentes filogrupos, poderia ser confirmado o padrão proposto na categoria I.

Espécies que se encaixam em tal padrão apresentam linhagens alopátricas e com alta diferenciação genética. Um cenário histórico que explicaria essa condição é a existência de barreiras extrínsecas e duradouras ao fluxo gênico. Entretanto, especialmente em espécies que apresentam ampla distribuição, baixa capacidade de dispersão e baixo fluxo gênico, lacunas filogenéticas pronunciadas podem estar ligadas a extinções de haplótipos intermediários (Avice 2000).

A espécie *P. helleri* apresenta ampla distribuição ao longo de toda a Mata Atlântica, inclusive em parte do Cerrado de Minas Gerais. Além disso, como já mencionado, as fêmeas possuem limitada capacidade de dispersão, sendo o fluxo gênico entre as populações realizado pelos machos. Diante destes fatos, as características apresentadas pela espécie se enquadram na explicação proposta por Avice (2000) de que as lacunas filogenéticas observadas podem ser resultado da extinção de haplótipos intermediários. Como observado na rede, há muitos *median vectors* ao longo da rede de haplótipos, e os mesmos podem ser biologicamente interpretados como possíveis sequências existentes que não foram amostradas ou ainda como sequências de um ancestral extinto (Bandelt *et al.* 1999). Como a amostragem do presente estudo contempla toda a área de distribuição da espécie, a segunda alternativa parece mais provável.

Como já mencionado, a ocupação de área por fêmeas de *P. helleri* se dá por uma ou poucas linhagens (Ferreira 2011, Miranda 2016) e o processo de reprodução das colônias ocorre via enxameagem (Nogueira-Neto 1954). Miranda (2016) verificou que o aumento do número de colônias de *P. rustica* e *P. helleri* se dá pela reprodução das colônias que originalmente ocuparam determinada área e não pela chegada de novas fêmeas, o que pode ser observado pela ocorrência de muitos haplótipos únicos e exclusivos de localidades.

Portanto, quando uma linhagem rara ocupa determinada área, tal evento pode reproduzir as condições de um efeito fundador (Miranda 2016). Com o passar das gerações, o acúmulo de mutações entre linhagens distintas que ocupam diferentes áreas geográficas e ainda a perda de haplótipos intermediários pode contribuir para o aparecimento de lacunas filogenéticas entre populações de diferentes áreas, principalmente em se tratando de áreas geograficamente distantes e de ocupação realizada por fêmeas de linhagens raras. O padrão de diferenciação observado nas populações ao norte são bons indicativos de que essa hipótese seja verdadeira, uma vez que são encontradas profundas lacunas filogenéticas entre localidades que parecem não apresentar grandes barreiras ao fluxo gênico. As localidades na parte costeira da região central apresentam características semelhantes às do norte, porém bem menos intensas.

A possibilidade de que a fragmentação histórica da Mata Atlântica devido às glaciações ocorridas no Pleistoceno tenha ajudado a moldar a distribuição geográfica das linhagens de *P. helleri* não pode ser descartada. Nesse caso, grupos de populações teriam ficado isolados em refúgios de mata enquanto as savanas se expandiam, aumentando ainda mais as diferenças genéticas entre eles. A diferenciação observada entre e dentro dos filogrupos Centro-Norte, Centro-Oeste e a parte sul do filogrupo Centro-Sul pode ser um indicativo do isolamento entre eles, uma vez que se observa haplótipos pouco divergentes dentro dos grupos e muita divergência entre um grupo e outro.

Segundo Carnaval & Moritz (2008), durante o Último Máximo Glacial (UMG), o bioma Mata Atlântica foi mais estável nas porções central e norte, enquanto a porção sul foi mais instável nesse mesmo período. Dessa forma, ao contrário das porções central e norte, a porção sul reteria menor diversidade genética. Estudos com organismos da Mata Atlântica corroboram essa hipótese (Cabanne *et al.* 2008, Carnaval *et al.* 2009, d’Horta *et al.* 2011). Nesse caso, a maior variação encontrada nas populações de *P. helleri* ao norte e na parte na central (principalmente no estado do Espírito Santo) e a menor variação observada ao sul do

bioma poderiam ser influenciadas por essas zonas de estabilidade e instabilidade ocorridas durante as mudanças climáticas no UMG. No entanto, existe uma dificuldade quanto a essa hipótese, pois a espécie em estudo apresenta ampla plasticidade no que diz respeito a locais de nidificação, tolerância a grandes variações na temperatura e de ambientes modificados. Além do mais, ela não parece apresentar grande dependência de floresta, tendo distribuição também em áreas de Cerrado e sendo facilmente encontrada em ambientes urbanos, principalmente em zonas rurais.

Novas análises se fazem necessárias para que o padrão filogeográfico da espécie *P. helleri* seja melhor estabelecido.

#### **5.4. Inferências demográficas**

Não foi possível inferir sobre possíveis flutuações no tamanho efetivo das populações de todos os filogrupos; ademais, para aqueles filogrupos onde as análises foram realizadas, os resultados obtidos não estão em total concordância. Dessa forma, as informações sobre história demográfica da espécie não foram conclusivas.

Os testes de neutralidade  $F_s$  de  $F_u$  e  $R_2$  não foram significativos para os filogrupos Norte, Centro-Norte e Centro-Oeste. Entretanto, para o filogrupo Centro-Sul foram verificados valores negativos e significativos para o teste  $F_s$  de  $F_u$  e valores próximos de zero para o teste  $R_2$ , o que sugere expansão populacional recente. A rede observada na Figura 8A apresenta formato de estrela para os haplótipos deste filogrupo, principalmente no que diz respeito aos haplótipos verificados na região sul. Segundo Avise (2000), redes com formato de estrela, onde ocorrem um ou mais haplótipos comuns localizados no centro, do(s) qual (is) derivam haplótipos mais raros, divergindo por um ou poucos passos mutacionais, são indicativos de expansão populacional. Nos demais filogrupos, a rede não apresenta sinal de expansão.

A análise BSP evidenciou estabilidade no tamanho efetivo populacional nos filogrupos Centro-Oeste e Centro-Sul. Apesar de o BSP ser uma metodologia mais robusta para detectar flutuações no tamanho populacional ao longo do tempo, as análises para os dois filogrupos apresentaram aumento nos intervalos de confiança próximo ao presente, o que faz com os resultados dessa análise devam ser considerados com cautela.

Diante disso, é provável que o filogrupo Centro-Sul esteja em expansão populacional; quanto ao filogrupo Centro-Oeste, não foi possível extrair conclusões consistentes a este respeito. Considerando a hipótese proposta por Carnaval & Moritz (2008), seria esperado um sinal de expansão mais acentuado nas populações ao sul devido à instabilidade observada nessa região durante o UMG.

### **5.5. Hipótese sobre a origem e dispersão da espécie**

A partir da análise da rede haplotípica e dos índices de diversidade nucleotídica, foi observado que a distribuição da variação foi gradualmente diminuindo do norte em direção ao sul. Ou seja, os haplótipos das localidades ao norte apresentaram maior variação, os haplótipos amostrados na parte central apresentaram variação intermediária, enquanto uma menor variação foi observada nos haplótipos identificados nas amostras da região sul. A rede apresentou vários haplótipos extintos ou não amostrados (mv) principalmente entre aqueles encontrados nas localidades das regiões norte e central, principalmente no sul do Espírito Santo.

A grande variação apresentada pela região norte e ainda a possível perda de haplótipos intermediários ao longo das gerações pode ser um indicativo de que essas populações sejam as mais antigas, podendo ter sido este o ponto de origem da espécie. Analisando ainda a variação retida na região central, é possível observar pela rede haplotípica que ela é maior entre os haplótipos da parte costeira em relação aos do interior. Também existe nessa região

um elevado número de haplótipos extintos ou não amostrados (mv). Sendo essa suposição verdadeira, a espécie *P. helleri* teria sua origem na região norte, dispersando pelo litoral para região central, de onde partiram diferentes linhagens que colonizaram o interior da região central e a região sul. Os haplótipos encontrados nas localidades ITR e AFC (H1, H36, H37 e H38) são intermediários entre os filogrupos Centro-Oeste e Centro-Sul e podem ser mais um indicativo de que a colonização na região central possa ter ocorrido da costa para o interior.

Como é possível observar na rede e no mapa com a distribuição das localidades (Figura 8), existem haplótipos do filogrupo Centro-Oeste (H24, H25 e H42) amostrados ao norte do Rio Doce nas localidades GVL e JAG. Esses haplótipos são mais derivados em relação aos demais desse filogrupo observados no interior de Minas Gerais e sugerem que as linhagens que teriam colonizado o interior estariam recolonizando a parte costeira da região central. Dado o baixo número de localidades (2) e de colônias (7) amostradas ao norte do Rio Doce, não foi possível definir se também ocorrem nesta área haplótipos mais relacionados aos observados ao sul do Espírito Santo.

Se a hipótese de dispersão norte/sul é verdadeira, a expansão verificada pelas análises demográficas e pela rede haplotípica no filogrupo Centro-Sul, principalmente nas localidades mais ao extremo sul, é esperada uma vez que a ocupação dessa região seria mais recente.

Apesar do cromossomo B apresentar seu próprio padrão de evolução, Machado (2016) encontrou variação geográfica nas frequências de cromossomos B em populações de *P. helleri* que se assemelham à distribuição da variação aqui observada. As frequências do cromossomo B diminuíram do norte em direção ao sul e, na região central, assim como observado nesse estudo, a frequência foi maior no Espírito Santo, seguido por Minas Gerais. A autora sugere a hipótese de que os cromossomos B tenham surgido em um grupo ancestral das espécies de *Partamona* que o apresentam. Sendo assim, esse cromossomo já estaria presente na espécie *P.*

*helleri* quando essa se originou. Nesse caso, as populações do norte seriam mais antigas e por isso reteriam maior frequência desses cromossomos, diminuindo em direção ao sul.

Segundo a filogenia proposta para o gênero *Partamona* (Pedro & Camargo 2003, Camargo e Pedro 2003), as espécies mais basais estão distribuídas desde o México até a Floresta Amazônica brasileira e eventos vicariantes datados do Cretáceo podem explicar a divergência entre algumas espécies. Segundo Amorim e Pires (1996), conexões entre as bacias do Parnaíba e Paraná, evento vicariante datado no Cretáceo médio, teria separado a região atlântica das demais regiões amazônicas. Se as primeiras espécies do gênero se originaram nas regiões da América Central, andinas e amazônicas, é possível que a espécie *P. helleri* tenha tido sua origem no norte da distribuição atlântica, após o evento vicariante que separou as porções atlântica e amazônica, dispersando posteriormente até o sul desse bioma.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que as populações de *P. helleri* são altamente estruturadas quando analisadas para genes mitocondriais. Os dados indicam que existam, no mínimo, cinco filogrupos e que o padrão filogeográfico dessa espécie foi fortemente influenciado por características como baixa capacidade de dispersão, baixo fluxo gênico, filopatria das fêmeas, reprodução de colônias por enxameagem e ainda a forma de ocupação de área apresentada pela mesma. Os achados sugerem ainda que as glaciações do Pleistoceno, juntamente com as características já mencionadas, podem ter contribuído para moldar a atual distribuição das linhagens. Foi detectada uma possível expansão no tamanho efetivo populacional do filogrupo Centro-Sul; quanto aos demais filogrupos, não foi possível fazer inferências acerca de flutuações demográficas. Os resultados também permitiram inferir uma hipótese sobre a origem e dispersão da espécie que pode ter ocorrido do norte em direção ao sul. Além disso, foi possível verificar a confirmação da hipótese de que a ocupação de área por *Partamona* se dá pela chegada de uma ou poucas fêmeas fundadoras, hipótese esta que vem sendo testada e confirmada em nosso laboratório para diferentes espécies do gênero.

Poucos são os estudos filogeográficos envolvendo abelhas, principalmente as da tribo Meliponini. Uma vez confirmado o padrão filogeográfico aqui sugerido, esses resultados podem representar um grande avanço para estudos filogeográficos com abelhas desta tribo, uma vez que praticamente todas as características que parecem influenciar no padrão filogeográfico de *P. helleri* são também comuns a outras espécies. No entanto, novas análises são necessárias para que a história evolutiva da espécie *P. helleri* seja compreendida de forma mais completa.

A utilização da filogeografia multilocos parece ser uma boa alternativa para alcançar tal objetivo. Os marcadores nucleares parecem apresentar robustez na reconstrução da história evolutiva das espécies e, além do mais, atualmente têm sido desenvolvidos algoritmos que se

adaptam aos problemas relacionados com o uso desses marcadores (Brito & Edwards 2009). Inclusive, o gene nuclear Fator de Elongação da Tradução (EF1a) (Kawakita *et al.* 2003) foi padronizado para *P. helleri* por Miranda (2012). Outros genes nucleares também vêm sendo testados em nosso laboratório. Como já mencionado, a espécie em estudo apresenta dispersão sexo assimétrica, em que o fluxo gênico é realizado pelos machos enquanto as fêmeas apresentam comportamento filopátrico e o uso de marcadores nucleares incluiria aos resultados a contribuição dos machos para a história evolutiva.

Com maior quantidade de informações genéticas, existe maior possibilidade de a reconstrução filogenética apresentar melhor resolução, o que permitiria uma compreensão mais consistente sobre como as linhagens estão organizadas e ainda se há congruência entre as mesmas e sua distribuição espacial. Dessa forma, seria possível tirar conclusões mais robustas sobre a atual organização da estrutura genética das populações de *P. helleri*. Uma filogenia bem resolvida ainda seria útil para confirmação sobre a hipótese de origem e dispersão aqui proposta, uma vez que poderiam ser realizadas inferências sobre linhagens mais recentes e mais antigas.

Com as linhagens bem definidas, seria possível estimar o tempo de divergência entre elas. Uma vez conhecida onde e quando a divergência ocorreu, é possível, através de associações com conhecimentos geológicos e climáticos, por exemplo, a compreensão de como a diversificação das linhagens pode ter ocorrido (Miyaki 2009), o que permitiria verificar se esses eventos são congruentes com o UMG.

Por fim, ainda poderia ser sugerida a modelagem de nicho ecológico para identificar áreas potenciais para distribuição da espécie tanto no presente como no passado, durante o Último Inter Glacial (120 ka), Último Máximo Glacial (21 ka) e Médio Holoceno (6 ka). Essa análise poderia ajudar a melhor compreender se a fragmentação de habitat durante os ciclos glaciais interferiram na atual distribuição das linhagens de *P. helleri*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ab'Saber AN (1990) Paleoclimas Quaternários e pré-história da América tropical I. *Revista Brasileira de Biologia* 50: 805-820.
- Ahrné K, Bengtsson J, Elmqvist T (2009) Bumble bees (*Bombus* spp) along a gradient of increasing urbanization. *PLoS ONE* 4: e5574.
- Alberdi A, Gilbert MTP, Razgour O, Aizpurua O, Aihartza J, Garin I (2015) Contrasting population-level responses to Pleistocene climatic oscillations in an alpine bat revealed by complete mitochondrial genomes and evolutionary history inference. *Journal of Biogeography* 42: 1689–1700.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Amorim DS, Pires MRS (1996) Neotropical biogeography and method for maximum biodiversity estimation. *In: Bicudo CE, Menezes NA (eds.) Biodiversity in Brazil, a first approach.* CNPq, São Paulo, 183-219.
- Araújo ED, Costa M, Chaud-Netto J, Fowler HG (2014) Body size and flight distance in stingless bee (Hymenoptera: Meliponini): inference off light range and possible ecological implications. *Brazilian Journal of Biology* 64: 563-568.
- Arias MC, Francisco FO, Silvestre D (2003) O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. p. 305-309. *In: Melo GAR, Alves-dos-Santos I (eds.) Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure.* UNESCO, Criciúma, 306-309.
- Awise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NP (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.

- Avice JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA. 447 p.
- Avice JC (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36: 3-15.
- Ballard JWO, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13:729–744.
- Bandelt HJ, Peter F, Arne R. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution* 16: 37-48.
- Batalha-Filho H, Cabanne GS, Miyaki CY (2012). Phylogeography of an Atlantic forest passerine reveals demographic stability through the last glacial maximum. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 892-902.
- Batalha-Filho H, Miyaki CY (2011) Filogeografia da Mata Atlântica. *Revista da Biologia* 7: 31-34.
- Batalha-Filho H, Miyaki CY (2014) Processos evolutivos na Amazônia e na Mata Atlântica. *Fronteiras-Journal of Social, Technological and Environmental Science* 3: 34-44.
- Batalha-Filho H, Waldschmidt AM, Campos LAO, Tavares MG, Fernandes-Salomão TM (2010) Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie* 41: 534-547.
- Behling H (2002) South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 177: 19–27.
- Behling H, Lichte M (1997) Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times in tropical southeastern Brazil. *Quaternary Research* 48: 348–358.
- Behling H, Pillar VDP (2007) Late Quaternary vegetation, biodiversity and fire dynamics on the southern Brazilian highland and their implication for conservation and management

of modern Araucaria forest and grassland ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 362: 243–251.

Brito PH, Edwards SV (2009) Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica* 135: 439-455.

Brito RM, Francisco FO, Santiago E, Rodrigues L, Arias MA (2013) Very low mitochondrial variability in a stingless bee endemic to cerrado. *Genetics and Molecular Biology* 36:124-128.

Brito RM (2005) Análise molecular e populacional de *Partamona mulata* (Moure In Camargo, 1980) e *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 189 p.

Brown KS, Ab'Saber AN (1979). Ice-age refuges and evolution in the Neotropics: correlation of paleoclimatological, geomorphological and pedological data with modern biological endemism. *Paleoclimas* 5: 1-30.

Brown WM, George MJr, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76: 1967-1971.

Brusca RC, Brusca GJ (2007) *Invertebrados*. 2. ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. 1098 p.

Cabanne GS, d'Horta FM, Sari EHR, Santos FR, Miyaki CY (2008) Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 760-773.

Cabanne GS, Sari EHR, Meyer D, Santos FR, Miyaki CY (2013) Matrilineal evidence for demographic expansion, low diversity and lack of phylogeographic structure in the Atlantic forest endemic greenish schiffornis *Schiffornis virescens* (Aves: Tityridae). *Journal of Ornithology* 154: 371–384.

- Camargo JMF, Pedro SRM (2003) Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera: Apidae, Apinae) – bionomia e biogeografia. *Revista Brasileira de Entomologia* 47: 311-372.
- Cane JH, Tepedino VJ (2001) Causes and extent of declines among native North America invertebrate pollinators: detection, evidence and consequences. *Conservation Ecology* 5: 1-10.
- Cardoso PFM (2016) Colonização e dispersão nos sítios de ocorrência, a genética das populações e história natural de *Partamona ailyae* Camargo, 1980 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 90 p.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* 323: 785-789.
- Carnaval AC, Moritz C (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* 35: 1187-1201.
- Carvalho-Zilse GA, Kerr WE (2004) Substituição natural de rainhas fisogástricas e distância de vôo dos machos de tíuba (*Melipona compressipes fasciculata* Smith, 1854) e urucu (*Melipona scutellaris* Latreille, 1811) (Apidae, Meliponini). *Acta Amazonica* 34: 649-652.
- Corander J, Waldmann P, Sillanpää MJ (2003) Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* 136: 367-374.
- Crozier RH & Crozier YC (1993). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics* 33: 97-117
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772-772.

- Dick KA, Deppert K, Larsson MW, Mårtensson T, Seifert W, Wallenberg LR, Samuelson L (2004) Synthesis of branched 'nanotrees' by controlled seeding of multiple branching events. *Nature materials* 3: 380-384.
- Diniz-Filho JAF, Fuchs S, Arias MC (1999) Phylogeographical autocorrelation of phenotypic evolution in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Heredity* 83: 671-680.
- d'Horta F, Cabanne GS, Meyer D, Miyaki CY (2011). The genetic effects of late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic forest passerine. *Molecular Ecology* 20: 1932-1935.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2571-2581.
- Engels W, Imperatriz-Fonseca VL (1990) Caste development, reproductive strategies and control of fertility in honeybees and stingless bees, p. 165-230. *In*: Engels W (ed.) *Social Insects: an Evolutionary Approach to Castes and Reproduction*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, 167-230.
- Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resource* 10: 564-567.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Fernandes CRM, Martins CF, Ferreira KM, Del Lama MA (2012) Gene variation, population differentiation, and sociogenetic structure of nests of *Partamona seridoensis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Biochemical genetics* 50: 325-335.

- Ferreira KM (2011) A colonização de uma área por espécies de abelhas sem ferrão. Um Estudo de Caso: *Partamona helleri* (Friese, 1990) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 114 p.
- Fetridge E, Ascher JS, Langellotto G (2008) The bee fauna of residential gardens in a suburb of New York City (Hymenoptera: Apoidea). *Annals of the Entomological Society of America* 101: 1067-1077.
- Francisco FO, Santiago LR, Arias MC (2013) Molecular genetic diversity in populations of the stingless bee *Plebeia remota*: A case study. *Genetics and Molecular Biology* 36: 118-123.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Galindo-leal C, Câmara IG (2005) Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. Capítulo 1. *In: Galindo-Leal C e Câmara IG (eds.) Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo - Conservação Internacional, Belo Horizonte, 3-11.*
- Gilbert MTP, Drautz ID, Lesk AM, Ho SYW, Qi J, Ratan A, Hsu C, Sher A. *et al.* (2008) Intraspecific phylogenetic analysis of Siberian woolly mammoths using complete mitochondrial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105: 8327-8332.
- Haffer J (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165: 131-137.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Heled J, Drummond AJ (2010) Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution* 27: 570-580.

- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST (2005) Isolation by distance web service v.3.23. *BMC Genetics* 6: 13. <http://ibdws.sdsu.edu/>.
- Kawakita A, Sota T, Ascher JS, Ito M, Tanaka H, Kato M (2003) Evolution and phylogenetic utility of alignment gaps within intron sequences of three nuclear genes in bumble bees (*Bombus*). *Molecular Biology Evolution* 20: 87-92.
- Kerr WE, Lello E (1962) Sting glands in stingless bees a vestigial character (Hymenoptera: Apoidea). *Journal of the New York Entomological Society* 70: 190-214.
- Kerr WE, Carvalho GA, Nascimento VA (1996) *Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação*. Fundação Acangaú, Belo Horizonte, MG. 144 p.
- Kerr WE, Carvalho GA, Silva AC, Assis MGP (2001) Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parceiras Estratégicas* 12: 20-41.
- Lanfear R, Calcott B, Ho SYW, Guindon S (2012) PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1695-1701.
- Langenheim JH, Lee Y-T, Martin SS (1973) An evolutionary and ecological perspective of Amazonia Hylaea species of Hymenaea (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Acta Amazonica* 3: 5-38.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Luz DRD (2011) *Filogenia molecular e filogeografia de Schwarziana Moure (Hymenoptera, Apidae)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 74 p.

- Machado DP (2016) cromossomos B no gênero *Partamona* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): ocorrência transmissão e origem. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 75 p.
- Machado CA, Jouselin E, Kjellberg F, Compton SG, Herre EA (2001) Phylogenetic relationships, historical biogeography and character evolution of fig-pollinating wasps. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268:685-694.
- Martins CCC, Duarte OMP, Waldschmidt AM, Alves RMDO, Costa MA (2009) New occurrence of B chromosomes in *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Meliponini). *Genetics and Molecular Biology* 32: 782-785.
- Martins CCC, Waldschmidt AM, Costa MA (2014) Unprecedented record of ten novel B chromosomes in the stingless bee *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini). *Apidologie* 45: 431-439.
- Matteson KC, Ascher JS, Langellotto GA (2008) Bee richness and abundance in New York City urban gardens. *Annals of the Entomological Society of America* 101: 140-150.
- Melo MS, Fernandes LA, Coimbra AM, Ramos RGN (1989) O Graben (Terciário?) de Sete Barras, Vale do Ribeira do Iguape, SP. *Revista Brasileira de Geociências* 19: 260-262.
- Michener CD (2007) *The Bees of the World*. 2. ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD. 953 p.
- Miyaki CY (2009) Filogeografia e a descrição da diversidade genética da fauna brasileira. *Megadiversidade* 5: 96-100.
- Miranda EA (2016) História natural, biogeografia e a genética de populações de *Partamona rustica*, uma abelha endêmica de florestas secas do Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 129 p.

- MMA (2002) Avaliação e Identificação de Áreas e Ações Prioritárias Para a Conservação, Utilização Sustentável e Repartição dos Benefícios da Biodiversidade nos Biomas Brasileiros. Brasília: MMA/SBF.
- Moreau CS, Bell CD, Vila R, Archibald SB, Pierce NE (2006) Phylogeny of the ants: Diversification in the age of angiosperms. *Science* 312: 101-104.
- Moritz C, Patton JL, Schneider CJ e Smith TB (2000) Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31: 533-563.
- Moritz C (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic biology* 51: 238-254.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nates-Parra G (2005) Biodiversidad y meliponicultura en el piedemonte llanero, Meta, Colombia. IV Seminario y Taller Mesoamericano sobre abejas sin aguijón. El Salvador.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, NY. 512 p.
- Nei M, Miller JC (1990) A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics* 125: 873-879.
- Niemelä J (2000) Is there a need for a theory of urban ecology? *Urban Ecosystems* 3: 57-65.
- Niemelä J, Kotze J, Ashwoeth A, Brandmayr P, Desender K, New T, Penev L, Samways M, Spence J (2000) The search for common anthropogenic impacts on biodiversity: a global network. *Journal of Insect Conservation* 4: 3-9.
- Nogueira-Neto P (1997) *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. Nogueirapis, São Paulo, SP. 446 p.

- Palumbi SR, Cipriano F, Hare MP (2001) Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data: the three-times rule. *Evolution* 55: 859-868.
- Pedro SRM (2014) The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 6: 348-354.
- Pedro SRM, Camargo JMF (2003) Meliponini neotropicais: O gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Revista Brasileira de Entomologia* 47: 1-117.
- Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite AN, Morando M, Yassuda YY, Sites JW (2005) Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 13–26.
- Pereira JBS, Almeida JR (1996) Biogeografia e Geomorfologia. *In*: Guerra AJT, Cunha SB (eds.) *Geomorfologia e Meio Ambiente*. Bertrand Brasil, Rio de Janeiro, 195-247.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Rambaut A (2014) Figtree, version 1.4.2. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Rambaut A, Drummond AJ (2009) Tracer, version 1.5. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>.
- Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19: 2092-2100.
- Raven PH, Axelrod DI (1974) Angiosperm biogeography and past continental movements. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61: 539-673.
- Resende HC, Yotoko KSC, Delabie JHC, Costa MA, Campiolo S, Tavares MG, Campos LAO, Fernandes-Salomão TM (2010) Pliocene and Pleistocene events shaping the

- genetic diversity within the central corridor of the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 101: 949–960.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 42:1141-1153.
- Roig-Juñent S, Domínguez MC, Flores GE, Mattoni C (2006) Biogeographic history of South American arid lands: A view from its arthropods using TASS analysis. *Journal of Arid Environments* 66: 404-420.
- Saadi, A, Machette MN, Haller KM, Dart RL, Bradley L, Souza AMPD (2002) Map and Database of Quaternary faults and Lineaments in Brazil. International Lithosphere Program Task Group II-2 Co-Chairman (Western Hemisphere), Denver, CO. 51 p.
- Silva JMC & Bates JM (2002) Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: A tropical savanna hotspot. *BioScience* 52: 225-233.
- Silveira FA, Melo GAR, Almeida EAB (2002) *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. Fernando A. Silveira, Belo Horizonte, MG. 253 p.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu HE, Flood 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: 651-701.
- Sheppard WS, McPheron BA (1991) Ribosomal DNA diversity in Apidae. In: Smith DR (Ed) "Diversity in the genus *Apis*". Westview, Boulder, CO. 89-102.
- Soucy SL, Danforth BN (2002) Phylogeography of the socially polymorphic sweat bee *Halictus rubicundus* (Hymenoptera: Halictidae). *Evolution* 56: 330-341.
- Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.

- Sukopp H (2002) On the early history of urban ecology in Europe. *Preslia, Praha*. 74: 373-393.
- Thomé MTC, Zamudio KR, Giovanelli JGR, Haddad CFB, Baldissera Jr FA, Alexandrino JMB (2010) Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 1018–1031.
- Thompson JD, Desmond GH, Toby JG (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Thomson D (2004) Competitive interactions between the invasive European honey bee and native bumble bees. *Ecology* 85: 458-470.
- Tylianakis JM (2013) The global plight of pollinators. *Science* 339: 1532-1533.
- Vanzolini PE, Williams EE (1970) South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria: Iguanidae). *Arquivos de Zoologia de São Paulo* 19: 1-298.
- Vawter L, Brown WM (1986) Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science* 234: 194-196.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506-513.
- Wille A, Orozco E (1975) Observations on the founding of a new colony by *Trigona cupira* (Hymenoptera: Apidae) in Costa Rica. *Revista de Biologia Tropical* 22: 253-287.
- Whitehorn PR, O'Connor S, Wackers FL, Goulson D (2012) Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* 336: 351-352.
- Whitmore TC, Prance GT (1987) *Biogeography and Quaternary history in tropical America*. Clarendon Press, Oxford, UK 3: 175–196.

Zanette LRS, Martins RP, Ribeiro SP (2005) Effects of urbanization on Neotropical wasp and bee assemblages in a Brazilian metropolis. *Landscape and Urban Planning* 71: 105-121.

Zanette LRS, Soares LA, Pimenta HR, Gonçalves A, Martins RP (2004) Nesting biology and sex ratios of *Auplopus militaris* (Lynch-Arribalzaga 1873) (Hymenoptera Pompilidae). *Tropical Zoology* 17: 145-154.

## APÊNDICE

Tabela 9. Distribuição dos haplótipos nas localidades amostradas.

UF	Localidade	Cod.	Haplótipos			
			COI	CytB	12S	Concatenados
	Salvador	SAL2	1	1	1	57
	Salvador	SAL3	1	1	1	57
	Salvador	SAL4	1	1	1	57
	Salvador	SAL5	1	1	1	57
	Salvador	SAL6	1	1	1	57
	Salvador	SAL7	1	1	1	57
	Salvador	SAL8	1	1	1	57
	Salvador	SAL9	1	1	1	57
	Salvador	SAL10	1	1	1	57
	Cravolândia	CRA1	2	2	2	18
	Cravolândia	CRA2	2	2	2	18
	Cravolândia	CRA3	2	2	2	18
	Cravolândia	CRA4	2	2	2	18
	Cravolândia	CRA5	2	3	2	19
	Jequié	JEQ1	4	5	2	43
	Jequié	JEQ2	4	5	2	43
	Jequié	JEQ3	4	x	2	x
	Jequié	JEQ4	4	5	2	43
BA	Apuarema	APU1	3	4	2	6
	Jitaúna	JIT1	3	x	2	x
	Jitaúna	JIT2	3	x	2	x
	Camamu	CMU1	5	6	2	16
	Ubatã	UBA1	6	5	2	67
	Uruçuca	URU1	7	7	2	69
	Uruçuca	URU2	7	7	2	69
	Itapevi	ITP1	10	10	4	35
	Itapevi	ITP2	10	10	4	35
	Uma	UNA1	8	8	2	68
	Canavieiras	CNV1	9	9	3	17
	Canavieiras	CNV2	9	9	3	17
	Porto Seguro	PSE1	x	11	x	x
	Porto Seguro	PSE2	11	11	5	54
	Porto Seguro	PSE3	11	11	5	54
	Porto Seguro	PSE4	11	11	5	54
	Caravelas	CAR1	12	12	5	14
	Caravelas	CAR2	12	12	5	14
	Itambacuri	ITE1	13	13	3	28
	Carlos Chagas	CCH1	13	14	3	15
	Rio Vermelho	RIV1	13	15	3	55
MG	Rio Vermelho	RIV3	13	15	3	55
	Rio Vermelho	RIV10	13	15	3	55
	Rio Vermelho	RIV15	13	15	3	55

	Rio Vermelho	RIV23	13	15	3	55
	Rio Vermelho	RIV11	14	16	3	56
	Rio Vermelho	RIV29	14	16	3	56
	Rio Vermelho	RIV99	13	15	3	55
	Porto Firme	POR1	29	19	3	52
	Porto Firme	POR2	29	19	3	52
	Porto Firme	POR3	29	19	3	52
	Porto Firme	POR4	29	19	3	52
	Porto Firme	POR5	29	19	3	52
	Porto Firme	POR6	29	19	3	52
	Porto Firme	POR7	29	19	3	52
	Porto Firme	POR8	29	19	3	52
	Paraopeba	PPB1065	18	19	3	53
	Paraopeba	PPB1063	18	19	3	53
	Paraopeba	PPB1064	18	19	3	53
	Silvestre	SIL35	31	19	3	59
	Silvestre	SIL36	31	19	3	59
	Silvestre	SIL37	31	19	3	59
	Silvestre	SIL38	31	19	3	59
MG	Teixeira	TEI9	28	29	3	65
	Teixeira	TEI10	28	29	3	65
	Teixeira	TEI11	28	29	3	65
	Teixeira	TEI12	28	29	3	65
	Teixeira	TEI13	28	29	3	65
	Tiradentes	TIR59	18	19	3	53
	Tiradentes	TIR60	18	19	3	53
	Tiradentes	TIR61	18	19	3	53
	Viçosa	VIC14	31	19	3	59
	Viçosa	VIC15	31	19	3	59
	Viçosa	VIC16	31	19	3	59
	Viçosa	VIC17	31	19	3	59
	Viçosa	VIC18	31	19	3	59
Viçosa	VIC19	31	19	3	59	
Viçosa	VIC20	31	19	3	59	
Viçosa	VIC21	31	19	3	59	
Viçosa	VIC22	31	19	3	59	
Viçosa	VIC23	31	19	3	59	
Viçosa	VIC24	31	19	3	59	
Viçosa	VIC25	31	19	3	59	
Viçosa	VIC26	31	19	3	59	
Viçosa	VIC27	31	19	3	59	
Viçosa	VIC28	31	19	3	59	
Viçosa	VIC29	31	19	3	59	
Viçosa	VIC30	31	19	3	59	
Viçosa	VIC32	28	29	3	65	
Viçosa	VIC33	28	29	3	65	

	Viçosa/UFV	VIC1	29	19	3	52
	Viçosa/UFV	VIC2	31	19	3	59
	Viçosa/UFV	VIC3	31	19	3	59
	Viçosa/UFV	VIC4	31	19	3	59
	Viçosa/UFV	VIC5	31	19	3	59
	Viçosa/UFV	VIC31	31	19	3	59
	Viçosa/UFV	VIC56	31	19	3	59
	Viçosa/UFV	VIC57	31	19	3	59
	Viçosa/UFV	VIC58	29	19	3	52
	Viçosa/UFV	VIC590	29	19	3	52
	Viçosa/UFV	VIC591	29	19	3	52
	Viçosa/UFV	VIC603	31	19	3	59
	Viçosa/UFV	VICFA	31	19	3	59
	Viçosa/UFV	VICG15	31	19	3	59
	Viçosa/UFV	VICSN	31	19	3	59
	Viçosa/UFV	VICSN2	31	19	3	59
	São Miguel do Anta	SMA39	31	19	3	59
	São Miguel do Anta	SMA40	31	19	3	59
	São Miguel do Anta	SMA41	31	19	3	59
MG	São Miguel do Anta	SMA42	31	19	3	59
	São Miguel do Anta	SMA43	32	19	3	60
	São Miguel do Anta	SMA44	32	19	3	60
	São Miguel do Anta	SMA45	32	19	3	60
	São Miguel do Anta	SMA46	32	19	3	60
	São Miguel do Anta	SMA47	32	19	3	60
	São Miguel do Anta	SMA48	32	19	3	60
	São Miguel do Anta	SMA49	32	19	3	60
	São Miguel do Anta	SMA50	32	19	3	60
	São Miguel do Anta	SMA51	32	19	3	60
	São Miguel do Anta	SMA52	32	19	3	60
	São Miguel do Anta	SMA53	32	19	3	60
	São Miguel do Anta	SMA54	32	19	3	60
	São Miguel do Anta	SMA55	32	19	3	60
	Muzambinho	MUZ1	18	33	3	50
	Muzambinho	MUZ2	18	33	3	50
	Muzambinho	MUZ3	18	33	3	50
	Muzambinho	MUZ4	18	33	3	50
	Muzambinho	MUZ5	18	33	3	50
	Muzambinho	MUZ6	18	33	3	50
	Muzambinho	MUZ7	18	33	3	50
	Muzambinho	MUZ8	18	33	3	50
	Muzambinho	MUZ9	18	33	3	50
	Muzambinho	MUZ10	18	33	3	50
	Muzambinho	MUZ12	18	33	3	50
	Muzambinho	MUZ13	18	33	3	50
ES	Vargem Alta	VAL1	30	30	3	71

	Vargem Alta	VAL2	19	30	3	72
	Vargem Alta	VAL3	19	30	3	72
	Vargem Alta	VAL4	30	30	3	71
	Vargem Alta	VAL5	19	30	3	72
	Vargem Alta	VAL6	19	30	3	72
	Vargem Alta	VAL7	19	30	3	72
	Vargem Alta	VAL8	19	30	3	72
	Vargem Alta	VAL9	19	30	3	72
	Vargem Alta	VAL10	19	30	3	72
	Venda Nova do Imigrante	VNO1	26	20	3	12
	Venda Nova do Imigrante	VNO2	26	20	3	12
	Venda Nova do Imigrante	VNO3	26	20	3	12
	Venda Nova do Imigrante	VNO4	26	20	3	12
	Venda Nova do Imigrante	VNO5	26	20	3	12
	Venda Nova do Imigrante	VNO6	26	20	3	12
	Venda Nova do Imigrante	VNO7	19	27	3	73
	Venda Nova do Imigrante	VNO9	26	20	3	12
	Venda Nova do Imigrante	VNO10	26	20	3	12
ES	Castelo	CAS1	26	20	3	12
	Castelo	CAS2	26	20	3	12
	Castelo	CAS3	26	23	3	13
	Castelo	CAS4	26	20	3	12
	Castelo	CAS5	26	20	3	12
	Castelo	CAS6	26	20	3	12
	Conceição do Castelo	CCA1	26	20	3	12
	Conceição do Castelo	CCA2	26	20	3	12
	Conceição do Castelo	CCA3	26	20	3	12
	Conceição do Castelo	CCA4	26	20	3	12
	Conceição do Castelo	CCA5	26	20	3	12
	Conceição do Castelo	CCA6	26	20	3	12
	Conceição do Castelo	CCA7	26	20	3	12
	Itaguaçu	ITG2	20	21	7	29
	Itaguaçu	ITG3	21	22	7	30
	Itaguaçu	ITG4	20	23	7	31
	Itaguaçu	ITG5	21	21	7	32
	Itaguaçu	ITG6	21	21	7	32
	Itaguaçu	ITG7	22	21	7	33
	Itarana	ITR1	23	22	3	36
	Itarana	ITR2	23	20	3	38
	Itarana	ITR3	23	22	3	36
	Itarana	ITR4	23	22	3	36
	Itarana	ITR5	23	22	3	36
	Itarana	ITR6	23	22	3	36
	Itarana	ITR7	19	24	3	39
	Itarana	ITR8	19	24	3	39
	Itarana	ITR9	19	24	3	39

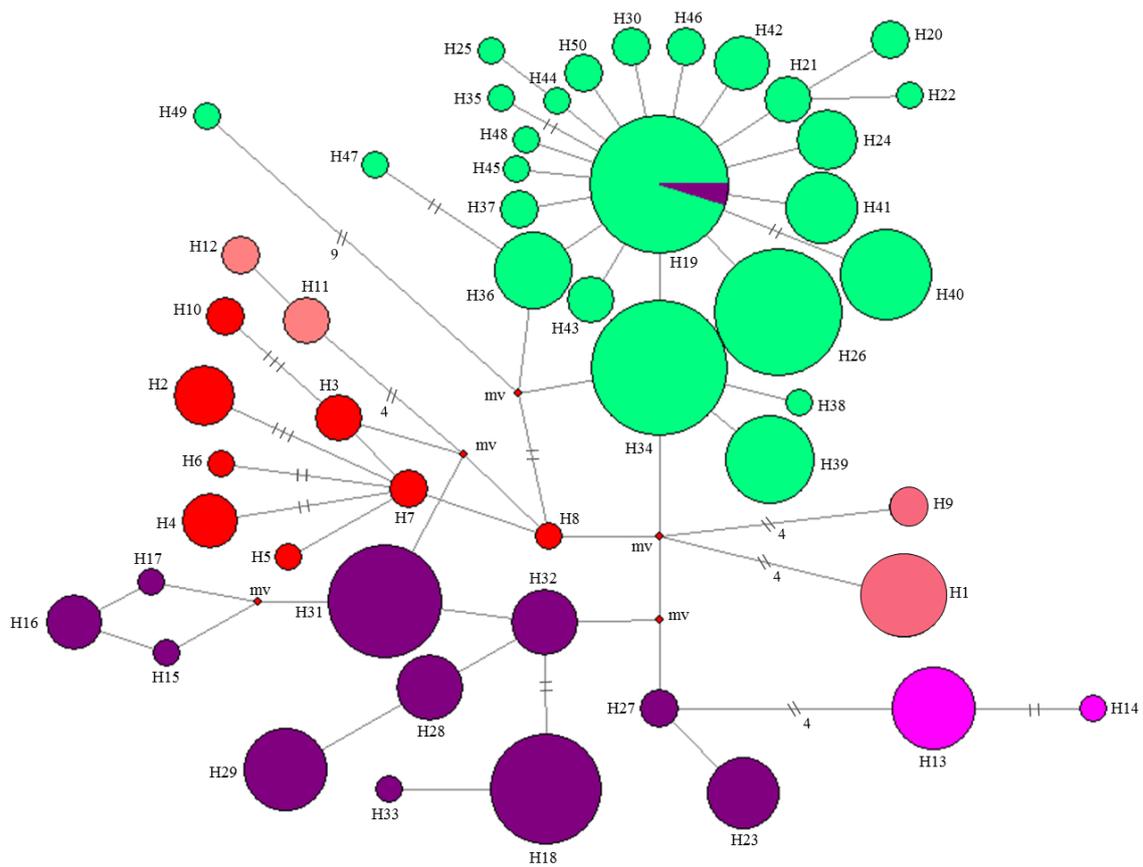
	Itarana	ITR15	23	22	6	37
	Santa Tereza	STE2	19	25	3	62
	Santa Tereza	STE3	19	24	3	39
	Santa Tereza	STE4	19	24	3	39
	Santa Tereza	STE5	24	26	6	63
	Santa Tereza	STE6	24	26	6	63
	Santa Tereza	STE7	24	26	8	64
	Santa Tereza	STE8	24	26	6	63
	Santa Tereza	STE9	24	26	6	63
ES	Santa Tereza	STE12	19	24	3	39
	Governador Lindenberg	GVL1	16	18	3	24
	Governador Lindenberg	GVL3	16	18	3	24
	Governador Lindenberg	GVL5	16	18	3	24
	Governador Lindenberg	GVL7	16	18	3	24
	Governador Lindenberg	GVL9	17	18	3	25
	Afonso Cláudio	AFC1	27	28	3	1
	Afonso Cláudio	AFC2	27	28	3	1
	Alfredo Chaves	ALF5	25	20	3	2
	Jaguaré	JAG1	15	17	3	42
	Linhares	LIN2	19	20	6	47
	Linhares	LIN3	19	20	6	47
	Linhares	LIN6	19	20	6	47
	Linhares	LIN8	19	20	6	47
	Linhares	LIN9	19	20	6	47
	Parati	PAR1	38	32	9	51
	Cachoeira do Macacu	CAM1	36	35	3	11
	Petrópolis	PET1	19	x	x	x
	Petrópolis	PET2	19	x	x	x
RJ	Maricá	MAR1	19	20	9	5
	Maricá	MAR3	37	20	9	48
	Maricá	MAR4	19	20	9	5
	Maricá	MAR5	37	36	9	49
	Aldeia Velha	ALV1	35	34	3	3
	USP/Ribeirão Preto	URP1	34	32	3	66
	USP/Ribeirão Preto	URP4	34	32	3	66
	USP/Ribeirão Preto	URP5	34	32	3	66
	USP/Ribeirão Preto	URP9	34	32	3	66
	USP/Ribeirão Preto	URP10	34	32	3	66
	USP/Ribeirão Preto	URP11	34	32	3	66
	USP/Ribeirão Preto	URP13	34	32	3	66
	USP/Ribeirão Preto	URP16	34	32	3	66
	USP/Ribeirão Preto	URP17	34	32	3	66
	USP/Ribeirão Preto	URP18	34	32	3	66
	USP/Ribeirão Preto	URP19	34	32	3	66
	USP/Ribeirão Preto	URP20	34	32	3	66
	USP/Ribeirão Preto	URP21	34	32	3	66

	USP/Ribeirão Preto	URP22	34	32	3	66
	USP/Ribeirão Preto	URP23	34	32	3	66
	USP/Ribeirão Preto	URP24	34	32	3	66
	USP/Ribeirão Preto	URP25	34	32	3	66
	USP/São Paulo	USP1	39	20	3	70
	USP/São Paulo	USP2	39	20	3	70
	USP/São Paulo	USP4	39	20	3	70
	USP/São Paulo	USP5	39	20	3	70
	USP/São Paulo	USP6	39	20	3	70
	USP/São Paulo	USP7	39	20	3	70
	USP/São Paulo	USP8	39	20	3	70
	USP/São Paulo	USP9	39	20	3	70
	USP/São Paulo	USP10	39	20	3	70
	USP/São Paulo	USP11	39	20	3	70
	USP/São Paulo	USP14	39	20	3	70
	UFSCar/São Carlos	UFS1	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS2	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS3	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS4	34	32	3	66
SP	UFSCar/São Carlos	UFS6	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS8	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS9	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS11	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS13	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS14	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS15	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS16	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS17	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS19	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS20	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS21	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS22	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS23	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS24	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS25	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS28	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS29	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS30	34	32	3	66
	UFSCar/São Carlos	UFS31	34	32	3	66
	São Sebastião	SSE1	34	20	9	61
	Batatais	BAT1	33	31	3	9
	Itanhaém	ITN1	40	37	9	34
	Itanhaém	ITN2	40	37	9	34
	Itanhaém	ITN3	40	37	9	34
	Itanhaém	ITN4	40	37	9	34
	Itanhaém	ITN5	40	37	9	34

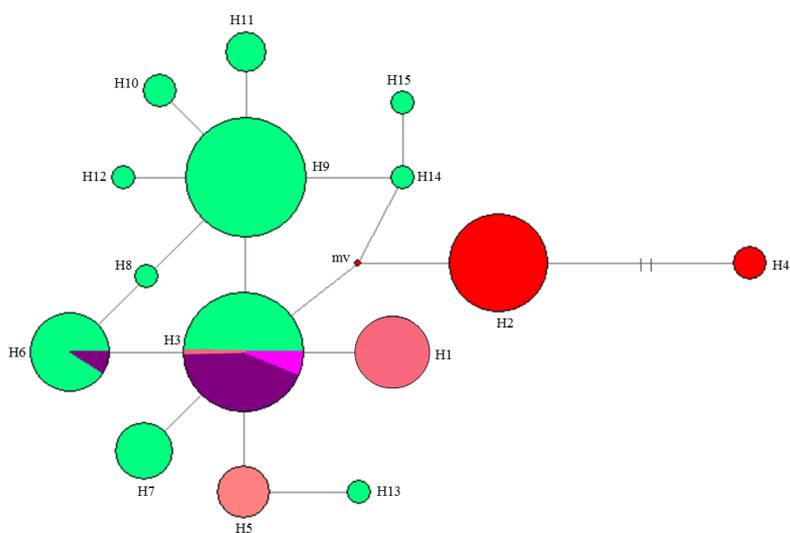
	Itanhaém	ITN6	40	37	9	34
	Itanhaém	ITN7	40	37	9	34
	Itanhaém	ITN8	40	37	9	34
	Itanhaém	ITN9	40	37	9	34
	Itanhaém	ITN10	40	37	9	34
	Itariri	ITRR1	40	37	9	34
	Itariri	ITRR2	19	38	9	41
	Itariri	ITRR3	19	38	9	41
	Itariri	ITRR4	19	38	9	41
	Itariri	ITRR5	19	38	9	41
	Itariri	ITRR6	19	38	9	41
	Itariri	ITRR7	41	20	9	40
	Itariri	ITRR8	41	20	9	40
SP	Itariri	ITRR9	41	20	9	40
	Itariri	ITRR10	41	20	9	40
	Iguape	IGP1	42	20	9	26
	Iguape	IGP2	19	20	9	5
	Iguape	IGP3	19	20	9	5
	Iguape	IGP4	42	20	9	26
	Iguape	IGP5	42	20	9	26
	Iguape	IGP6	42	20	9	26
	Iguape	IGP7	19	32	9	27
	Iguape	IGP8	19	32	9	27
	Iguape	IGP9	19	32	9	27
	Iguape	IGP10	19	32	9	27
	Pedro de Toledo	PDT1	41	20	9	40
	Pedro de Toledo	PDT2	41	20	9	40
	Pedro de Toledo	PDT3	41	20	9	40
	Guaraqueçaba	GUA1	43	20	9	21
	Guaraqueçaba	GUA2	19	20	9	5
	Guaraqueçaba	GUA3	43	20	9	21
	Guaraqueçaba	GUA4	44	20	9	22
	Guaraqueçaba	GUA5	19	20	9	5
	Guaraqueçaba	GUA6	45	20	9	23
	Antonina	ANT1	19	39	9	4
	Antonina	ANT2	19	20	9	5
PR	Antonina	ANT3	19	39	9	4
	Antonina	ANT4	19	20	9	5
	Antonina	ANT5	19	20	9	5
	Antonina	ANT6	19	20	9	5
	Antonina	ANT7	19	20	9	5
	Antonina	ANT8	19	20	9	5
	Matinhos	MAT1	19	20	9	5
	Matinhos	MAT2	19	20	9	5
	Matinhos	MAT3	19	20	9	5
	Guaratuba	GRT1	19	20	9	5

PR	Guaratuba	GRT2	19	20	9	5
	Guaratuba	GRT3	19	20	9	5
	Morretes	MOR1	43	20	9	21
	Telêmaco Borba	TLM1	34	32	3	66
	Telêmaco Borba	TLM2	34	32	3	66
	Telêmaco Borba	TLM3	34	32	3	66
SC	Rio do Sul	SIG1	48	20	9	58
	Rio do Sul	SIG2	19	20	9	5
	Rio do Sul	SIG3	19	20	9	5
	Rio do Sul	SIG4	19	x	9	X
	Joinville	JOI1	36	20	9	44
	Joinville	JOI2	36	20	10	45
	Joinville	JOI3	46	20	9	46
	Joinville	JOI4	36	20	10	45
	Joinville	JOI5	19	20	9	5
	Joinville	JOI6	46	20	9	46
	Joinville	JOI7	36	20	9	44
	Joinville	JOI8	36	20	9	44
	Joinville	JOI9	36	20	9	44
	Joinville	JOI10	36	20	9	44
	Botuverá	BTV1	19	20	11	10
	Guabiruba	GBR1	19	20	11	10
	Gaspar	GAS1	19	40	12	20
	Massaranduba	MSS1	19	20	9	5
	Florianópolis	FLO1	49	x	13	X
	Blumenau	BLU1	19	20	11	10
	Pomerode	POM1	19	20	9	5
	Araquari	ARQ1	47	20	9	8
	Armazém	ARM1	50	32	14	7
	Armazém	ARM2	50	x	15	X

x: Problema no sequenciamento.



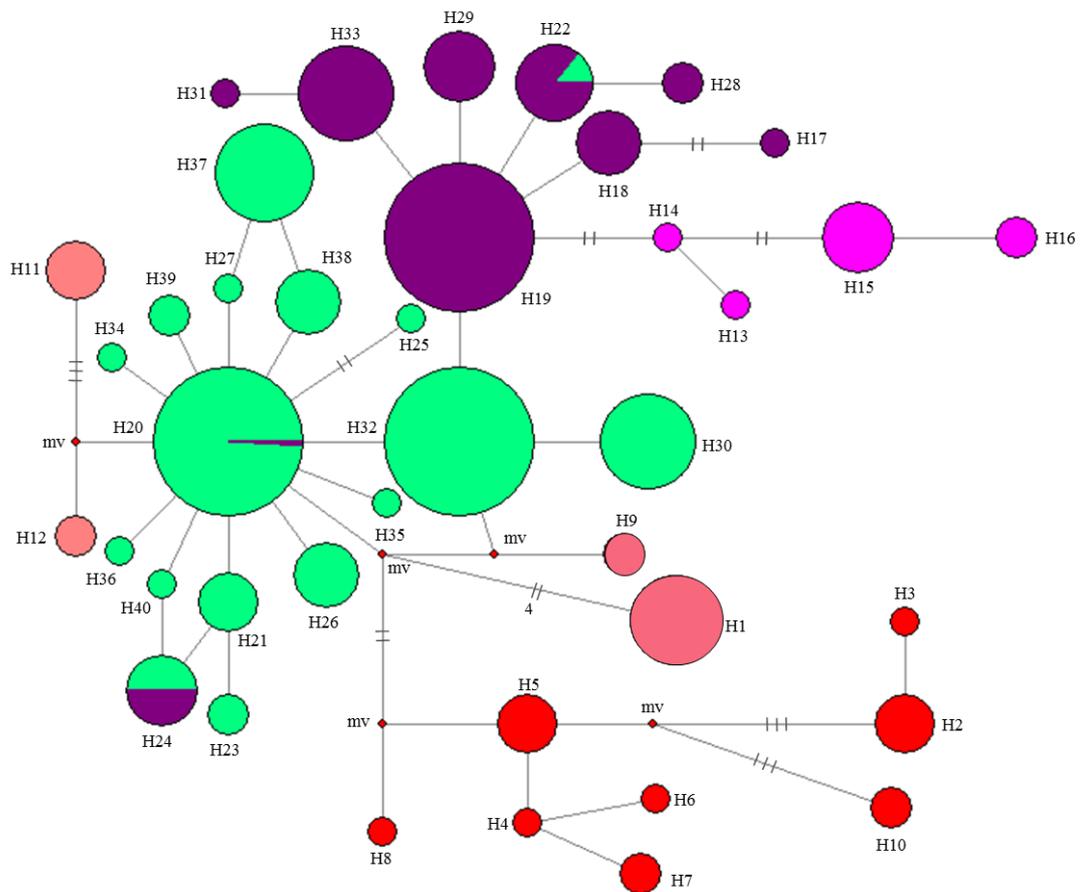
**Figura 13.** Rede de haplótipos do gene COI verificados em 347 amostras da espécie *P. helleri* coletadas em 67 localidades. As cores identificam os filogrupos gerados pelo BAPS. Os traços indicam os passos mutacionais entre os haplótipos. Nenhum traço equivale a um passo mutacional. Dois traços na diagonal indicam mais de quatro passos mutacionais.



**Figura 14.** Rede de haplótipos do gene 12S verificados em 344 amostras da espécie *P. helleri* coletadas em 66 localidades. As cores identificam os filogrupos gerados pelo BAPS. Os traços

indicam os passos mutacionais entre os haplótipos. Nenhum traço equivale a um passo mutacional.

Dois traços na diagonal indicam mais de quatro passos mutacionais.



**Figura 15.** Rede de haplótipos do gene CytB verificados em 339 amostras da espécie *P. helleri* coletadas em 64 localidades. As cores identificam os filogrupos gerados pelo BAPS. Os traços indicam os passos mutacionais entre os haplótipos. Nenhum traço equivale a um passo mutacional. Dois traços na diagonal indicam mais de quatro passos mutacionais.