

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA**  
**MOLECULAR**

**Colonização e Dispersão nos sítios de ocorrência, a Genética das Populações e História**

**Natural de *Partamona ailyae* Camargo, 1980 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)**

PEDRO FILIPE MENEZES CARDOSO

São Carlos – SP

- 2016 -

**PEDRO FILIPE MENEZES CARDOSO**

**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 apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, 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)

C268c Cardoso, Pedro Filipe Menezes  
Colonização e dispersão nos sítios de ocorrência, a genética das populações e história natural de *Partamona ailyae* Camargo, 1980 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) / Pedro Filipe Menezes Cardoso. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
78 p.

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

1. Abelhas sem ferrão. 2. Colonização. 3. Estrutura genética. 4. Diferenciação populacional. 5. Marcadores moleculares. 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 do candidato Pedro Filipe Menezes Cardoso, realizada em 03/06/2016:

A handwritten signature in brown ink that reads "Marco Antonio Del Lama".

---

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama  
UFSCar

A handwritten signature in brown ink that reads "Francis de Moraes Franco Nunes".

---

Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes  
UFSCar

A handwritten signature in brown ink that reads "Maria Cristina Arias".

---

p/ Prof. Dra. Maria Cristina Arias  
USP

*“A mais complicada máquina inventada pelo homem não passa de um brinquedo diante do mais simples organismo” – George Wald*

## AGRADECIMENTOS

Sou grato ao TRINO DEUS, Aquele que era, que é e que há de ser. Agradeço pela oportunidade de Salvação dada por intermédio do Senhor Jesus Cristo. A este DEUS “*seja o louvor, e a honra, e a glória, e o domínio pelos séculos dos séculos. Amém!*”

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama, pela coragem e confiança ao me aceitar como orientando antes de me conhecer pessoalmente. Eu o agradeço pela orientação, paciência e por todos os ensinamentos, tanto aqueles na área profissional quanto aqueles na área pessoal, mostrando sempre ser um professor-pesquisador de excelência e uma pessoa fantástica, extremamente atenciosa. Por causa destas características que a relação orientador/orientando sempre foi – e é! –, bastante saudável.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa e auxílio financeiro concedidos para o desenvolvimento deste trabalho (Processos nos. 2013/26905-0 e 2011/21501-2).

Ao corporativo do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela organização, apoio e oportunidade concedida a mim para a realização desta pesquisa. Aos professores que contribuíram de forma direta e/ou indireta para a minha formação.

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

Agradeço ao amigo Elder Assis Miranda pelo incentivo dado para eu fazer o mestrado na UFSCar, por todo apoio e conhecimento no trabalho de campo, ajuda na análise de dados e disponibilidade para esclarecimento de dúvidas.

Agradeço à Katia Maria Ferreira pelo apoio empreendido na bancada e análise dos dados microssatélites, bem como pela disponibilidade bem humorada em sempre ajudar, compartilhando sua experiência comigo.

Agradeço à Isabel Godoy pelo apoio técnico, disponibilidade e boa vontade em sempre ajudar.

A todos os parceiros do Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros (LGEH), desde aqueles que tiveram pouco contato comigo, àqueles que conviveram durante os meus dois anos de mestrado. Agradeço pelo companheirismo, amizade e disponibilidade em ajudar. Agradeço-lhes por tudo: Diana Machado, Antônio Carvalho (Tony), Daniele Lucena, Camila Sabadini, Mariana Dessi, Aline Andrade (USP-RP), Diego Oliveira (USP-RP), Antônio Bergamaschi, Gabriele Freiria e Luana Bataglia. Agradeço também a Pedro Gallo pela amizade e ajuda em campo.

Sou grato à mulher da minha vida, Tecavita Cardoso, minha esposa bióloga, companheira de mestrado e de vida, minha mulher virtuosa. Agradeço-te por dividir comigo muitos sonhos e por lutar para que muitos deles se realizassem e que outros ainda se realizem. Como eu sou feliz por ter sua companhia quase 24 horas por dia. Amo-te, minha pequena!

Agradeço aos meus pais, Marcos Cardoso e Katia Menezes, pela força e pelos conselhos que obtive sempre que necessário, para que minhas escolhas fossem as melhores possíveis.

Aos meus irmãos, Gabriel Cardoso e Marcos Segundo, pelos conselhos, amor e carinho que sempre recebi de ambos.

À minha avó, tios, primos e amigos que sempre acreditaram em mim e me incentivaram a continuar lutando por aquilo que sempre almejei.

A todos os pesquisadores, mateiros e técnicos que me ajudaram no desenvolvimento desta pesquisa, principalmente aqueles que usaram um pouco de seu tempo e conhecimento para me ajudar nas coletas de campo em busca por espécimes de *Partamona ailyae*.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma maneira para o desenvolvimento e realização desta pesquisa.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	VI
LISTA DE TABELAS .....	IX
LISTA DE QUADROS .....	X
RESUMO .....	XI
ABSTRACT .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Importância ecológica e econômica das abelhas .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. A Tribo Meliponini .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. O gênero <i>Partamona</i> Schwarz (1939) e a espécie modelo do estudo, <i>P. ailyae</i> .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4. Marcadores Moleculares em estudos populacionais.....</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1. Obtenção dos espécimes .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1.1. Procedimento de coleta .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Análise dos genes mitocondriais .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.1. Extração, amplificação e sequenciamento do DNA .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.2. Análise das sequências nucleotídicas.....</b>	<b>16</b>
<b>3.3. Análise dos locos microssatélites .....</b>	<b>17</b>
<b>3.4. Índices de diversidade e estrutura populacional.....</b>	<b>18</b>
<b>3.5. Inferências demográficas.....</b>	<b>20</b>
<b>3.6. História Natural .....</b>	<b>21</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1. Caracterização da variação gênica e das linhagens mitocondriais .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1.1. Subunidade I do Complexo Citocromo Oxidase C (COI) e Citocromo B (CytB).....</b>	<b>22</b>
<b>4.1.2. Genes concatenados (COI e CytB) .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1.3. Genes ribossomais 12S e 16S.....</b>	<b>26</b>

4.1.4.	<i>Região intergênica COI-COII</i> .....	28
4.2.	<b>Análise dos Microssatélites</b> .....	29
4.2.1.	<i>Genética Familiar</i> .....	32
4.3.	<b>Inferências demográficas</b> .....	32
4.4.	<b>História Natural</b> .....	34
4.4.1.	<i>Substratos utilizados para nidificação</i> .....	34
4.4.2.	<i>Ornamentação de entrada dos ninhos</i> .....	35
4.4.3.	<i>Inimigos naturais</i> .....	37
4.4.4.	<i>Aspectos biogeográficos</i> .....	37
4.4.5.	<i>Densidade dos ninhos</i> .....	38
5.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	39
5.1.	<b>Caracterização da variação gênica e estrutura populacional</b> .....	39
5.1.1.	<i>Região intergênica COI-COII</i> .....	40
5.2.	<b>Linhagens mitocondriais</b> .....	41
5.3.	<b>Microssatélites</b> .....	42
5.3.1.	<i>Genética Familiar</i> .....	47
5.4.	<b>Inferências demográficas</b> .....	48
5.5.	<b>História Natural</b> .....	48
5.5.1.	<i>Substratos utilizados para nidificação</i> .....	48
5.5.2.	<i>Ornamentação de entrada dos ninhos</i> .....	49
5.5.3.	<i>Inimigos naturais</i> .....	50
5.5.4.	<i>Densidade dos ninhos e implicações para a conservação</i> .....	50
6.	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	53
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	55
	Apêndice 1 .....	69

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ornamentação de entrada dos ninhos de algumas espécies de *Partamona* em diferentes substratos. **A:** *P. ailyae*; **B:** *P. helleri*; **C:** *P. nhambiquara*; **D:** *P. gregaria*; **E:** *P. cupira*; **F:** *P. combinata*; **G:** *P. mulata*; **H:** *P. rustica*. Imagens D, G e H cedidas por Elder Assis Miranda (Miranda EA).....7
- Figura 2.** Vista lateral de operária de *Partamona ailyae*, evidenciando a cor preta do tegumento, cabeça e tórax. Barra de escala 1 mm. Foto: Diana de Paula Machado (Machado DP).....8
- Figura 3.** Localidades onde espécimes de *P. ailyae* foram coletados (dados da literatura). Na imagem **A** mostra em quais biomas a espécie foi encontrada (**Verde escuro:** Amazônia; **Amarelo:** Cerrado; **Cinza:** Caatinga e; **Verde claro:** Mata Atlântica). Em **B**, ilustra a variação climática na área de distribuição da espécie (**Azul escuro:** Super-úmido; **Azul intermediário:** Úmido; **Azul claro:** Semi-úmido e; **Cinza:** Semi-árido). Os mapas foram gerados pelo programa Diva-Gis (<http://www.diva-gis.org/>).....9
- Figura 4.** Mapas evidenciando as Regiões brasileiras (**A**) e os Biomas (**B**) visitados durante as oito expedições de coleta. Os **triângulos azuis** representam as localidades com colônias ativas de *Partamona ailyae*. Os **triângulos vermelhos** se referem aos sítios onde a espécie não foi encontrada. Na Figura **B** o Verde escuro representa a Amazônia, o Amarelo representa o Cerrado e o Verde claro representa a Mata Atlântica. Os mapas foram gerados pelo programa Diva-Gis (<http://www.diva-gis.org/>).....12
- Figura 5.** Eletroferograma ilustrando a qualidade do sequenciamento obtido para a região gênica COI em amostras de *P. ailyae* das localidades de Caldas Novas, Nova Xavantina e Pontal do Araguaia.....23
- Figura 6.** Eletroferograma ilustrando a qualidade do sequenciamento obtido para a região gênica CytB em amostras de *P. ailyae* das localidades de Aragarças, Nova Xavantina e Pontal do Araguaia.....23
- Figura 7.** Rede de haplótipos para dois genes concatenados, construída pelo método *Median-Joining* a partir de 71 amostras de *P. ailyae* provenientes de 13 localidades. As cores identificam os sítios amostrais e estão de acordo com a legenda da Tabela 6.....26

- Figura 8.** Eletroferograma ilustrando a qualidade do sequenciamento obtido para a região gênica 12S em amostras de *P. ailyae* das localidades de Barreiras, Crixás e Icó.....27
- Figura 9.** Eletroferograma ilustrando a qualidade do sequenciamento obtido para a região gênica 16S em amostras de *P. ailyae* das localidades de Araguari, Caldas Novas e Crixás.....27
- Figura 10.** Comportamento eletroforético do fragmento do gene mitocondrial COI-COII – primers descritos por Hall & Smith (1991) – visualizado em gel de agarose. CN = Controle negativo.....28
- Figura 11.** Eletroferograma ilustrando a qualidade do sequenciamento obtido para a região intergênica COI-COII em amostras de *P. ailyae*.....29
- Figura 12.** Representação do número ideal de agrupamentos identificado pelo programa STRUCTURE de acordo com a metodologia de Evanno *et al.* (2005). As análises foram baseadas em oito marcadores microssatélites de 16 localidades de *P. ailyae*.....31
- Figura 13.** Distribuição de genótipos de *P. ailyae* em grupos de acordo com análises de estruturação (K=4) por meio do Programa STRUCTURE, baseado em oito locos microssatélites.....32
- Figura 14.** História demográfica de *Partamona ailyae* baseada nas regiões mitocondriais CytB e COI concatenadas (1114pb). A linha preta representa a mediana estimada e as linhas azuis mostram o limite inferior e superior com 95% de confiança.....34
- Figura 15.** Estruturas de entradas de ninhos de *Partamona ailyae*. **A:** Ninho em termiteiro na base de árvore viva (Caldas Novas); **B:** Ninho em barranco (Barra do Garças); **C:** Ninho na base de tronco de árvore viva (Caldas Novas); **D:** Ninho no solo (Icó).....35
- Figura 16.** Ornamentação de entrada do ninho. **A:** Ninho de *P. ailyae* em termiteiro epígeo do tipo “murundu” (Nova Xavantina, MT); **B:** Ninho de *P. cupira* em termiteiro epígeo do tipo “murundu”, isolado (Caldas Novas, GO).....36
- Figura 17.** Ninho de *P. ailyae* em Araguari, MG, verificado em maio de 2014 (**A**) e em maio 2015 (**B**).....36

<b>Figura 18.</b> Área amostrada em Nova Xavantina na segunda expedição de coleta. A escala ilustra a distância de um ninho para o outro, revelando a dificuldade em encontrar novos ninhos na mesma área. A ordem dos ninhos coletados está relatada nos números de 5 a 11.....	38
<b>Figura 19.</b> Área amostrada para <i>P. cupira</i> em Delfinópolis, MG.....	51
<b>Figura 20.</b> Rede de haplótipos de COI verificados em 74 amostras de 16 sítios. As cores identificam os sítios amostrais e estão de acordo com a Tabela 8.....	69
<b>Figura 21.</b> Rede de haplótipos de CytB verificados em 72 amostras de 14 sítios. As cores identificam os sítios amostrais e estão de acordo com a Tabela 9.....	70
<b>Figura 22.</b> Haplótipos distintos de <i>P. ailyae</i> para o gene COI.....	71
<b>Figura 23.</b> Haplótipos distintos de <i>P. ailyae</i> para o gene CytB.....	72
<b>Figura 24.</b> Sequências de <i>P. ailyae</i> para o gene ribossomal 12S.....	73
<b>Figura 25.</b> Comparação entre sequências de <i>P. ailyae</i> , <i>P. rustica</i> e <i>P. helleri</i> para o gene ribossomal 12S. A partir da posição 25 da sequência é visualizada a repetição/inserção de cinco bases no fragmento deste gene para <i>P. ailyae</i> .....	74
<b>Figura 26.</b> Sequências de <i>P. ailyae</i> para o gene ribossomal 16S.....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Localidades amostradas com ninhos de <i>Partamona ailyae</i> .....	13
<b>Tabela 2.</b> Localidades visitadas onde não foi detectada a ocorrência de <i>Partamona ailyae</i> .....	13
<b>Tabela 3.</b> <i>Primers</i> utilizados neste trabalho para amplificação de genes mitocondriais.....	15
<b>Tabela 4.</b> Microssatélites heterólogos utilizados neste trabalho.....	17
<b>Tabela 5.</b> Índices de diversidade para quatro regiões mitocondriais de <i>P. ailyae</i> , como para os genes concatenados (COI e CytB).....	22
<b>Tabela 6.</b> Distribuição de haplótipos para dois genes mitocondriais concatenados (COI e CytB) de <i>P. ailyae</i> nos sítios amostrados.....	25
<b>Tabela 7.</b> Valores de heterozigosidades observada e esperada ( $H_o$ e $H_e$ ) e Coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) para os oito locos estudados. * Desvio padrão.....	31
<b>Tabela 8.</b> Distribuição dos haplótipos de COI de <i>P. ailyae</i> nos sítios amostrados, exceto Barreiras-BA.....	69
<b>Tabela 9.</b> Distribuição dos haplótipos de CytB de <i>P. ailyae</i> nos sítios amostrados.....	70

**LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1.</b> Frequências alélicas obtidas para oito locos microssatélites analisados em uma operária adulta de <i>P. ailyae</i> de cada um dos ninhos coletados em 16 localidades.....	76 a 78
--	---------

## RESUMO

Características inerentes à biologia dos diferentes grupos de abelhas podem afetar como uma determinada área será ocupada e isso pode influenciar diretamente a genética de suas populações no longo prazo. No Brasil, poucos são os estudos que tratam da variabilidade e estrutura genéticas das populações naturais de abelhas, assim como os níveis de diferenciação entre as populações de abelhas eussociais. O gênero *Partamona* compreende 33 espécies descritas, distribuídas do sul do México ao sul do Brasil. *Partamona ailyae* ocorre nas matas úmidas do sudoeste da Amazônia, região central do Brasil e regiões xéricas do Piauí. A sua grande distribuição, bem como a capacidade de ocupar ambientes tão heterogêneos, despertou nosso interesse em utilizar *P. ailyae* como modelo de estudo. O objetivo deste trabalho foi analisar o processo de ocupação nos diversos sítios de ocorrência de *P. ailyae*, a genética de suas populações e o fluxo gênico interpopulacional; adicionalmente, conhecer um pouco da história natural da espécie. Foram realizadas oito expedições, sendo visitadas 41 localidades de 10 estados brasileiros. Dentre estas localidades, em apenas 17 foram encontradas colônias ativas de *P. ailyae*, sendo coletados espécimes de 75 ninhos. Para identificar as linhagens mitocondriais presentes nas localidades amostradas, cinco regiões gênicas foram utilizadas (COI, CytB, 12S, 16S e COI-COII). Os níveis de polimorfismo estimados neste estudo mostraram COI como a região mais variável (11 haplótipos), seguido de CytB (sete haplótipos). Para os genes ribossomais, apenas algumas amostras foram analisadas, pois foram identificadas poucas diferenças entre as sequências. Todas as 31 amostras analisadas para o gene 12S apresentaram repetição/inserção de cinco bases a partir da posição 25 da sequência, resultado não observado nas demais espécies de *Partamona* analisadas. Os genes que forneceram maiores informações (COI e CytB) tiveram suas sequências concatenadas (1114pb) e para estas regiões, foram observados 13 haplótipos; destes, dois foram compartilhados e 11 caracterizados como exclusivos de localidades. A AMOVA demonstrou que 94,3% da variação genética é resultado de diferenças interpopulacionais, revelando uma

elevada diferenciação entre as populações analisadas ( $\Phi_{ST} = 0.9426$ ;  $P = 0,000$ ). Além disso, um indivíduo de cada colônia foi analisado para oito locos microssatélites, delineados para *Melipona bicolor* e *Partamona helleri*. As populações apresentaram moderada diferenciação interpopulacional ( $\Phi_{ST} = 0,1491$ ;  $P = 0,000$ ). A análise de agrupamento identificou quatro grupos por meio do  $\Delta K$  como sendo o modelo ideal, e através do STRUCTURE, foi verificado que todos os indivíduos das respectivas populações têm probabilidade de pertencer a mais de um grupo, corroborando o “Assignment test”, o qual indicou que apenas 50% das amostras foram corretamente identificadas à sua população de origem. Foi realizada análise da segregação fenotípica nas progênes de vários ninhos, revelando uma estrutura familiar monogínica/monândrica. Para os dados mitocondriais, o teste de Mantel mostrou uma correlação significativa entre distância genética e distância geográfica ( $r = 0,2589$ ;  $P = 0,0231$ ). Já para os dados nucleares, esse teste não indicou correlação significativa entre as distâncias genéticas e geográficas ( $r = 0,2090$ ;  $P = 0,0610$ ). Os testes de  $F_s$  de  $F_u$  e  $R_2$  não apresentaram valores significativos. Na análise do *Bayesian Skyline Plot* (BSP), não foram observadas oscilações marcantes no tamanho efetivo das populações de *P. ailyae*, indicando estabilidade populacional ao longo do tempo considerado. Os valores do  $\Phi_{ST}$  estimados para genes mitocondriais e para os microssatélites foram comparados, sendo detectadas evidências de dispersão sexo-assimétrica, em que as fêmeas são as responsáveis pela ocupação de áreas, e os machos constituem o sexo dispensor. Além disso, são apresentados alguns aspectos relevantes da história natural de *P. ailyae*.

**Palavras-chave:** Abelhas sem ferrão, colonização, estrutura genética, diferenciação populacional, marcadores moleculares.

## ABSTRACT

Particular biological features of different bee groups can affect how a certain area will be occupied by them and this can affect directly the genetics of their populations over the long term. In Brazil, there are few studies about gene variation and genetic structure of bee natural populations, as well as on the genetic differentiation levels between eusocial bee populations. The *Partamona* genus comprises 33 species, distributed from Southern Mexico to Southern Brazil. *Partamona ailyae*, the model species of this study, occurs in rainforests of Southwestern Amazonia, Central Brazil and xeric regions of Piauí. Its wide distribution, as well as the ability to occupy such heterogeneous environments, piqued our interest to take *P. ailyae* as a study model. This work aimed to analyze the occupation process at the *P. ailyae* occurrence sites, population genetics and interpopulational gene flow, and the natural history of this species. Eight expeditions were carried out, and 41 localities of 10 states of Brazil were visited. Among them, active colonies of *P. ailyae* were found only in 17 localities, being collected specimens of 75 nests. To identify the mitochondrial lineages present in the sampled colonies, five gene regions were used (COI, CytB, 12S, 16S and COI-COII). Estimates of polymorphism levels showed COI and CytB as the most variable regions (11 and seven haplotypes, respectively). For the ribosomal genes, only a few samples were analyzed, because few differences were identified among the sequences. All the 31 samples analyzed for the 12S showed a five bases insertion starting from the position 25 of the sequence, a result not observed in other *Partamona* species. The most informative genes (COI and CytB) had their sequences concatenated (1114pb). For these regions, 13 haplotypes were observed, two of them were shared and 11 characterized as exclusive of localities. The AMOVA showed that 94.3% of the gene variation is due to interpopulacional differences, revealing a high differentiation among the populations ( $\Phi_{ST} = 0.9426$ ;  $P = 0.000$ ). In addition, one individual from each colony was analyzed for eight heterologous microsatellite loci designed from *Melipona bicolor* and *Partamona helleri*. A moderate and statistically significant

interpopulational genetic differentiation ( $\phi_{ST} = 0.1491$ ;  $P = 0.000$ ) was found. The cluster analysis identified four groups by  $\Delta K$  as the ideal model, and STRUCTURE software showed that all individuals could belong to more than one group, corroborating the “Assignment test”, which indicated that only 50% of the samples were correctly assigned to their original population. Phenotypic segregation analysis was realized in some offsprings, revealing a monoginic/monandric familial structure. From the mitochondrial data, the Mantel test showed a significant correlation between genetic distance and geographic distance ( $r = 0.2589$ ;  $P = 0.0231$ ), whereas on basis of the nuclear data, the Mantel test did not indicate significant correlation between genetic distance and geographic distance ( $r = 0.2090$ ;  $P = 0.0610$ ). Fu’s  $F_s$  and  $R_2$  tests did not show significant values. The Bayesian Skyline Plot analysis (BSP) did not show significant fluctuations in the effective size populations of *P. ailyae*, indicating population stability over time. The values of  $\phi_{ST}$  estimated for mitochondrial genes and microsatellites were compared, being detected evidence of sex-asymmetric dispersal, in which females are responsible for the areas occupation, and males constitute the disperser sex. In addition, some relevant aspects of the natural history of *P. ailyae* are shown.

**Keywords:** stingless bees, colonization, genetic structure, population differentiation, molecular markers.

## 1. INTRODUÇÃO

A Ordem Hymenoptera constitui um dos grupos mais diversificados da Classe Insecta (Engel & Grimaldi 2004), agrupando cerca de 125.000 espécies descritas (Brusca & Brusca 2007). A Ordem reúne, dentre outros organismos, as formigas, vespas e abelhas, os quais são utilizados como organismos modelo para estudos biológicos por apresentarem algumas particularidades, tais como a presença do sistema haplodiplóide de determinação do sexo e diferentes níveis de organização social (Michener 2007).

O sistema haplodiplóide por partenogênese arrenótoca é a forma ancestral de determinação do sexo compartilhada pela maioria dos himenópteros. Isso significa que os óvulos fertilizados dão origem a fêmeas diplóides e machos haplóides desenvolvem-se a partir de óvulos não fertilizados (Trivers & Hare 1976, Heimpel & Boer 2008). Desta forma, a gametogênese nas fêmeas ocorre com a meiose resultando em gametas haplóides, enquanto nos machos este processo não tem caráter reducional.

Entretanto, estudos mostraram que o sexo nestes organismos não é determinado somente pelo nível de ploidia. Segundo Heimpel & Boer (2008), o loco *csd* (complementary sex determination) é o mecanismo mais estudado e melhor estabelecido de determinação do sexo por haplodiploidia no táxon. A heterozigose para os alelos deste loco resulta em fêmeas e a hemizigose resulta em machos normais, porém, a homozigose transforma genótipos diplóides em machos (Beye *et al.* 2003, Hasselmann *et al.* 2008). No entanto, por apresentarem *fitness* igual a zero, a produção de machos diplóides é bastante danosa, pois estes são estéreis ou então geram progênes estéreis, reduzindo o tamanho efetivo ( $N_e$ ) das populações dos himenópteros que os produzem (Wright 1933, Yamauchi *et al.* 2001, Ayabe *et al.* 2004).

Outras características da biologia de alguns himenópteros, como a eussocialidade, a monandria e o comportamento filopátrico da fêmea no que diz respeito à reprodução das

colônias por enxameagem também podem diminuir o  $N_e$  de suas populações. Embora o comportamento filopátrico apresente algumas vantagens, reduz o fluxo gênico materno, sendo os machos os responsáveis pela entrada de novos alelos na população devido ao seu comportamento dispersor.

A maneira como uma área é colonizada influencia diretamente a genética da população no longo prazo (Harrison & Hastings 1996). Utilizando *Partamona helleri* como organismo modelo, Ferreira (2011) observou populações altamente diferenciadas quando analisadas para genes mitocondriais, verificando que o comportamento filopátrico parece influenciar a dinâmica das populações da espécie. Esta autora verificou que uma área é colonizada por poucas linhagens maternas e cada evento de colonização pode mimetizar as condições de “efeito fundador” e concluiu que o nível de diferenciação genética entre as populações estudadas deve estar relacionado ao raio de voo que os machos da espécie apresentam.

Uma vez que poucas fêmeas e poucos machos serão responsáveis por produzir a nova geração, a redução do  $N_e$  pode diminuir a variabilidade intrapopulacional. Esse processo é conhecido como “vórtex” de extinção e pode comprometer a população no longo prazo (Zayed & Packer 2005).

Devido a todas estas características, associadas a outros fatores que geram diversos efeitos negativos como a fragmentação do habitat e o uso indiscriminado de agrotóxicos, por exemplo, é de suma importância conhecer os mecanismos que, de alguma forma, promovem variabilidade tanto para estes organismos quanto para vários outros que dependem direta ou indiretamente deles.

### 1.1. Importância ecológica e econômica das abelhas

Com sua grande extensão territorial e variedade de biomas, o Brasil é um dos países mais diversificados em termos de insetos, abrigando um número estimado de 400.000 espécies (Rafael 2012). Dentre essa variedade de insetos, há uma apreciável diversidade de abelhas no território brasileiro. Das sete famílias de abelhas existentes (Michener 2007), cinco delas ocorrem no Brasil (Apidae, Halictidae, Colletidae, Andrenidae e Megachilidae), com 1.678 espécies descritas, aproximadamente (Silveira *et al.* 2002).

Uma parte considerável da vegetação natural do mundo e até mesmo plantas cultivadas dependem dos polinizadores (Kerr *et al.* 2001, Michener 2007). Devido à necessidade do pólen e do néctar encontrados nas flores para provisão e nutrição da prole, as abelhas são visitantes florais obrigatórios (Roubik 1989), pois o pólen das flores é a sua principal fonte de proteína, enquanto o néctar é a sua principal fonte de carboidrato (Kerr *et al.* 2001, Michener 2007). Por possuírem esta característica, as abelhas apresentam um papel ecológico fundamental, constituindo o grupo mais importante de polinizadores dos ecossistemas (Michener 2007, Raven *et al.* 2001).

Das 250.000 espécies de angiospermas conhecidas, 70% dependem da polinização por estes insetos para a sua reprodução sexuada. Desta forma, as abelhas contribuem para a diversidade genética destas plantas (Michener 2007, Raven *et al.* 2001). Além disso, estes organismos são imprescindíveis na produtividade agrícola devido à sua função na polinização cruzada, auxiliando na produção de sementes e frutos (Kerr *et al.* 1996, Palmer *et al.* 2004, Imperatriz-Fonseca & Nunes-Silva 2010).

A diminuição dos polinizadores em razão da quebra dos sistemas de polinização tem sido descrita nos últimos tempos (Larsen *et al.* 2005, Freitas *et al.* 2009, Brosi 2009, Pinheiro & Freitas 2010). Essa diminuição tem ocasionado uma redução na produtividade agrícola, o que tem mobilizado profissionais da área para quantificar o valor dos serviços que os

polinizadores prestam ao ambiente (Kevan & Phillips 2001, Brosi *et al.* 2008, Lonsdorf *et al.* 2009).

Além da enorme importância ecológica das abelhas como principais polinizadores dos ecossistemas, estes organismos vêm sendo fortemente utilizados na criação racional, representando fonte de renda em diversas regiões do Brasil, principalmente na região Norte (Frazão & Silveira 2003). Isso configura uma relevante importância sócio-econômica que eles apresentam. Além do potencial nutricional, alguns produtos fornecidos pelas abelhas (mel, própolis e geléia real) são muito relevantes para a medicina devido a algumas propriedades farmacológicas que estes produtos apresentam (Almeida-Muradian *et al.* 2007, Dutra *et al.* 2008, Manrique & Santana 2008).

Segundo Kerr *et al.* (1996), o mel das abelhas da Tribo Meliponini possui um valor comercial maior que o mel de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, pois é utilizado pelas populações locais como um produto muito nutritivo e com função terapêutica. Campêlo *et al.* (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana da cera e própolis de alguns meliponíneos, verificando que esses produtos têm potencial antimicrobiano no combate a algumas bactérias patogênicas para as quais foram testados.

## **1.2. A Tribo Meliponini**

Conhecidos como “abelhas sem ferrão”, as espécies da Tribo Meliponini são as únicas abelhas altamente sociais, além das abelhas da Tribo Apini. Os meliponíneos se diferenciam das demais abelhas corbiculadas devido à presença do ferrão e estruturas associadas reduzidas, além da ausência de pelos nos olhos e redução da venação da asa (Michener 2007).

Os meliponíneos ocorrem nas regiões tropical e subtropical do planeta (Michener 2007). Grande parte das espécies de abelhas com ocorrência no Brasil está agrupada nesta tribo (Oliveira 1998), totalizando 244 espécies válidas, distribuídas em 33 gêneros (Pedro 2014),

sendo que a maioria ocorre na Amazônia (Silveira *et al.* 2002). Segundo Camargo & Pedro (2012), aproximadamente 417 espécies de abelhas sem ferrão ocorrem na região neotropical.

As abelhas sem ferrão nidificam em uma gama de substratos, como cavidades encontradas em troncos de árvores, no solo, termiteiros, formigueiros, e até mesmo constroem ninhos expostos em árvores, paredes e frestas de rochas. Na enxameagem, algumas operárias saem em busca de um local para construção do novo ninho e voltam à colônia mãe para coletar materiais necessários para construção da nova colônia, como cera e resina, por exemplo. Geralmente, um novo ninho é estabelecido próximo ao ninho mãe porque, além dos materiais usados para a nidificação, a colônia filha depende de recursos alimentares durante um determinado tempo, como pólen, néctar e mel, até que a nova colônia se torne independente (Michener 2007).

As abelhas sem ferrão são responsáveis por polinizar entre 30 a 90% das árvores nativas, dependendo do ecossistema em que estão inseridas (Kerr *et al.* 2001). O habitat ótimo para estes indivíduos deve oferecer os recursos florais necessários e os locais para nidificação. A oferta destes recursos e a competição pelos mesmos são importantes aspectos que determinam a presença de uma espécie em um local (Cane 2001). Estes recursos podem ser específicos tanto para os adultos quanto para as formas jovens, sendo, então, a sobrevivência das abelhas sem ferrão dependente de condições ambientais (Silveira *et al.* 2002). Qualquer alteração na abundância ou existência destes recursos pode interferir de forma negativa nas populações desses insetos (Rambaldi & Oliveira 2003, Antonini & Martins 2003).

Além disso, o uso indiscriminado de agrotóxicos e a ação predatória de meleiros, principalmente, têm reduzido populações de muitas espécies de abelhas sem ferrão (Kerr *et al.* 1996). Outros fatores como a intensa atividade agrícola e outras formas de uso da terra também têm colaborado para a redução das populações destas abelhas, pois promovem a fragmentação do habitat (Ellis *et al.* 2006, Klein *et al.* 2007, Knight *et al.* 2009). Todos esses

fatores geram diversos efeitos negativos, como a perda da variação genética, principalmente, em razão da redução do tamanho populacional e da subdivisão de populações contínuas em populações locais menores (Antonini & Martins 2003). Essa menor variabilidade genética pode resultar na diminuição do *fitness* no longo prazo (Avisé 2004).

### 1.3. O gênero *Partamona* Schwarz (1939) e a espécie modelo do estudo, *P. ailyae*

O gênero *Partamona* está incluído na Tribo Meliponini e compreende 33 espécies descritas. Apresenta ampla distribuição geográfica, com ocorrência exclusivamente neotropical, sendo encontradas desde o sul do México até o sul do Brasil. As espécies do gênero podem ser encontradas em regiões de florestas, caatingas, cerrados, nas cordilheiras Centro-Americana e Andina, chegando a regiões montanhosas com mais de 2.000 metros de altitude, e são tolerantes a ambientes degradados. Este gênero foi subdividido em cinco clados - *bilineata/epiphytophila*, *pearsoni*, *testacea*, *nigrior* e *cupira* (Camargo & Pedro 2003).

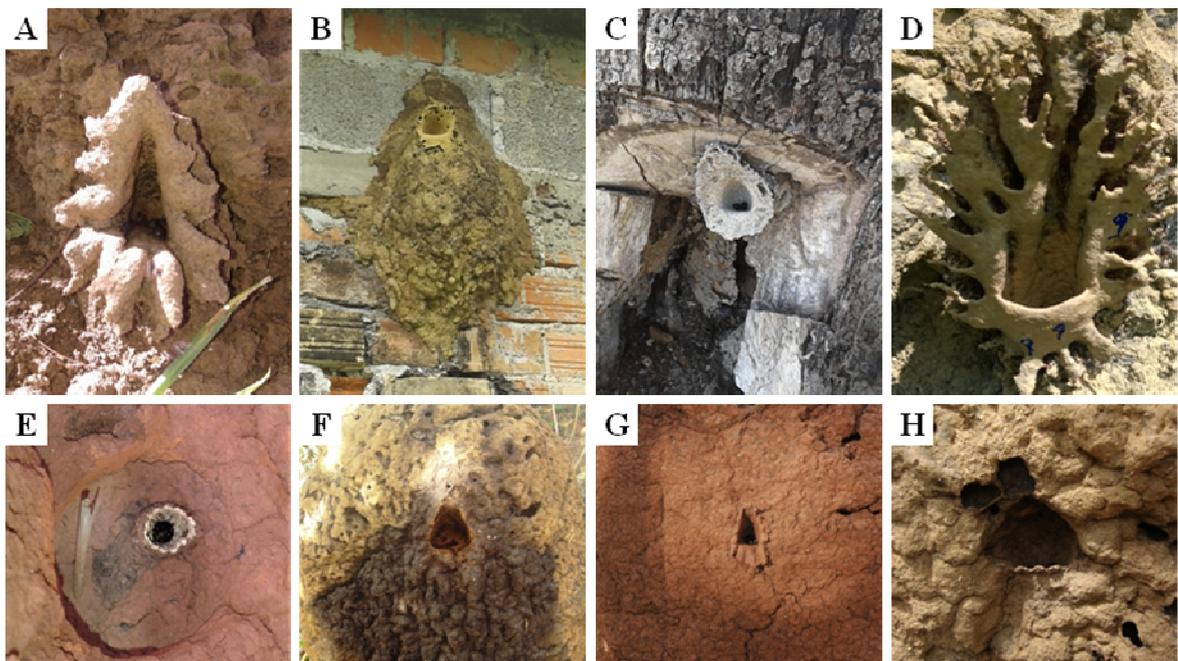
A população nos ninhos de *Partamona* varia entre 1.000 e 3.000 indivíduos adultos (Camargo & Pedro 2003). Segundo estes autores, todas as espécies que compõem o gênero apresentam comportamento “agressivo”.

Os hábitos de nidificação são muito variados, havendo desde espécies adaptadas a ambientes antrópicos a espécies termitófilas obrigatórias (Pedro & Camargo 2003). Há uma ampla variedade de substratos que as espécies do gênero utilizam para construção de seus ninhos, como termiteiros arbóreos e subterrâneos ativos ou inativos, ocos em troncos de árvores, formigueiros, no solo, sob raízes de epífitas, cumeeiras de habitação humana, frestas de paredes, entre outros. Os hábitos de nidificação, como substratos utilizados e atributos dos ninhos, permitem uma melhor delimitação das espécies. No entanto, pelo fato das espécies de *Partamona* se assemelharem muito morfológicamente (Camargo & Pedro 2003), há um

reduzido número de caracteres morfológicos passíveis de codificação, dificultando a atribuição das relações filogenéticas dentro do grupo (Pedro & Camargo 2003).

Independente do substrato utilizado, os ninhos das espécies de *Partamona* são formados por uma estrutura de entrada, o vestíbulo e uma ou mais câmaras de crias e potes de alimentos. Todas as espécies usam, geralmente, terra cimentada com resinas, exceto nos potes, favos e lamelas (Azevedo & Zucchi 2000).

Segundo Camargo & Pedro (2003), as espécies do gênero *Partamona* são as responsáveis pela construção dos ninhos mais formidáveis já vistos, principalmente no que diz respeito às estruturas de entrada. É admirável a diversidade de estruturas ornamentadas e bem elaboradas que estas produzem junto às entradas de seus ninhos, variando na forma e coloração, embora a maioria dos ninhos apresente um formato básico triangular (Figura 1).



**Figura 1.** Orna mentação de entrada dos ninhos de algumas espécies de *Partamona* em diferentes substratos. **A:** *P. ailyae*; **B:** *P. helleri*; **C:** *P. nhambiquara*; **D:** *P. gregaria*; **E:** *P. cupira*; **F:** *P. combinata*; **G:** *P. mulata*; **H:** *P. rustica*. Imagens D, G e H cedidas por Elder Assis Miranda (Miranda EA).

Segundo Pedro & Camargo (2003), as espécies de *Partamona* podem apresentar tegumento, cabeça e tórax na cor preta ou amarela. *Partamona ailyae*, a espécie alvo deste

estudo, apresenta estes caracteres na cor preta (Figura 2). A espécie em questão faz parte do clado *cupira* e ocorre desde as matas úmidas do sudoeste da Amazônia até os campos cerrados do Brasil central e regiões xéricas do Piauí. A espécie possui hábito de nidificação associado a termiteiros alocados em diferentes substratos. Na Amazônia, por exemplo, é bem frequente a utilização de termiteiros ativos em tocos podres e secos de árvores, e em termiteiros na base de troncos de árvores vivas. No Brasil central, em regiões de cerrados, os ninhos de *P. ailyae* são encontrados usualmente em termiteiros epígeos do tipo “murundu”. Já nas regiões xéricas do Piauí, a espécie constrói seus ninhos em câmaras subterrâneas de termiteiros sob troncos (Camargo & Pedro 2003).

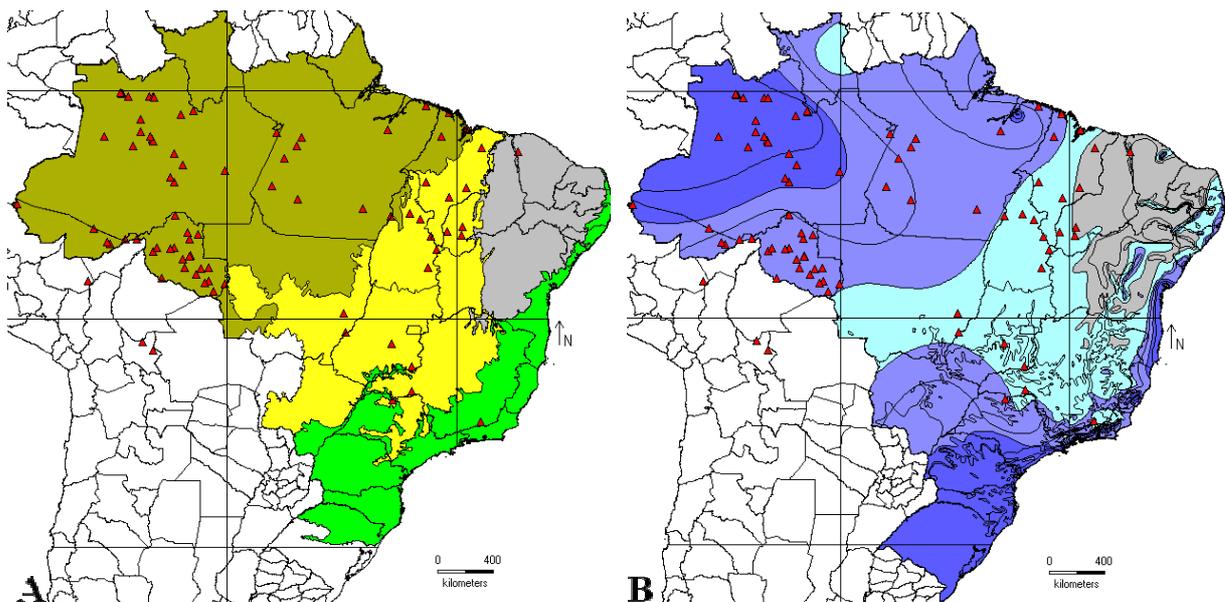


**Figura 2.** Vista lateral de operária de *Partamona ailyae*, evidenciando a cor preta do tegumento, cabeça e tórax. Barra de escala: 1 mm. Foto: Diana de Paula Machado (Machado DP).

Quanto ao ninho, há diferenças na estrutura de entrada dos mesmos. Na Amazônia, as entradas dos ninhos são mais resistentes à água devido à maior porcentagem de resinas; já em regiões de Cerrado, entretanto, são facilmente dissolvidas sob chuva forte por serem basicamente de terra, então as entradas ficam bem projetadas sobre o substrato. A ornamentação de entrada dos ninhos de *P. ailyae* em vista frontal tem a forma aproximada de

um triângulo equilátero (Camargo & Pedro 2003), embora este não seja o padrão observado em todos os ninhos da espécie.

Segundo Camargo & Pedro (2003), *P. ailyae* se distribui em várias regiões do Brasil, ocorrendo em diferentes biomas (Figura 3A) com marcantes diferenças em fatores como disponibilidade de água, umidade relativa e temperatura, sendo áreas muito distintas quanto à fitofisionomia, pluviosidade, elevação e climas (Figura 3B). Devido a essa grande distribuição, é de se supor que populações geneticamente distintas sejam caracterizadas nestes diferentes ambientes. Além disso, esta heterogeneidade dos ambientes ocupados é capaz de fornecer informações relevantes quanto ao processo de colonização, dispersão e aspectos da história natural da espécie.



**Figura 3.** Localidades onde espécimes de *P. ailyae* foram coletados (dados da literatura). Na imagem **A** mostra em quais biomas a espécie foi encontrada (**Verde escuro:** Amazônia; **Amarelo:** Cerrado; **Cinza:** Caatinga e; **Verde claro:** Mata Atlântica). Em **B**, ilustra a variação climática na área de distribuição da espécie (**Azul escuro:** Super-úmido; **Azul intermediário:** Úmido; **Azul claro:** Semi-úmido e; **Cinza:** Semi-árido). Os mapas foram gerados pelo programa Diva-Gis (<http://www.diva-gis.org/>).

No Brasil, o estudo da variabilidade e estrutura genéticas das populações naturais de abelhas ainda é incipiente, pois poucos são os estudos que tratam do tema, bem como dos

níveis de diferenciação entre as populações de abelhas eussociais (Brito *et al.* 2013, Cruz *et al.* 2006, Tavares *et al.* 2007).

#### **1.4. Marcadores Moleculares em estudos populacionais**

Devido à facilidade de extração do DNA de qualquer organismo, mesmo quando preservado em condições precárias (Dowling *et al.* 1996, Parker *et al.* 1998), os marcadores moleculares foram ganhando espaço nos trabalhos de genética de populações.

Ultimamente, estudos sobre abelhas utilizando metodologias moleculares têm permitido a investigação de diversas questões importantes, como diversificação e evolução dos grupos, aspectos ecológicos, biologia reprodutiva, entre outras (Chapman *et al.* 2003, Darvill *et al.* 2004, Knight *et al.* 2005) e, mediante o uso de ferramentas moleculares, a história biogeográfica e relações filogenéticas de alguns grupos têm sido estabelecidas (Dick *et al.* 2004, Batalha-Filho *et al.* 2010). Para esforços de conservação de espécies ameaçadas, por exemplo, uma importante ferramenta é a análise genética de populações (Frankham *et al.* 2010, Waples & Gaggiotti 2006, Palsboll *et al.* 2007).

Em razão da importância, maior facilidade na extração do DNA e elevado polimorfismo, foram utilizados genes mitocondriais e locos microssatélites na investigação da estrutura genética populacional e do grau de diferenciação das populações de *Partamona ailyae*. A hipótese deste trabalho a ser testada é a de que “a ocupação de uma área ocorre por uma ou poucas linhagens maternas e que o fluxo gênico entre as populações se dá devido ao papel dispersor dos machos”.

## 2. OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo analisar o processo de ocupação nos diversos sítios de ocorrência de *Partamona ailyae*, a genética de suas populações e o fluxo gênico interpopulacional.

Este objetivo exigiu o cumprimento dos três seguintes passos:

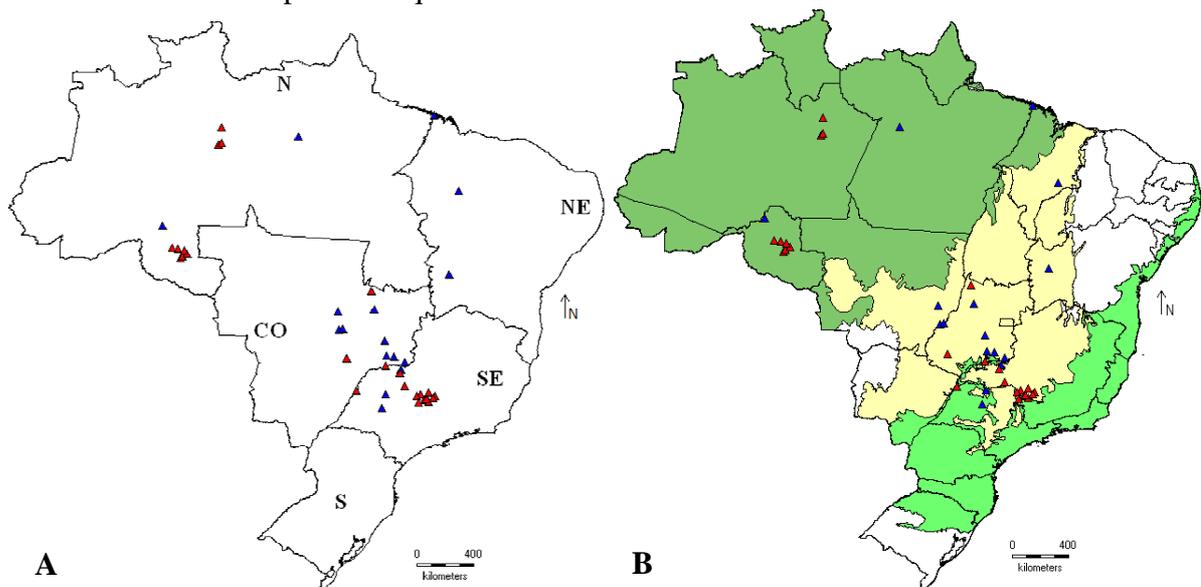
1. Estimar o número de linhagens maternas que deram origem às populações de *P. ailyae* atualmente residentes nos respectivos sítios amostrais. As linhagens de fêmeas fundadoras foram identificadas pelos haplótipos mitocondriais observados, considerando-se a herança materna deste tipo de marcador;
2. Estimar o nível de variação genética intra e interpopulacional a partir da variação detectada nos genes mitocondriais e, especialmente, nos locos microssatélites, avaliando o papel dos machos como dispersores, promovendo o fluxo gênico entre populações;
3. Determinar a estrutura sociogenética nidal a partir das segregações fenotípicas verificadas nos locos microssatélites, averiguando se as famílias derivam de uma estrutura monogínica/monândrica.

Além disso, este trabalho objetivou conhecer e relatar aspectos relevantes da história natural de *P. ailyae*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção dos espécimes

A partir de informações obtidas no trabalho de Camargo & Pedro (2003), bem como mediante a análise dos espécimes depositados nas coleções “Moure”, da Universidade Federal do Paraná, e “Camargo”, da FFCLRP - USP, foram selecionados sítios de ocorrência de *P. ailyae*. Com estes informes, foram definidas e realizadas oito expedições de coleta por toda a área de distribuição da espécie no período de maio de 2014 a julho de 2015 em cidades dos estados de São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Goiás (GO), Bahia (BA), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Maranhão (MA), Pará (PA), Amazonas (AM) e Rondônia (RO). As Figuras 4A e 4B evidenciam as Regiões brasileiras e os Biomas onde foram feitas buscas ativas de ninhos da espécie em questão.



**Figura 4.** Mapas evidenciando as Regiões brasileiras (A) e os Biomas (B) visitados durante as oito expedições de coleta. Os **triângulos azuis** representam as localidades com colônias ativas de *Partamona ailyae*. Os **triângulos vermelhos** se referem aos sítios onde a espécie não foi encontrada. Na Figura B o Verde escuro representa a Amazônia, o Amarelo representa o Cerrado e o Verde claro representa a Mata Atlântica. Os mapas foram gerados pelo programa Diva-Gis (<http://www.diva-gis.org/>).

Dentre as 41 localidades visitadas, em apenas 17 delas foram encontradas colônias ativas de *P. ailyae*, sendo coletados espécimes de 75 ninhos (Tabela 1); a Tabela 2 apresenta as 24 localidades nas quais não foram encontrados ninhos da espécie.

**Tabela 1.** Localidades amostradas com ninhos de *Partamona ailyae*.

Sítios	Localidades	Sigla	S	W	Altitude (m)	N
1	Icém-SP	ICE	-20.3404	-49.1981	469	7
2	Irapuã-SP	IRA	-21.2794	-49.4089	427	1
3	Caldas Novas-GO	CNO	-17.7452	-48.6253	712	10
4	Aragarças-GO	ACA	-15.8973	-52.2301	328	2
5	Crixás-GO	CRI	-14.5487	-49.9647	361	4
6	Catalão-GO	CAT	-18.1658	-47.9464	835	2
7	Goiânia-GO	GOI	-16.6786	-49.2539	757	3
8	Morrinhos-GO	MRR	-17.7311	-49.0994	726	4
9	Nova Xavantina-MT	NXA	-14.6668	-52.3459	303	14
10	Barra do Garças-MT	BGA	-15.8930	-52.2599	326	3
11	Pontal do Araguaia-MT	PAR	-15.8441	-52.0036	315	12
12	Barreiras-BA	BAR	-12.1482	-44.9925	454	1
13	Araguari-MG	ARA	-18.6510	-48.1854	746	4
14	Mirador-MA	MIR	-6.3708	-44.3631	223	1
15	Carutapera-MA	CAR	-1.195	-46.02	24	1
16	Porto Velho-RO	PVE	-8.76183	-63.9020	83	5
17	Belterra-PA	BEL	-2.6364	-54.9372	152	1
<b>Total</b>						<b>75</b>

**Tabela 2.** Localidades visitadas onde não foi detectada a ocorrência de *Partamona ailyae*.

Sítio	Localidades	Sigla	S	W
1	Uberaba-MG	UBE	-19.7502	-47.9325
2	Uberlândia-MG	UBL	-18.9113	-48.2622
3	Passos-MG	PAS	-20.7204	-46.6101
4	Alpinópolis-MG	ALP	-20.8561	-46.3824
5	Piumhi-MG	PIU	-20.4618	-45.9457
6	São João Batista do Glória-MG	SJB	-20.6233	-46.5232
7	Delfinópolis-MG	DEL	-20.3521	-46.8441
8	Ibiraci-MG	IBI	-20.4650	-47.1239
9	Capitólio-MG	CAP	-20.6047	-46.0719
10	São Sebastião do Paraíso-MG	SSP	-20.9173	-46.9914
11	São Roque de Minas-MG	SRM	-20.2328	-46.3671
12	Luis Alves-GO	LAL	-13.2660	-50.1547
13	Itumbiara-GO	ITU	-18.4216	-49.2155
14	Jataí-GO	JAT	-17.8759	-51.7214
15	Aparecida do Taboado-MS	ATA	-20.0890	-51.1030
16	Irlanduba-AM	IRA	-3.20113	-60.1782
17	Presidente Figueiredo-AM	PFI	-2.03435	-60.0259
18	Manaus-AM	MAN	-3.10719	-60.0261
19	Mirante da Serra-RO	MSE	-11.0273	-62.6787
20	Nova União-RO	NUN	-10.9079	-62.5580
21	Ouro Preto do Oeste-RO	OPO	-10.7117	-62.2550
22	Cacaulândia-RO	CAC	-10.3410	-62.8863
23	Jaru-RO	JAR	-10.4325	-62.4733
24	Monte Negro-RO	MNE	-10.2516	-63.2872

### **3.1.1. Procedimento de coleta**

As amostras foram coletadas por meio de busca ativa de ninhos. Os esforços de coleta foram de, no mínimo, 12 horas para cada sítio visitado. Em média, 15 operárias adultas foram coletadas de cada ninho e acondicionadas em tubos de 50 ml etiquetados, contendo etanol absoluto. Além disso, para cada ninho localizado foram coletados três a cinco indivíduos em tubo de 1,5 ml para serem montados a seco em alfinetes entomológicos, apropriadamente etiquetados com informações relevantes e enviados para confirmação taxonômica pela Dra. Sílvia Regina de Menezes Pedro (FFCLRP-USP).

As amostras foram levadas para o Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros da Universidade Federal de São Carlos (LGEH-UFSCar), onde se encontram estocadas em etanol absoluto a -20°C.

## **3.2. Análise dos genes mitocondriais**

### **3.2.1. Extração, amplificação e sequenciamento do DNA**

De cada um dos ninhos coletados, uma operária adulta teve seu DNA total extraído utilizando o método de Chelex 100 (Walsh *et al.* 1991); para tanto, foram utilizadas as pernas do lado esquerdo de cada indivíduo. Posteriormente, com a finalidade de se obter um resultado mais satisfatório, o DNA total de cada operária foi extraído mediante o método de fenol-clorofórmio (Sheppard & McPheron 1991); para este método, foi utilizado o tórax de cada indivíduo.

A partir de *primers* descritos para *Apis mellifera* e outros insetos, regiões correspondentes aos genes mitocondriais Citocromo Oxidase C (COI), Citocromo B (CytB), 12S, 16S e a região COI-COII foram amplificadas via PCR com um passo inicial de 94°C por três minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação); 20 segundos à temperatura de hibridização dos *primers* utilizados (CytB – 50°C, COI – 50°C, 12S – 50°C e 16S – 48°C,

COI-COII – 50°C); 72°C por 1 minuto (extensão), seguido por um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos. As reações ocorreram em volume final de 25µL contendo água esterilizada, 1X tampão de reação, 1µM de cada primer, 2.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 250µM de cada dNTP, 1U de Taq DNA Polimerase (Promega) e 1-2µL do DNA extraído. A visualização dos amplicons foi feita em géis de agarose 1% corados com Gel Red<sup>TM</sup> e submetidos à luz ultravioleta (UV).

Os *primers* utilizados para amplificação foram os rotineiramente empregados em nosso laboratório para estudo destes genes em outras espécies de *Partamona* (Tabela 3).

Os produtos de amplificação destas regiões foram purificados utilizando 2µL de Illustra<sup>TM</sup> ExoProStar<sup>TM</sup> 1-Step (GE) e 8µL do DNA amplificado, sendo incubados a 37°C por cerca de uma hora e a 80°C por 15 minutos. Os fragmentos amplificados e purificados foram visualizados em géis de agarose 1% corados com Gel Red<sup>TM</sup> e submetidos à luz ultravioleta.

**Tabela 3.** *Primers* utilizados neste trabalho para amplificação de genes mitocondriais.

Região	<i>Primers</i>	Referência
COI (629 pb)	F: 5' - GGA GAT CCA ATT CTT TAT CAA C - 3'	Afonso (2012)
	R: 5' - GAT ATT AAT CCT AAA AAA TGT TGA GG - 3'	Dick <i>et al.</i> (2004)
CytB (485 pb)	F: 5' - TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC - 3'	Hall & Smith (1991)
	R: 5' - ATT ACA CCT CCT AAT TAA TTA GGA AT - 3'	
12S (417 pb)	F: 5' - TAC TAT GTT ACG ACT TAT - 3'	Kambhampati & Smith (1995)
	R: 5' - AAA CTA GGA TTA GAT ACC C - 3'	
16S (569pb)	F: 5' - TAT AGA TAG AAA CCA ATC TG - 3'	Hall & Smith (1991)
	R: 5' - CAC CTG TTT ATC AAA AAC AT - 3'	
COI-COII (650 pb)	F: 5' - TCT ATA CCA CGA CGT TAT TC - 3'	Hall & Smith (1991)
	R: 5' - GAT CAA TAT CAT TGA TAGA CC - 3'	

As reações de sequenciamento foram realizadas no próprio laboratório. Para isso, foram utilizados 1µL de produto de PCR purificado, 3µL de tampão de sequenciamento (Save

Money 2,5 X), 1µL de BigDye v3.1 (Applied Biosystems), 10 picomoles do oligonucleotídeo iniciador e quantidade de água bidestilada estéril para completar 10µL.

Ao fim da reação, a qual consiste dos mesmos ciclos de amplificação para cada região genômica, as amostras foram mantidas a 4°C. Em seguida, 80µL de isopropanol 75% foram adicionados a cada reação. Depois de 15 minutos à temperatura ambiente, as soluções foram centrifugadas a 3040G em centrífuga Eppendorf 5804R com rotor para microplacas, por 30 minutos. Após precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas duas vezes com 200µL de etanol 70% seguido de centrifugação a 3040g por 10 minutos a 4°C e deixadas secar à temperatura ambiente. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Biotecnologia da FCAV – UNESP de Jaboticabal-SP, onde foram ressuspensas em 10µL de formamida, desnaturadas por 5 minutos a 95°C e corridas no sequenciador automático ABI 3730 XL. Em seguida, as sequências *forward* (F) e *reverse* (R) foram obtidas.

### **3.2.2. Análise das sequências nucleotídicas**

A qualidade dos eletroferogramas foi averiguada utilizando o software *Codon Code*<sup>®</sup> versão 4.2.5 (CodonCode, Dedham, Massachusetts, USA, 2013). Após edição das sequências, as mesmas foram alinhadas no software *BioEdit*<sup>®</sup> (Hall 1999), utilizando a ferramenta *CLUSTAL W* (Thompson *et al.* 1994).

O software *BLAST*<sup>®</sup> (Altschul *et al.* 1990) foi utilizado para identificar similaridades entre as sequências obtidas e as disponíveis no bancos de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e, com isto, certificarmos de estar trabalhando com a região de interesse.

### 3.3. Análise dos locos microssatélites

Para os locos de microssatélites foi analisado um espécime de cada ninho coletado, tendo seu DNA extraído utilizando o método fenol-clorofórmio (Sheppard & McPherson 1991).

Foram testados oito locos microssatélites utilizando *primers* heterólogos, sendo seis prospectados especificamente para *Partamona helleri* (Phel-1, Phel-2, Phel-3, Phel-4, Phel-6 e Phel-7) (Ferreira 2011), e dois delineados para *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Mbi232 e Mbi254) (Peters *et al.* 1998).

A PCR foi realizada em volume final de 10 ou 25  $\mu$ L, contendo 1  $\mu$ L do DNA extraído, 1  $\mu$ M de cada primer, 2.5 mM de cloreto de magnésio, 250  $\mu$ M de cada dNTP, 1X tampão de reação, 1U de Taq DNA Polimerase (Biotools) e água esterilizada. A reação ocorreu por 30 a 35 ciclos de 94°C por 30seg, 20seg à temperatura de hibridização para cada par de *primers* utilizado, e 70°C para extensão por um minuto. Para a identificação dos alelos dos microssatélites os *primers forward* foram marcados com fluoróforos (Tabela 4). Para estes, o produto da PCR foi diluído 10X e uma alíquota de 2  $\mu$ L foi misturada com 7.84  $\mu$ L de Tween 20 0.1% e 0.16  $\mu$ L de ET550-R (padrão de tamanho), e posteriormente submetida à corrida no sequenciador automático MegaBACE™1000. Os resultados obtidos foram analisados no software MegaBACE Genetic Profiler versão 1.2.

**Tabela 4.** Microssatélites heterólogos utilizados neste trabalho.

<b>Loco</b>	<b>Repetição</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Ta (°C)</b>	<b>Fluoróforo</b>
<b>Phel-1</b>	AC	217-247	56°C	TET
<b>Phel-2</b>	TC	260-312	52°C	TET
<b>Phel-3</b>	CT	99-101	48°C	JOE
<b>Phel-4</b>	GT	246-254	65°C	FAM
<b>Phel-6</b>	CA	174-180	52°C	HEX
<b>Phel-7</b>	TG	282-298	48°C	HEX
<b>Mbi254</b>	AAG	208-232	52°C	FAM
<b>Mbi232</b>	CTT	130-178	48°C	FAM

### 3.4. Índices de diversidade e estrutura populacional

O polimorfismo intraespecífico para os genes mitocondriais foi estimado por índices obtidos com o software *DnaSP*<sup>®</sup> v5.10.01 (Librado e Rozas 2009): diversidade haplotípica (Hd) (Nei 1987); diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) (Nei e Miller 1990), número de haplótipos e número de sítios polimórficos.

Uma rede de haplótipos para cada gene foi construída utilizando o software *NETWORK*<sup>®</sup> v4.6.1.3 pelo método median-Joining network (Bandelt *et al.* 1999) com a finalidade de representar as relações genealógicas entre as sequências.

A estrutura populacional, considerando o DNA mitocondrial, foi analisada através do software *Arlequin*<sup>®</sup> v3.5.1.2 (Excoffier e Lischer 2010). Com isso, foi possível averiguar a distribuição da variação inter e intrapopulacional mediante a Análise de Variância Molecular (AMOVA) com dois níveis hierárquicos, e através do valor de  $\phi_{ST}$  (análogo ao  $F_{ST}$ ), com significância de 5% e 1000 permutações.

Além disso, foi implementada a Análise de Variância Molecular Espacial (SAMOVA), através do programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.* 2002), para delimitar grupos genéticos entre localidades geograficamente homogêneas e maximamente diferenciadas entre elas. As análises foram corridas variando o número de grupos (k) de 2 a 6, e o agrupamento que indicou maior diferenciação foi escolhido como o k mais provável. Para os dados mitocondriais, o valor do agrupamento mais provável não foi significativo. Portanto, para esta análise, os grupos foram delimitados com base nos dados microssatélites, excluindo as amostras que não amplificaram para algum gene mitocondrial.

Para os locos microssatélites, inicialmente foi realizada uma análise para detecção de possíveis alelos nulos - através do estimador “Oosterhout”, por ser o que melhor se aplica ao caso -, ausência de amplificação, erros na genotipagem e amplificação preferencial de alelos menores, utilizando o programa Micro-checker v. 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

Após esta primeira análise, foi feita a estimativa dos parâmetros de diversidade, considerando  $\alpha=0.05$ , e um indivíduo selecionado aleatoriamente de cada ninho coletado. O número de alelos por loco, alelos privados, heterozigosidades esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) (Nei 1978) foram estimados para cada loco e população. Os locos foram testados quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) pelo teste de  $\chi^2$ , bem como a presença de desequilíbrio de ligação entre os locos estudados. Adicionalmente, foi feito o teste de atribuição ou “assignment test”, o qual atribui a população de origem de cada indivíduo comparando seu genótipo com os perfis de duas ou mais populações. Todas estas análises foram realizadas utilizando o programa GenAlex<sup>®</sup> 6.5 (Peakall e Smouse 2012).

Para verificar a estrutura populacional considerando os locos microsatélites, foi realizada a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992) com dois níveis hierárquicos e através do valor de  $\Phi_{ST}$  (análogo ao  $F_{ST}$ ), com significância de 5% e 1000 permutações.

O programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000) foi utilizado para verificar o número ideal de agrupamentos, usando burn-in de 100.000 interações e 1.000.000 de interações de MCMC (Markov Chain Monte Carlo), com dez replicações para  $K = 1$  a 17. Foi utilizado o modelo de ancestralidade de mistura e o modelo de frequências alélicas independentes. Os resultados do STRUCTURE foram compactados e importados para o programa Harvester (Earl 2012), o qual indica a convergência para delta K (número de grupos por localidade) (Evanno *et al.* 2005).

A correlação entre as distâncias geográficas e genéticas de populações foi testada através do programa Isolation by Distance web Service v. 3.23 (IBDWS) (Jensen *et al.* 2005) aplicando o teste de Mantel, com o intuito de verificar a presença de isolamento por distância entre as localidades. As distâncias genéticas foram calculadas em IBDWS com valores de  $\Phi_{ST}$  par a par geradas pelo programa Arlequin, e a significância estatística foi feita com um teste

de 1000 permutações. Esta análise foi implementada tanto para os dados mitocondriais quanto para os dados microssatélites.

### 3.5. Inferências demográficas

Foram realizados testes de neutralidade pelo método  $R_2$  (Ramos-Onsins & Rozas 2002) e estimativa do parâmetro  $F_s$  (Fu 1997) com a finalidade de investigar alterações no tamanho efetivo das populações de *Partamona ailyae* (expansão demográfica e gargalos populacionais). As análises foram realizadas através do programa DnaSP v5.10 (Librado & Rozas 2009). A significância dos testes foi obtida após 1000 simulações de coalescência.

A demografia histórica de cada linhagem filogenética foi construída a partir da metodologia do *Coalescent Bayesian Skyline Plot* – BSP (Drummond *et al.* 2005), com o objetivo de verificar flutuações no tamanho efetivo da população no decorrer do tempo. Essa análise foi implementada no programa BEAST<sup>®</sup> 1.8.2 (Drummond *et al.* 2015). A corrida foi implementada pressupondo um relógio molecular estrito e um comprimento de cadeias de MCMC de 60 milhões, amostrando a cada 1000 gerações. Para essa análise foram utilizados os fragmentos dos genes COI e CytB, resultando em 1114pb, 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 o HKY+I, selecionado com base no programa JModeltest versão 2.1.5 (Darriba *et al.* 2012), com critérios de informação Akaike (AIC). O programa BEAUTi versão 1.8 (Heled & Drummond 2010) foi utilizado para elaborar o arquivo de entrada do BEAST. Através do software Tracer versão 1.5 (Rambaut & Drummond 2009), os resultados foram verificados e foi feita a reconstrução demográfica visualizada pelo gráfico da análise de coalescência gerado no Tracer v. 1.5 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>).

### **3.6. História Natural**

Em campo, foram registradas algumas informações relevantes quanto à História Natural de *P. ailyae*, como o substrato utilizado para nidificação, ornamentação de entrada e densidade dos ninhos e os inimigos naturais da espécie. Além disso, os ninhos encontrados foram fotodocumentados e georreferenciados, e através dessas informações, foi registrada a elevação média dos sítios amostrados.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização da variação gênica e das linhagens mitocondriais

Foram amplificados e sequenciados fragmentos de quatro genes mitocondriais: COI, CytB, 12S e 16S, com 629, 485, 417 e 569 pares de bases (pb), respectivamente. Além disso, foi testada a região intergênica COI-COII, porém não foram obtidos resultados satisfatórios para esta região (ver seção 4.1.4).

Os índices de diversidade e outras informações para cada região gênica individualmente analisada, bem como para os genes concatenados (COI e CytB), encontram-se resumidos na Tabela 5.

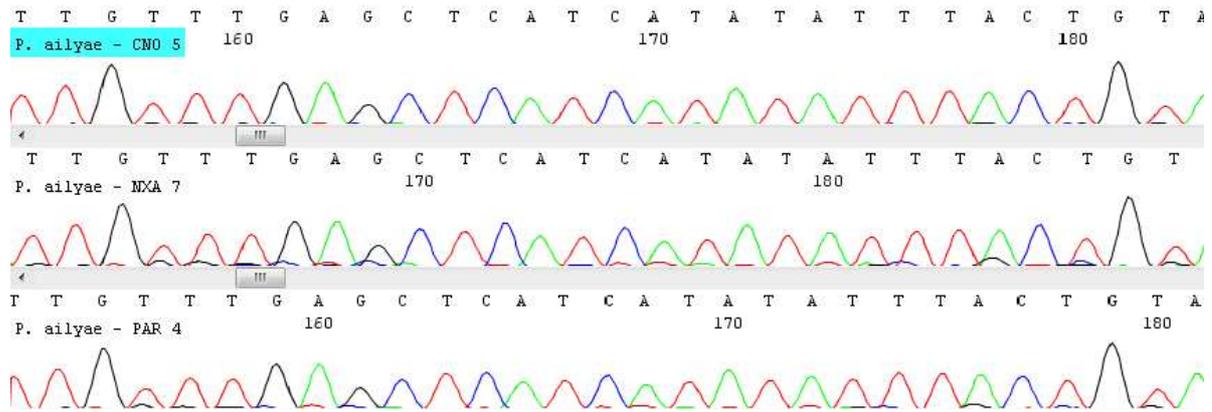
**Tabela 5.** Índices de diversidade para quatro regiões mitocondriais de *P. ailyae*, como para os genes concatenados (COI e CytB).

Gene	PB	n	G+C	S	H	$\pi/sd$	Hd/sd
COI	629	74	0,228	23	11	0,00510 $\pm$ 0,00107	0,726 $\pm$ 0,037
CytB	485	72	0,218	15	7	0,00493 $\pm$ 0,00106	0,646 $\pm$ 0,052
12S	417	31	0,177	6	2	0,00402 $\pm$ 0,00130	0,280 $\pm$ 0,090
16S	569	7	0,213	0	1	0	0
Concatenados	1114	71	0,223	34	13	0,00487 $\pm$ 0,00107	0,838 $\pm$ 0,028

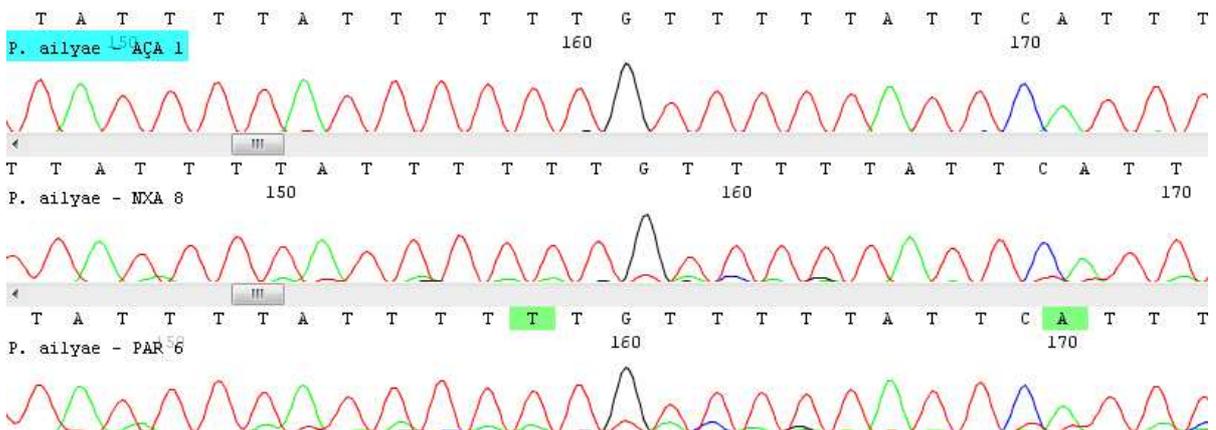
\* Tamanho do amplicon (pb), número amostral (n), conteúdo de GC, número de sítios variáveis (S), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e desvio padrão (sd).

#### 4.1.1. Subunidade I do Complexo Citocromo Oxidase C (COI) e Citocromo B (CytB)

Das 75 amostras coletadas, apenas a amostra de Barreiras não foi considerada para a região gênica COI por apresentar problemas na amplificação. Já para a região CytB, com exceção das amostras de Belterra, Carutapera e Mirador, que também apresentaram problemas na amplificação, as outras 72 amostras foram sequenciadas. Em cada posição das sequências usadas neste trabalho, os eletroferogramas permitiram que as bases nitrogenadas fossem identificadas inequivocamente, devido à excelente qualidade do sequenciamento obtido para as regiões gênicas em questão (Figuras 5 e 6).



**Figura 5.** Eletroferograma ilustrando a qualidade do sequenciamento obtido para a região gênica COI em amostras de *P. ailyae* das localidades de Caldas Novas, Nova Xavantina e Pontal do Araguaia.



**Figura 6.** Eletroferograma ilustrando a qualidade do sequenciamento obtido para a região gênica CytB em amostras de *P. ailyae* das localidades de Aragarças, Nova Xavantina e Pontal do Araguaia.

Foram verificados 23 sítios variáveis e 11 haplótipos distintos para o gene COI, enquanto que para CytB foram verificados 15 sítios polimórficos e sete haplótipos distintos. A composição nucleotídica verificada para estes genes foi de 77,2% e 78,1% de A+T, respectivamente, concordando com o descrito para o genoma mitocondrial de *Apis mellifera* (Crozier & Crozier 1993) e outros insetos, com A+T perfazendo cerca de 70 a 80% das bases. Foram observadas 22 mutações sinônimas para a região COI e apenas uma substituição nucleotídica resultou em mudança de aminoácido (Phe ↔ Leu) – na posição 594 da

sequência. Já para CytB, foram observadas 12 mutações sinônimas e três não-sinônimas (Ile ↔ Val) – nas posições 307, 319 e 397.

Ambas as regiões se mostraram bastante conservadas em *P. ailyae* nos respectivos sítios analisados, apresentando baixos valores de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), indicando alta similaridade entre os haplótipos. Os valores de diversidade haplotípica (Hd) foram elevados devido ao alto número de haplótipos encontrados e a ocorrência de haplótipos exclusivos de localidades.

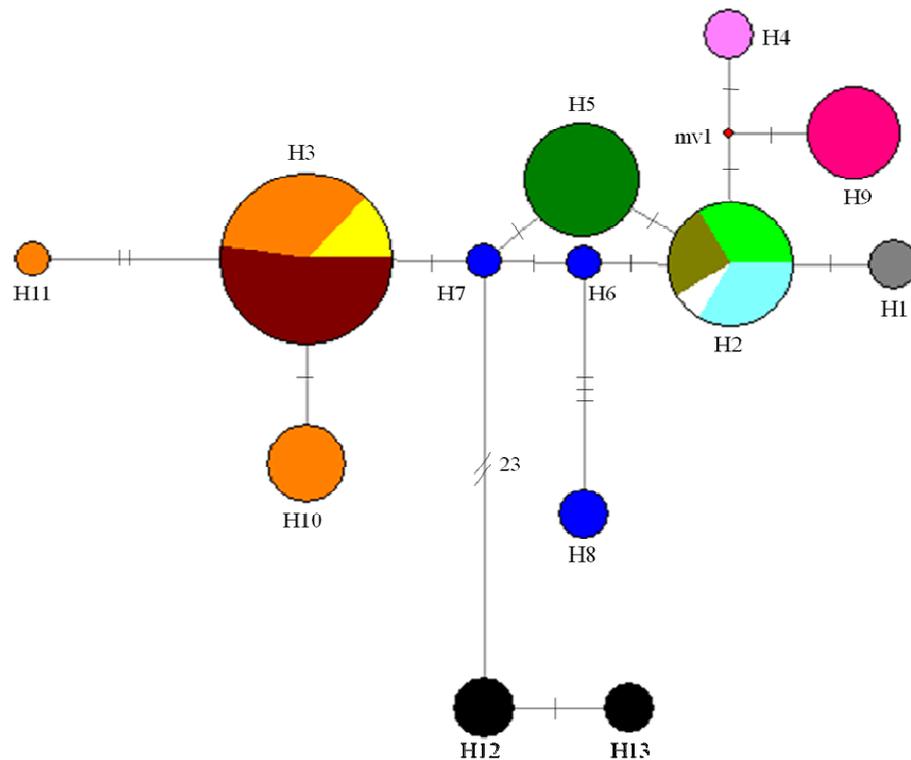
Para o COI, a Análise de Variância Molecular (AMOVA) demonstrou que 94% da variação genética é resultado de diferenças entre populações ( $\Phi_{ST} = 0,9387$ ;  $P = 0,000$ ). Da mesma forma, para CytB a análise demonstrou que 95% da variação genética é resultado de diferenças interpopulacionais ( $\Phi_{ST} = 0,9511$ ;  $P = 0,000$ ). As tabelas com os respectivos sítios amostrados e analisados com a distribuição dos haplótipos em cada um deles, as redes haplotípicas e as sequências completas para cada haplótipo de cada uma dessas regiões gênicas podem ser visualizadas no Apêndice 1 (Figuras 20 e 21).

#### **4.1.2. Genes concatenados (COI e CytB)**

Com o objetivo de ilustrar as relações entre os haplótipos, uma rede para genes concatenados foi construída (Figura 7). Para tanto, foram utilizadas sequências concatenadas apenas dos genes mitocondriais COI e CytB (1114 pb), por terem sido os genes mais variáveis no presente estudo. As amostras que apresentaram problemas na amplificação para um e/ou para outro gene foram retiradas, totalizando, portanto, 71 sequências concatenadas analisadas.

Foram observados 34 sítios variáveis e 13 haplótipos distintos para estes genes concatenados. Haplótipos únicos e exclusivos foram verificados nas colônias de Aragarças, Catalão, Caldas Novas, e Icém (H1, H4, H5 e H9, respectivamente). Além disso, haplótipos exclusivos foram encontrados nas localidades de Crixás (H6, H7 e H8), Nova Xavantina (H10





**Figura 7.** Rede de haplótipos para dois genes concatenados, construída pelo método *Median-Joining* a partir de 71 amostras de *P. ailyae* provenientes de 13 localidades. As cores identificam os sítios amostrais e estão de acordo com a legenda da Tabela 6.

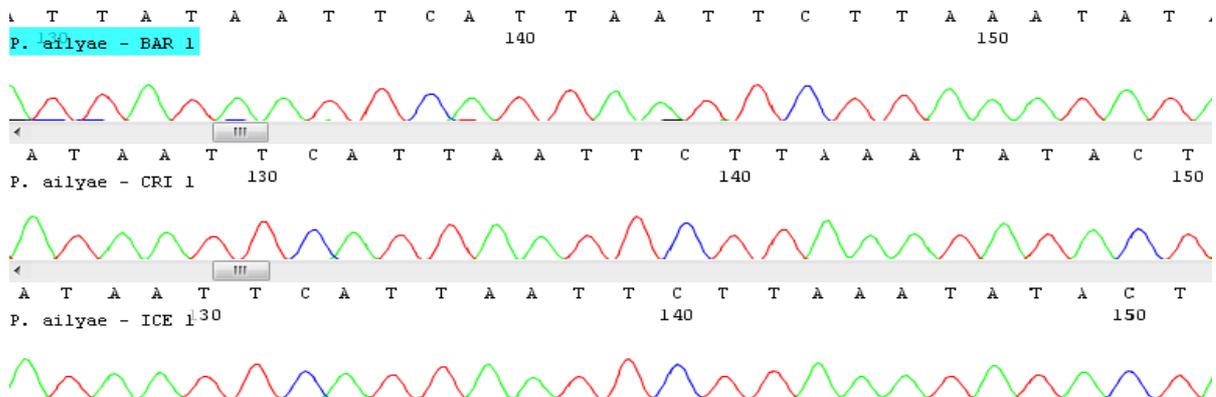
A Análise de Variância Molecular (AMOVA) demonstrou que 94% da variação genética é resultado de diferenças interpopulacionais. Portanto, foi observada uma elevada diferenciação entre as populações analisadas ( $\Phi_{ST} = 0.9426$ ;  $P = 0,000$ ).

O teste de Mantel mostrou uma correlação positiva significativa entre as distâncias genéticas e geográficas ( $r = 0,2589$ ;  $P = 0,0231$ ).

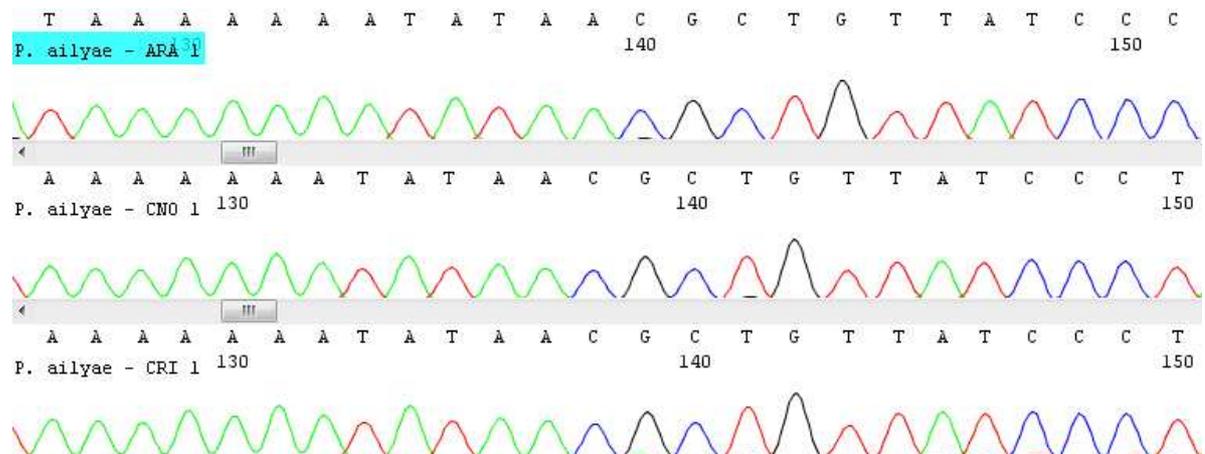
#### 4.1.3. *Genes ribossomais 12S e 16S*

Das 17 localidades, amostras de apenas sete localidades distintas foram sequenciadas para o 12S, totalizando 31 sequências analisadas, enquanto para o 16S, apenas sete amostras de quatro localidades distintas foram sequenciadas. Poucas amostras foram sequenciadas para estes genes ribossomais devido à falta de variação encontrada. Para ambas as regiões, foram

obtidos excelentes padrões nos eletroferogramas, possibilitando a identificação inequívoca das bases nitrogenadas (Figuras 8 e 9).



**Figura 8.** Eletroferograma ilustrando a qualidade do sequenciamento obtido para a região gênica 12S em amostras de *P. ailyae* das localidades de Barreiras, Crixás e Icém.



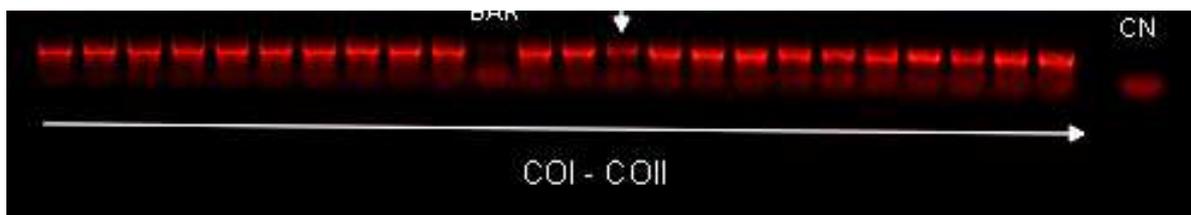
**Figura 9.** Eletroferograma ilustrando a qualidade do sequenciamento obtido para a região gênica 16S em amostras de *P. ailyae* das localidades de Araguari, Caldas Novas e Crixás.

Estas regiões se mostraram bastante conservadas para *P. ailyae*. Das 31 amostras analisadas para o 12S em *P. ailyae*, 26 delas apresentaram o mesmo haplótipo (H1), enquanto H2 foi observado nas cinco amostras de Porto Velho (Apêndice 1 / Figura 24). Já para o 16S, todas as sete amostras sequenciadas, provenientes de quatro localidades, apresentaram o mesmo haplótipo (Apêndice 1 / Figura 26).

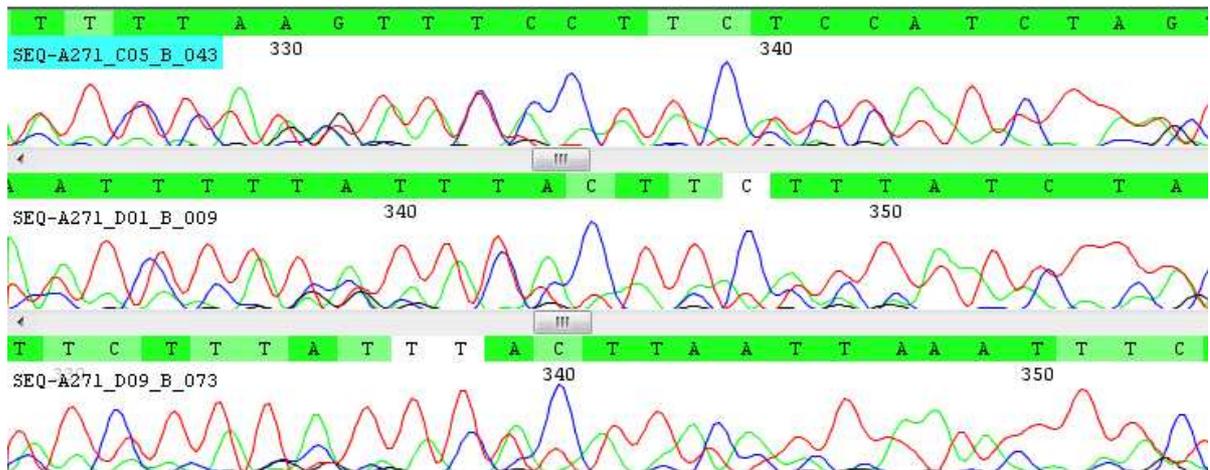
Embora o gene 12S não tenha apresentado variação para *P. ailyae*, foi observado um resultado interessante. Todas as 31 amostras analisadas apresentaram repetição/inserção de cinco bases a partir da posição 25 da sequência (Apêndice 1 / Figura 25). Estudos realizados em nosso laboratório mostram que este gene ribossomal não possui essa repetição/inserção em amostras de outras espécies de *Partamona*, como *P. rustica*, *P. helleri*, *P. cupira*. Este resultado se mostrou muito interessante porque, de certa forma, corroborou a identificação específica das amostras de Porto Velho feita pela especialista, mostrando que *P. ailyae* possui esta particularidade frente a outras espécies do gênero. Na Figura 25 do Apêndice 1 é mostrada a variação desta região entre três espécies do gênero.

#### 4.1.4. Região intergênica COI-COII

Em razão da falta de variação encontrada nos genes ribossomais 12S e 16S, a região intergênica COI-COII foi incluída na análise. Para tanto, as mesmas amostras que foram sequenciadas para o fragmento do gene 12S, exceto as cinco amostras de Porto Velho, foram testadas e sequenciadas para COI-COII (26 amostras). Entretanto, apesar da amplificação das amostras para esta região ter apresentado resultados satisfatórios, demonstrando excelente resolução no gel de agarose (Figura 10), não foram obtidos bons resultados no que concerne ao sequenciamento, pois nenhuma sequência foi passível de análise devido à péssima qualidade dos eletroferogramas (Figura 11).



**Figura 10.** Comportamento eletroforético do fragmento do gene mitocondrial COI-COII – *primers* descritos por Hall & Smith (1991) – visualizado em gel de agarose. CN = Controle negativo.



**Figura 11.** Eletroferograma ilustrando a qualidade do sequenciamento obtido para a região intergênica COI-COII em amostras de *P. ailyae*.

#### 4.2. Análise dos Microssatélites

Das 75 amostras coletadas, apenas a amostra de Barreiras apresentou problemas na amplificação.

Para esta análise utilizando *primers* heterólogos, todos os oito locos testados amplificaram para *P. ailyae*, assim como para outras espécies do gênero, como *P. helleri* (Ferreira 2011), *P. rustica* (Miranda *et al.* sub.), *P. seridoensis* (Fernandes 2012) e *P. cupira* (dados do LGEH não publicados). Todos estes microssatélites apresentaram repetições perfeitas de Di ou Trinucleotídeos, conforme esperado.

Inicialmente, foram identificados e devidamente corrigidos alelos nulos em amostras das populações de Caldas Novas, Pontal do Araguaia e Nova Xavantina para o loco Phel-4.

Embora os *primers* tenham sido delineados para outras espécies, nenhum dos locos analisados se mostrou monomórfico, exceto quando analisados individualmente para determinadas populações de *P. ailyae*. O único loco que se mostrou polimórfico para todas as populações analisadas foi o Phel-1, sendo este o mais variável em número de alelos. O número médio de alelos por loco foi de 8,4, variando de 3 a 25 alelos por loco identificados

através da detecção do produto em sequenciador automático. O percentual médio dos locos polimórficos foi de 69%.

Para os locos prospectados para *M. bicolor* utilizados neste estudo, foram identificados sete alelos distintos para Mbi232, com o alelo 123 sendo o mais frequente. Já o loco Mbi254 apresentou nove alelos distintos, e o alelo 208 foi considerado o mais frequente (Apêndice 1, Quadro 1). Nenhum dos alelos para estes locos foi observado em amostras de todas as localidades analisadas. Entretanto, alguns alelos privativos de populações foram observados.

Já para os microssatélites prospectados para *P. helleri*, o loco mais variável foi Phel-1, apresentando 25 formas alélicas. Quanto às frequências alélicas, o alelo 282 do loco Phel-7 foi o mais frequente entre todos (Apêndice 1, Quadro 1). Além disso, também foram observados vários alelos privativos (ou exclusivos) de populações. As populações de Porto Velho, por exemplo, apresentaram seis alelos privativos para quatro locos (Phel-1, Phel-2, Phel-3 e Phel-6).

Embora não tenha sido detectado desequilíbrio de ligação em nenhum caso, a análise dos locos microssatélites demonstrou que as populações de Caldas Novas apresentaram desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para o loco Phel-4. As demais populações se mostraram em equilíbrio genético para todos os locos microssatélites estudados.

Foram observados valores negativos do coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) para vários locos polimórficos analisados para as amostras de *P. ailyae* coletadas nas 16 áreas de estudo, com valor médio de -0,261. O valor médio da heterozigosidade esperada foi de 0,319, enquanto que o valor médio da heterozigosidade observada foi de 0,399 (Tabela 7).

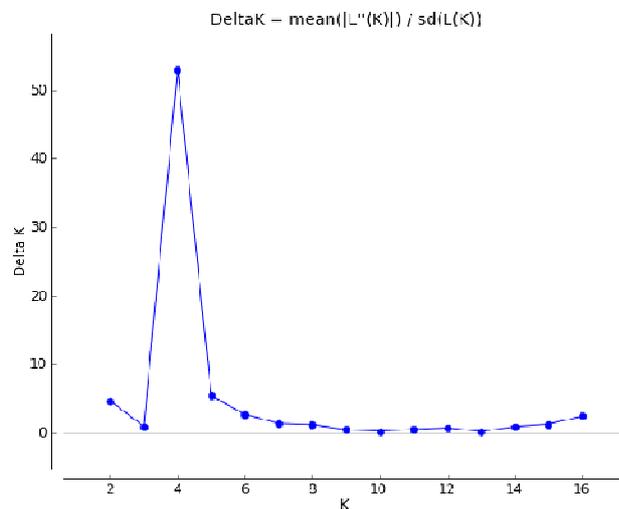
**Tabela 7.** Valores de heterozigosidades observada e esperada ( $H_o$  e  $H_e$ ) e Coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) para os oito locos estudados. \* Desvio padrão.

<b>Locos</b>	<b><math>H_e</math></b>	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>F_{IS}</math></b>
<b>Mbi232</b>	0,358	0,535	-0,493
<b>Mbi254</b>	0,406	0,604	-0,489
<b>Phel-1</b>	0,642	0,700	-0,091
<b>Phel-2</b>	0,414	0,513	-0,239
<b>Phel-3</b>	0,099	0,133	-0,336
<b>Phel-4</b>	0,283	0,246	0,131
<b>Phel-6</b>	0,265	0,352	-0,327
<b>Phel-7</b>	0,089	0,110	-0,239
<b>Média</b>	<b>0,319</b>	<b>0,399</b>	<b>-0,261</b>
<b>DP*</b>	<b>0,180</b>	<b>0,222</b>	<b>0,207</b>

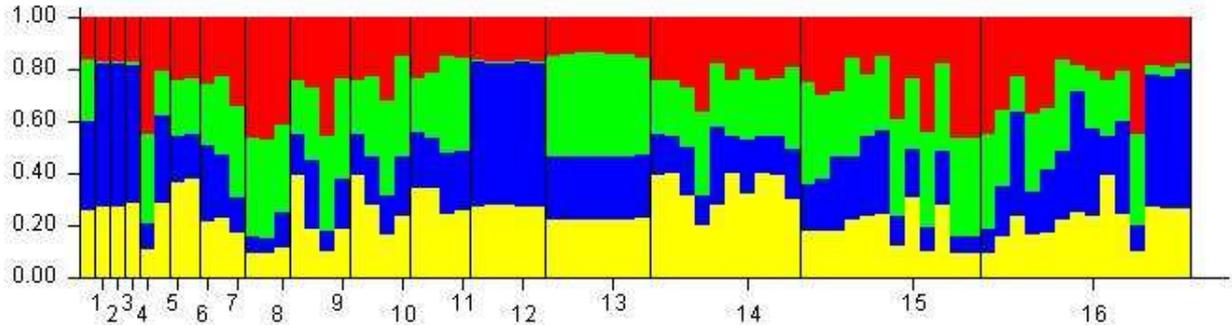
Para os dados nucleares, o teste de Mantel não indicou correlação significativa entre as distâncias genéticas e geográficas ( $r = 0,2090$ ;  $P = 0,0610$ ).

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) atribuiu 14,9% da variação observada para os locos microssatélites a diferenças entre populações ( $\phi_{ST} = 0,1491$ ;  $P = 0,000$ ). O teste de atribuição ou “Assignment test” indicou que apenas 50% das amostras foram corretamente identificadas à sua população de origem.

De acordo com a metodologia de Evanno *et al.* (2005), quatro grupos foram identificados por meio do  $\Delta K$  como sendo o modelo ideal (Figura 12). Através da análise Bayesiana realizada pelo programa STRUCTURE, foi verificado que todos os indivíduos das respectivas populações têm probabilidade de pertencer a mais de um grupo (Figura 13).



**Figura 12.** Representação do número ideal de agrupamentos identificado pelo programa STRUCTURE de acordo com a metodologia de Evanno *et al.* (2005). As análises foram baseadas em oito marcadores microssatélites de 16 localidades de *P. ailyae*.



**Figura 13.** Distribuição de genótipos de *P. ailyae* em grupos de acordo com análises de estruturação (K=4) por meio do Programa STRUCTURE, baseado em oito locos microssatélites. **Localidades:** IRA (1), MIR (2), CAR (3), BEL (4), ACA (5), CAT (6), GOI (7), BGA (8), CRI (9), MRR (10), ARA (11), PVE (12), ICE (13), CNO (14), PAR (15) e NXA (16).

#### 4.2.1. Genética Familiar

Para esse estudo, foram considerados os dados obtidos de 10 ninhos de nove localidades distintas, em que foram analisadas, em média, oito operárias de cada um dos ninhos para todos os oito locos. Para os demais ninhos, duas fêmeas adultas foram analisadas.

Conforme esperado para a hipótese de monandria, todas as operárias das colônias analisadas apresentaram um alelo comum herdado do macho parental. Para os ninhos em que apenas duas operárias foram analisadas, foi observada a presença de, no máximo, três alelos distintos.

#### 4.3. Inferências demográficas

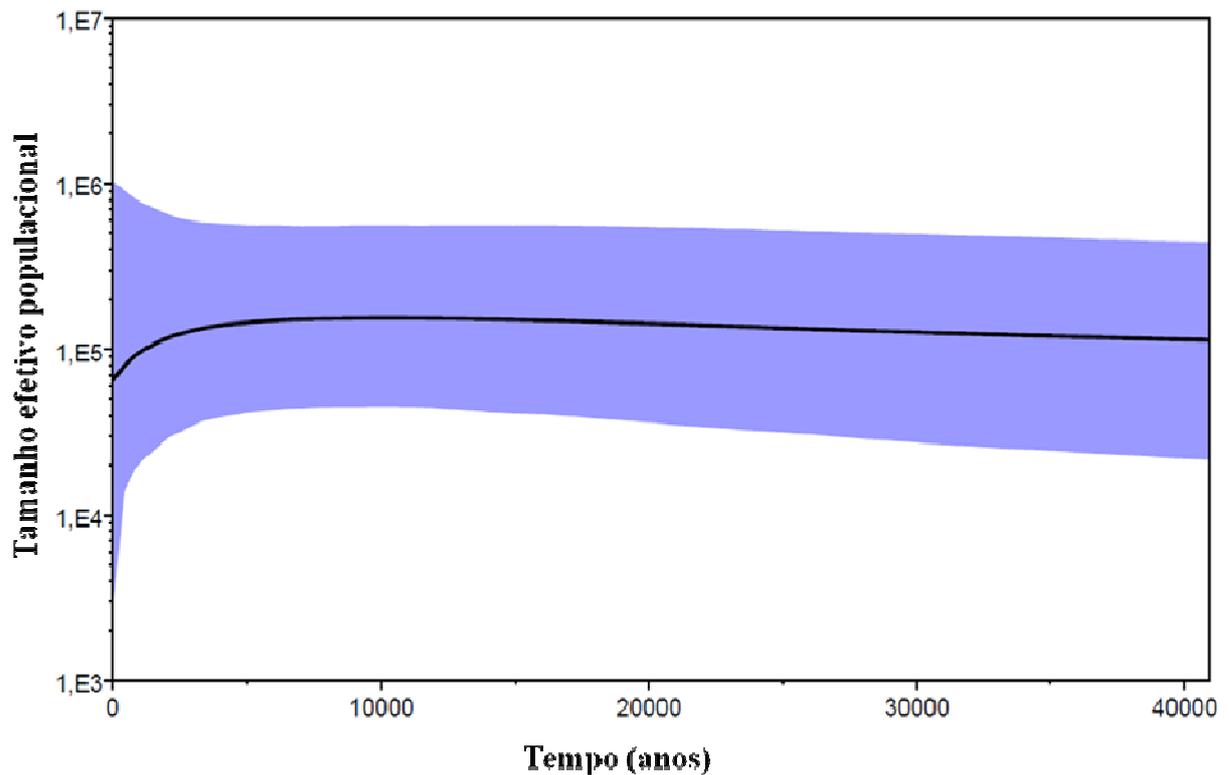
Inicialmente, foi realizada a Análise de Variância Molecular Espacial (SAMOVA) utilizando os dados mitocondriais; entretanto, não foram obtidos valores significativos. Diante disto, esta análise foi implementada com base nos dados de microssatélites, e delimitou dois grupos distintos, que podem ser facilmente identificados na genealogia apresentada na Figura 7. O primeiro grupo é composto por 66 amostras, distribuídas em 12 localidades (haplótipos

números 1 a 11) e o segundo é composto pelas cinco amostras coletadas em Porto Velho (haplótipos 12 e 13).

Inicialmente, para verificar se as populações de *P. ailyae* passaram por eventos de expansão ou retração populacional, o padrão de formato da rede haplotípica foi analisado. É possível verificar que a genealogia observada na Figura 7 não apresenta um padrão de rede em formato de estrela, ou seja, um ou dois haplótipos comuns centrais, possivelmente sendo os ancestrais, ligados a muitos outros haplótipos mais raros. Esse resultado indica que, provavelmente, as populações de *P. ailyae* não passaram por eventos de expansão populacional.

Para confirmar esta informação, foram aplicados testes de desvios de neutralidade como o  $R_2$  (Ramos-Onsins & Rozas 2002) e o  $F_s$  de  $F_u$  (Fu 1997). Para o primeiro grupo, o  $F_s$  de  $F_u$  foi de -1,3260 e o  $R_2$  foi de 0,0929, enquanto que para o segundo grupo o  $F_s$  de  $F_u$  foi de 0,6262 e o  $R_2$  foi de 0,3000, valores estes não significativos estatisticamente.

Além disso, com o objetivo de verificar possíveis flutuações no tamanho efetivo populacional de *P. ailyae* no decorrer do tempo, a demografia histórica da espécie foi construída a partir da metodologia *Coalescent Bayesian Skyline Plot* – BSP (Drummond *et al.* 2005). Esta análise foi implementada apenas para o primeiro grupo, pois o segundo não possui variação suficiente para a análise de coalescência. O resultado revelou uma estabilidade nas flutuações do tamanho efetivo da espécie nos últimos 35 mil anos antes do presente e um possível gargalo populacional iniciado aproximadamente cinco mil anos atrás (Figura 14).



**Figura 14.** História demográfica de *Partamona ailyae* baseada nas regiões mitocondriais CytB e COI concatenadas (1114pb). A linha preta representa a mediana estimada, e as linhas azuis mostram o limite inferior e superior com 95% de confiança.

#### 4.4. História Natural

Durante as oito expedições de coleta realizadas nesta pesquisa, foram obtidas informações relevantes quanto à história natural de *P. ailyae*, conforme seguem abaixo.

##### 4.4.1. Substratos utilizados para nidificação

Foi observado que *P. ailyae* utiliza uma ampla gama de substratos para construção de seus ninhos, como termiteiros subterrâneos, termiteiros em tocos de árvores secas ou podres, termiteiros no interior de árvores vivas e termiteiros epígeos do tipo “murundu”. Nas regiões centro-oeste e sudeste do Brasil, 47% dos ninhos da espécie estavam em termiteiros epígeos do tipo “murundu”. Além dos substratos supracitados, foram encontrados ninhos de *P. ailyae* em barrancos (n=2), no solo (n=5) e em formigueiros (n=3); há ainda informação de que a

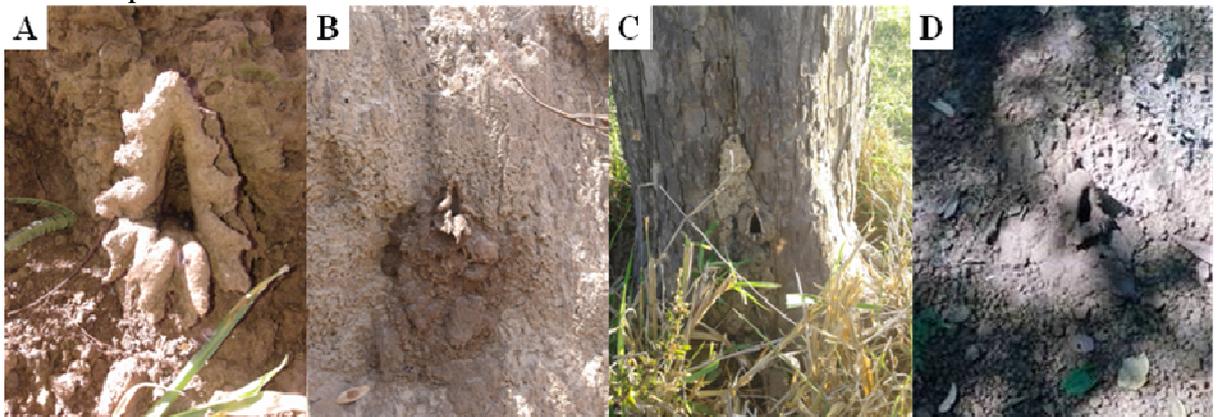
espécie também construa seus ninhos em paredes de casas, a uma altura aproximada de um metro do solo, conforme relatado por meliponicultor de Barra do Garças (MT).

Apenas um dos ninhos de *P. ailyae* encontrado em Nova Xavantina teve seu térmita hospedeiro identificado (*Cornitermes sp.*) por pesquisadores da Universidade Estadual do Mato Grosso (UNEMAT). Em razão do material extremamente resistente do revestimento dos termiteiros, não foi possível realizar a coleta dos outros térmitas que abrigavam os ninhos de *P. ailyae*, porque seria necessário danificar parte considerável do termiteiro, algo que seria prejudicial tanto para os cupins quanto para as abelhas.

Dos 75 ninhos de *P. ailyae* coletados, apenas dois, em Pontal do Araguaia, foram encontrados no mesmo termiteiro; todos os demais eram ninhos solitários, ou seja, apenas um em cada substrato.

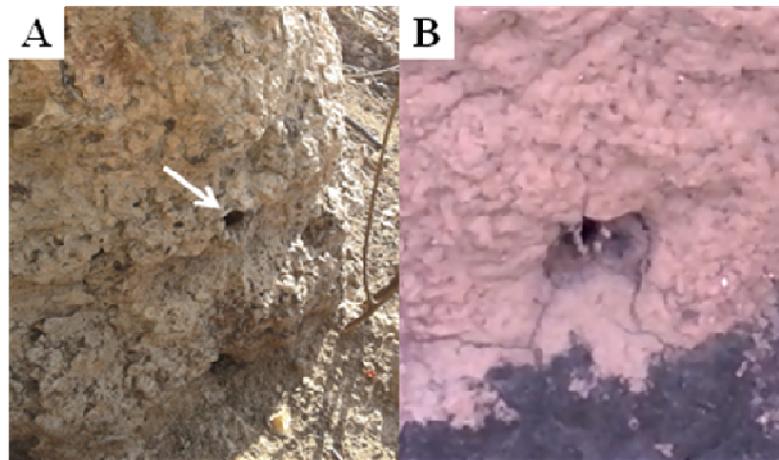
#### 4.4.2. Ornamentação de entrada dos ninhos

Foi verificado que, em 89% dos casos, a ornamentação de entrada do ninho de *P. ailyae* se assemelhava a um triângulo equilátero (Figura 15). Devido a este formato na entrada do ninho, a espécie é conhecida popularmente em algumas regiões do Brasil Central como “abelha sapa”.

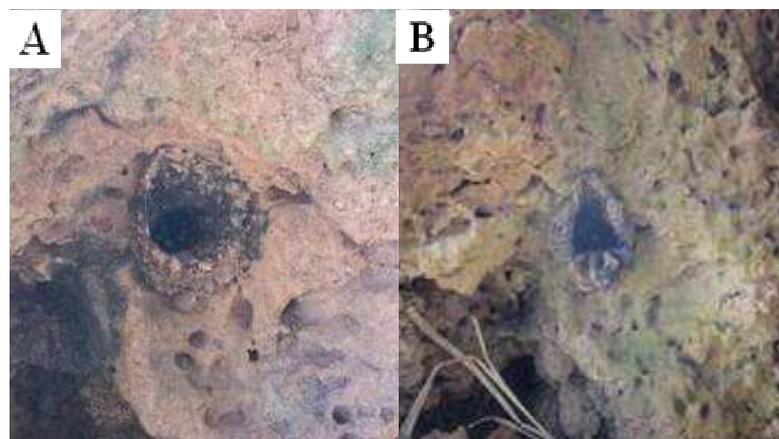


**Figura 15.** Estruturas de entradas de ninhos de *Partamona ailyae*. **A:** Ninho em termiteiro na base de árvore viva (Caldas Novas); **B:** Ninho em barranco (Barra do Garças); **C:** Ninho na base de tronco de árvore viva (Caldas Novas); **D:** Ninho no solo (Icém).

Quando os ninhos de *P. ailyae* são construídos em termitários epígeos do tipo “murundu”, isolados no solo, foi observado que a ornamentação de entrada é usualmente simples, muito semelhante à ornamentação de entrada do ninho de *P. cupira* (Figura 16). Como a distribuição geográfica de *P. ailyae* é parcialmente sobreposta à distribuição de *P. cupira*, quando ninhos semelhantes quanto ao padrão de ornamentação eram encontrados, o que diferenciava uma espécie da outra, em campo, era o comportamento de defesa mais acentuado de *P. ailyae*. É possível, porém, que alguns desses ninhos com ornamentação mais simples estivessem em fase de construção (Figura 17).



**Figura 16.** Ornamentação de entrada do ninho. **A:** Ninho de *P. ailyae* em termitário epígeo do tipo “murundu” (Nova Xavantina, MT); **B:** Ninho de *P. cupira* em termitário epígeo do tipo “murundu”, isolado (Caldas Novas, GO).



**Figura 17.** Ninho de *P. ailyae* em Araguari, MG, verificado em maio de 2014 (**A**) e em maio 2015 (**B**).

#### 4.4.3. *Inimigos naturais*

A ação de meleiros configura uma das principais ameaças à preservação de algumas espécies de *Partamona*, embora a maioria das espécies do gênero não apresente um mel tão apreciado, como é o caso de *P. ailyae*.

Embora *P. ailyae* não seja ameaçada pela ação de meleiros, a ação humana é uma ameaça frequente. Foram encontrados ninhos de *P. ailyae* envenenados e queimados porque os indivíduos da espécie são, eventualmente, confundidos por moradores e agricultores com os indivíduos de *Trigona spinipes* Fabricius, uma espécie considerada por estas pessoas como prejudicial para culturas como laranja e maracujá, por exemplo.

Outra ameaça aparente para algumas espécies de *Partamona* são as formigas. Em Araguari foi encontrado um ninho de *P. ailyae* predado por estes animais (espécie não identificada). Nem todas as espécies de formigas apresentam ameaças para *P. ailyae*, tendo em vista que três ninhos desta espécie foram encontrados em formigueiros.

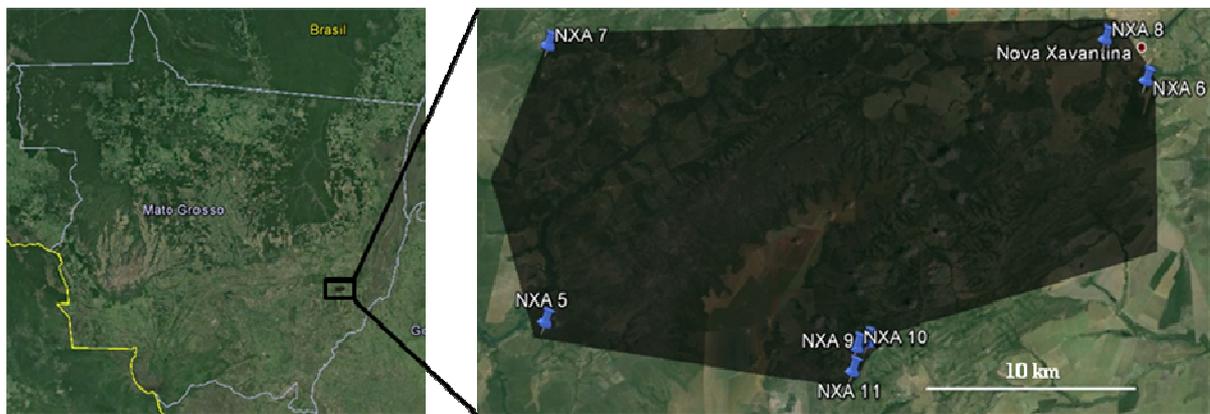
#### 4.4.4. *Aspectos biogeográficos*

Os ninhos de *P. ailyae* foram encontrados numa altitude média de 425 m  $\pm$  248,54 nos sítios amostrados. A maior altitude relatada foi no município de Catalão, GO (835 m), enquanto que a menor foi em Carutapera, MA (24 m), conforme Tabela 1.

Mediante análise dos espécimes depositados nas coleções “Camargo” e “Moure”, foi verificado que *P. ailyae* ocorre em áreas de clima super-úmido, úmido, semi-úmido e semi-árido. Entretanto, os espécimes coletados nesta pesquisa só foram encontrados em localidades de clima úmido e semi-úmido. Nas regiões onde os ninhos foram localizados, foi verificado que a espécie, preferencialmente, nidifica próximo a cursos d’água, em áreas úmidas e sombreadas.

#### 4.4.5. Densidade dos ninhos

Apesar de *P. ailyae* ter ampla distribuição (Figura 3), provavelmente esta espécie deve apresentar baixa densidade de ninhos em determinadas regiões, o que configurou grande dificuldade na localização dos mesmos. Em Nova Xavantina, por exemplo, foram feitos esforços de coleta em uma área considerável, mas apenas sete ninhos foram encontrados na segunda visita à cidade. Além disso, quando um ninho era localizado, na maioria das vezes, dificilmente outros o eram, apesar de grande parte da área ter sido percorrida (Figura 18). Esse mesmo padrão foi verificado em outras localidades.



**Figura 18.** Área amostrada em Nova Xavantina na segunda expedição de coleta. A escala ilustra a distância de um ninho para o outro, revelando a dificuldade em encontrar novos ninhos na mesma área. A ordem dos ninhos coletados está relatada nos números de 5 a 11.

Durante as coletas, foi constatado que os moradores das regiões visitadas pouco sabiam sobre *P. ailyae*, possivelmente devido à baixa densidade, bem como à natureza inconspícua de seus ninhos, que apesar de serem bem ornamentados na maioria das vezes, não são tão fáceis de serem encontrados em seu ambiente natural.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização da variação gênica e estrutura populacional

Dentre as quatro regiões mitocondriais analisadas, os níveis de polimorfismo estimados demonstraram que os fragmentos de COI e CytB para *P. ailyae* foram os mais variáveis, com 11 haplótipos observados para COI em 16 localidades (n=74) e sete haplótipos observados para CytB em 14 localidades (n=72).

Utilizando *Partamona helleri* como organismo modelo – uma abelha que também possui baixa capacidade de dispersão em razão da sua biologia – Ferreira (2011) verificou poucos haplótipos para a região COI, onde somente dois haplótipos foram encontrados no *campus* da USP-RP (n=25), um haplótipo no *campus* da UFSCar (n=34) e um na USP-SP (n=14). Um resultado similar foi encontrado para o gene CytB, com a diferença que foram observados três haplótipos na USP-RP. Em recente trabalho realizado no LGEH utilizando *P. helleri* (dados não publicados), foram observados 43 haplótipos para COI em 58 localidades amostradas (n=278) e 33 haplótipos para CytB em amostras de 55 localidades analisadas (n=271). De igual maneira, ao analisar 145 ninhos de *Partamona rustica* – uma espécie de ocorrência restrita e endêmica do bioma Caatinga –, foram observados 10 haplótipos para COI em amostras de 11 sítios amostrados (Miranda *et al* sub.).

Embora os genes ribossômicos 12S e 16S não tenham apresentado variação para *P. ailyae*, isso não foi verificado em outras espécies de *Partamona*. Resultados dos trabalhos supracitados desenvolvidos no LGEH mostraram quatro haplótipos observados em 145 amostras de *P. rustica* analisadas, enquanto que para *P. helleri*, 13 haplótipos foram encontrados em 276 amostras analisadas, ambas as análises para o 12S (Miranda *et al* sub., dados não publicados).

Quanto às substituições observadas no presente estudo, a mesma substituição não-sinônima (Phe ↔ Leu) foi verificada na mesma posição 594 da região COI no trabalho feito

com *P. rustica*. Utilizando o mesmo gene para *P. helleri*, Ferreira (2011) observou 12 sítios polimórficos entre os indivíduos analisados, porém, nenhuma das substituições resultou em troca de aminoácidos, ao contrário do que essa autora observou para o gene CytB, onde houve alteração de sete aminoácidos, principalmente entre fenilalanina e leucina em quatro posições do fragmento do gene.

As análises de estrutura populacional foram baseadas nos genes concatenados (COI e CytB). A AMOVA demonstrou que 94% da variação genética total é devida a variação entre populações, sendo observada uma elevada diferenciação entre as populações analisadas ( $\Phi_{ST} = 0.9426$ ;  $P = 0,000$ ). Miranda *et al.* (sub.), utilizando *P. rustica* como modelo, encontrou resultados semelhantes, indicando elevada diferenciação para os genes concatenados. Ferreira (2011) observou que 31,8% ( $\Phi_{ST} = 0,3184$ ;  $P = 0,000$ ) da variação total é resultado de diferenças entre as populações de *P. helleri* analisadas, indicando moderada diferenciação entre as populações da espécie.

O teste de Mantel mostrou uma baixa, porém significativa, correlação entre distância genética e distância geográfica ( $r = 0,2589$ ;  $P = 0,0231$ ). Para os dados mitocondriais, Miranda *et al.* (sub.) não verificaram isolamento por distância entre as populações de *P. rustica*, observando valores não significativos para o teste de Mantel.

Nossa hipótese de trabalho é sustentada pelos valores obtidos, sugerindo que a ocupação de um sítio ocorre por uma ou poucas linhagens maternas, sendo ratificada pela presença de poucos haplótipos por sítio e, principalmente, pelos haplótipos únicos e exclusivos de localidades.

### **5.1.1. Região intergênica COI-COII**

Os resultados observados para a região intergênica COI-COII em *P. ailyae* sugerem a possibilidade de estarmos amplificando cópias nucleares deste gene mitocondrial (*Numts*).

Nos estudos realizados no LGEH utilizando *P. rustica* (Miranda *et al.* sub.), bons resultados foram observados para esta espécie utilizando o mesmo par de *primers*. Entretanto, resultados semelhantes foram observados para *P. rustica*, só que para a região Cytocromo B, sugerindo a presença de *Numts*. Miranda (2012) também caracterizou a presença de *Numts* para o gene CytB em algumas espécies do gênero, inclusive em *P. rustica* e *P. ailyae*, embora as sequências de CytB tenham sido obtidas sem qualquer dificuldade para 72 amostras de um total de 75 coletadas de *P. ailyae*. A região analisada se encontra internamente à região amplificada por Miranda (2012). As amostras com *Numts* observadas por este autor foram coletadas em Araguari-MG, ao contrário do que foi observado nesta pesquisa. É possível que tenha ocorrido algum problema de anelamento de *primers* na região analisada por Miranda (2012).

## 5.2. Linhagens mitocondriais

A presença de poucos haplótipos por sítio e, principalmente, de haplótipos únicos e exclusivos de localidades, sugere que *Partamona ailyae* coloniza uma área mediante um número reduzido de fêmeas fundadoras. Ferreira (2011), observando como ocorria a colonização de áreas por *P. helleri*, também verificou poucas linhagens mitocondriais por sítio de colonização. Resultados semelhantes têm sido observados em outros estudos realizados em nosso laboratório utilizando diferentes espécies do gênero. Em outros trabalhos com espécies de abelhas sociais, um ou poucos haplótipos também foram observados em cada sítio de colonização estudado (Francisco *et al.* 2013; Brito *et al.* 2013).

O número de linhagens maternas encontrado em uma área de ocorrência está associado à maneira como se dá a colonização em espécies diferentes (Lucena 2015). Em meliponíneos, por exemplo, as colônias se reproduzem por enxameagem e a colônia-filha mantém uma relação de dependência com a colônia-mãe por algum tempo (Michener 2007; Engels &

Imperatriz-Fonseca 1990; Nogueira-Neto 1954). Além disso, nestes indivíduos, a produção da prole é, comumente, realizada por apenas uma rainha (Pedro & Camargo 2003). Já no caso de abelhas solitárias, diferentemente de espécies eussociais, todas as fêmeas estão aptas a se reproduzir (Aguiar & Garófalo 2004, 2006). Por esta razão, o padrão de colonização observado em meliponíneos, por exemplo, não é observado em algumas espécies de abelhas solitárias. Em recente dissertação produzida no LGEH, Lucena (2015) verificou que *Centris tarsata* ocupa uma área via um número muito elevado de fêmeas fundadoras, muito superior às espécies sociais.

No gênero *Partamona*, a população dos ninhos pode variar entre 1.000 a 3.000 indivíduos adultos (Camargo & Pedro 2003) e, por esta razão, uma área a ser colonizada por estes indivíduos pode se tornar bastante saturada com poucas colônias em um sítio de colonização. Essa característica, associada à reduzida capacidade de dispersão destes indivíduos, principalmente em virtude do tamanho corpóreo e ao modo de reprodução por enxameagem, explica o baixo número de linhagens mitocondriais observadas pela presença de haplótipos únicos e exclusivos em determinados sítios de colonização. Já no caso das abelhas solitárias, um padrão distinto é observado, pois um ninho é constituído de cinco a seis indivíduos (Aguiar & Garófalo 2004, 2006), não sendo um número suficiente para saturar uma área, e isso possibilita a entrada continuada de muitas outras fêmeas no sítio de colonização.

### **5.3. Microssatélites**

Nesta análise, foram identificados e devidamente corrigidos alelos nulos no loco Phel-4. A ocorrência de alelos nulos em locos de microssatélites é bastante comum; entretanto, isso representa uma das limitações na aplicação destes marcadores, pois indivíduos heterozigóticos podem ser erroneamente identificados como homozigóticos, gerando desvios do equilíbrio de

Hardy-Weinberg devido ao excesso de homozigotos. Estes alelos são chamados de “nulos” ou “silenciosos”, pois não são amplificados na reação de PCR (Jarne & Lagoda 1996).

Os valores de heterozigosidade verificados nesta pesquisa ( $H_o = 0,399$  e  $H_e = 0,319$ ) foram maiores aos encontrados em outros estudos utilizando *primers* heterólogos para outras espécies de abelhas sem ferrão (Carvalho-Zilse & Kerr 2006; Tavares *et al.* 2007; Werneck 2008). De igual maneira, o percentual médio de polimorfismo (69%) e o número médio de alelos por loco (8,4) observado aqui também foram mais altos que os valores encontrados em estudos anteriores (Silva 2007; Lopes *et al.* 2010). Possivelmente esse resultado seja justificado pela correção dos alelos nulos realizada previamente nesta pesquisa. Miranda (2012), estudando a diversidade e estrutura genética de *Melipona mandacaia*, fez a correção prévia de alelos nulos e observou valores semelhantes aos que foram verificados para *P. ailyae*.

No presente estudo não foi observado déficit de heterozigotos ( $F_{IS} = -0,261$ ), sendo todos os *primers* utilizados polimórficos. A correção de alelos nulos foi realizada para tentar evitar a subestimação da diversidade genética, pois é comum encontrar estes alelos quando se utiliza *primers* heterólogos. Ferreira (2011) também observou valores negativos estatisticamente significativos para este índice em alguns locos polimórficos analisados para as amostras de *P. helleri*. Borges (2007) também verificou resultados semelhantes. Diferentemente, Francisco *et al.* (2006) analisaram o número de alelos e a heterozigosidade para locos microssatélites em *Partamona helleri*, *Partamona mulata* e *Plebeia remota*, e notaram um déficit de heterozigotos.

Estudos realizados nos quais o loco Mbi232 foi utilizado em outras espécies de meliponíneos revelaram uma variação semelhante à que foi observada neste trabalho, inclusive para *Melipona bicolor*, espécie para a qual os *primers* foram delineados (Peters *et al.* 1998, Tavares *et al.* 2007, Silva 2007). Tóth *et al.* (2002) estudaram a espécie de abelha

sem ferrão *Tetragona clavipes* e encontraram oito alelos para o loco em questão. Fernandes *et al.* (2012), em seu estudo utilizando *Partamona seridoensis*, identificou oito alelos nas populações de Almas e quatro alelos nas populações de Moreiras. Ferreira (2011) utilizando *P. helleri* identificou, inicialmente, nove alelos para o loco Mbi232 em géis de poliacrilamida 9% não desnaturante, porém, ao utilizar *primers* marcados com fluoróforo em corridas em sequenciador, verificou 15 alelos para este loco.

Semelhantemente, outros estudos utilizando a análise do loco Mbi254 em outras espécies revelaram uma variação semelhante à que foi verificada no presente estudo. Ferreira (2011) identificou cinco alelos para o microssatélite Mbi254 quando este foi genotipado em gel de poliacrilamida, porém a retipagem com o uso do sequenciador automático permitiu identificar oito alelos distintos. Também utilizando *P. helleri* como modelo de estudo, Borges (2007) empregou 10 pares de *primers* que foram delineados para *M. bicolor* e, dentre estes, verificou variação no loco Mbi254, identificando três alelos distintos. A variabilidade genética encontrada utilizando *P. ailyae* foi pouco menor que a encontrada no trabalho de Ferreira (2011), porém maior que a variabilidade encontrada no trabalho de Borges (2007). Esta última autora atribuiu a baixa variação encontrada ao uso de *primers* heterólogos e, em seu trabalho, enfatizou a importância em desenvolver *primers* homoespecíficos. Isto, de fato, permitirá a obtenção de resultados mais coerentes, conforme destacou a autora.

Embora no presente estudo tenham sido utilizados *primers* heterólogos prospectados para outras espécies, foi observada variação semelhante ou superior quando comparados a outros estudos. Ferreira (2011), por exemplo, em seu estudo utilizando *P. helleri*, analisou locos homoespecíficos para a espécie e encontrou apenas seis alelos no loco Phel-1, enquanto 25 formas alélicas do mesmo loco foram observadas para *P. ailyae*. Esses resultados possivelmente estão relacionados à amostragem, pois no presente estudo parte considerável da distribuição de *P. ailyae* foi amostrada, enquanto que no trabalho de Ferreira (2011) a coleta

do material biológico foi em dois *Campi* da Universidade de São Paulo e no *Campus* da Universidade Federal de São Carlos.

Os valores de  $\Phi_{ST}$  e AMOVA revelaram que as populações estudadas são heterogêneas para os locos microssatélites, e a existência de alelos privados corroborou para esta diferenciação. Entretanto, considerando o baixo valor do teste de atribuição (apenas 50% correta a identificação dos indivíduos em sua população de origem), a diferenciação interpopulacional não é alta, embora significativa. Desta forma, a moderada diferenciação demonstra que ocorre fluxo gênico entre as populações, não em nível suficiente para tornar as populações de *P. ailyae* homogêneas.

Fernandes *et al.* (2012) observaram que a AMOVA atribuiu 3,95% da variação encontrada para os locos microssatélites a diferenças entre as duas populações de *P. seridoensis* estudadas (Almas e Moreiras), encontrando baixos valores de  $\Phi_{ST}$  (0,039). Estes autores também concluíram que a diferenciação observada, embora significativa, não é alta, pois consideraram também o baixo valor do teste de atribuição (apenas 61% das amostras identificadas corretamente em suas populações de origem). Por outro lado, Ferreira (2011) verificou que a AMOVA atribuiu 11,9% a diferenças entre populações ( $\Phi_{ST} = 0,119$ ;  $P = 0,001$ ), indicando uma moderada diferenciação genética entre as três populações de *P. helleri* estudadas. Esta autora verificou que o teste de atribuição identificou corretamente a população de origem em 97% das operárias analisadas, corroborando a maior diferenciação apontada pelo  $\Phi_{ST}$ .

O teste de Mantel não indicou correlação significativa entre as distâncias genéticas e geográficas ( $r = 0,2090$ ;  $P = 0,0610$ ), revelando ausência de isolamento por distância entre as populações estudadas. Miranda *et al.* (sub.), analisando locos microssatélites, verificou alta correlação entre as distâncias genéticas e geográficas, mostrando isolamento por distância entre localidades amostradas para *P. rustica*.

O resultado revelado pelo programa STRUCTURE corrobora o “Assignment test”, o qual indica que apenas 50% das amostras foram corretamente identificadas à sua população de origem, ou seja, os indivíduos não podem ser univocamente incluídos em apenas um dos quatro grupos revelados pela análise. Embora este resultado seja contrastante frente aos grupos delimitados pela SAMOVA, vale salientar que esta última análise leva em consideração dados geográficos, e estes grupos podem ser facilmente visualizados na genealogia mostrada na Figura 7.

Quando os valores de  $\Phi_{ST}$  estimados para os genes mitocondriais concatenados estudados (COI e CytB) são comparados aos valores de  $\Phi_{ST}$  estimados para os locos microssatélites, é possível verificar que o grau de diferenciação observado para o DNA mitocondrial foi muito maior que para o DNA nuclear. Uma justificativa plausível para este resultado pode estar relacionada à dispersão sexo-assimétrica da espécie, em que as fêmeas, sendo filopátricas, são as responsáveis pela ocupação de áreas, e os machos, por sua vez, constituem o sexo dispersor. Ademais, a diferença entre estes valores já era esperada, levando em consideração os diferentes modos de herança do DNA mitocondrial (haplóide e uniparental) e do DNA nuclear (diplóide e biparental) (Palumbi *et al.* 2001).

Segundo os dados da literatura, os machos de algumas espécies de meliponíneos possuem um raio de voo limitado (Kerr *et al.* 1962, Carvalho-Zilse & Kerr 2004). Entretanto, sabendo que a reprodução das colônias de meliponíneos se dá por enxameagem, e levando em consideração a alta diferenciação genética encontrada para os genes mitocondriais e a moderada diferenciação para os locos microssatélites observada no presente estudo, é possível sugerir que os machos de *P. ailyae* apresentam boa capacidade de dispersão, caracterizando a condição de dispersão sexo-assimétrica.

### 5.3.1. *Genética Familiar*

Todas as operárias das colônias analisadas apresentaram um alelo comum herdado do macho parental, conforme esperado para a hipótese de monandria, pois as rainhas de Meliponini acasalam, via de regra, com apenas um macho (Kerr *et al.* 1962, Peters *et al.* 1999, Kerr 1969, Strassmann 2001). Segundo Hughes *et al.* (2008), esta forma de acasalamento é uma condição ancestral nos organismos haplodiplóides. Os resultados observados no presente estudo quanto à segregação alélica intranidal revela que, em *Partamona ailyae*, apenas um macho insemina a rainha, mostrando que a espécie é monândrica.

Embora a monandria seja mais comum em espécies de abelhas sem ferrão, a ocorrência de poliandria é relativamente comum. Entretanto, a ocorrência de múltiplos acasalamentos nem sempre significa poliandria. Utilizando *Scaptotrigona postica* em estudos sobre paternidade e grau de parentesco, Paxton *et al.* (1999) utilizaram marcadores microssatélites e verificaram que até seis machos inseminaram as rainhas de *S. postica*, porém, a paternidade efetiva estimada foi menor que 2, não caracterizando poliandria. Outros estudos também relataram inseminação de rainhas de espécies de Meliponini por mais de um macho (Carvalho 2001, Francini 2009), porém não foi estimada a paternidade efetiva nos ninhos analisados. Por outro lado, contradizendo o esperado para abelhas sem ferrão, Francini (2013) observou alto nível de poliandria para nove colônias de *Melipona seminigra abunensis*, com paternidade efetiva maior que 2.

Brito (2005), estudando colônias de duas espécies de *Partamona*, observou que apenas um macho fecundou as rainhas de *P. mulata* e *P. helleri*, indicando que estas espécies são monândricas; porém, foram observadas duas patrilineas em algumas colônias de *P. helleri*.

Um estudo mais aprofundado utilizando *P. helleri* foi realizado por Ferreira (2011) e esta autora observou resultados semelhantes ao encontrado no presente estudo, em que as

progênes analisadas podem ser atribuídas a uma rainha que é inseminada por apenas um macho, caracterizando a estrutura familiar como monogínica/monândrica.

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

Segundo Avise (2000), uma rede haplotípica em formato de estrela pode indicar sinais de expansão populacional. Neste sentido, conforme observado na Figura 14, não é possível sugerir a ocorrência de expansão populacional.

Quanto aos testes de neutralidade, valores não significativos estatisticamente foram obtidos.

Adicionalmente, a análise do *Coalescent Bayesian Skyline Plot* (BSP) revelou uma estabilidade no tamanho efetivo populacional durante todo o período analisado, com um pequeno indício de retração populacional nos últimos cinco mil anos antes do presente; entretanto, este indício de retração precisa ser analisado com cautela, pois é possível observar um aumento no intervalo de densidade *a posteriori*. Portanto, pode-se concluir que não foram observadas oscilações marcantes no tamanho efetivo das populações de *P. ailyae* no período considerado.

#### **5.5. História Natural**

##### ***5.5.1. Substratos utilizados para nidificação***

Em seu trabalho, Camargo & Pedro (2003) descrevem que *P. ailyae* nidifica em termiteiros em tocos de árvores secas ou podres, em termiteiros no interior da base de troncos de árvores vivas, em termiteiros epígeos e em termiteiros subterrâneos. De fato, no presente trabalho, os ninhos de *P. ailyae* foram observados com maior frequência nestes substratos, principalmente nos termiteiros epígeos do tipo “murundu”, sugerindo que a espécie nidifica preferencialmente nos substratos descritos por Camargo & Pedro (2003), porém, não

exclusivamente, pois *P. ailyae* utiliza outros substratos para construção de seus ninhos, revelando uma plasticidade maior que a predita para esta característica.

Camargo & Pedro (2003) descreveram que os ninhos de *P. ailyae* são ninhos solitários, ou seja, um ninho por substrato, porém, foi verificado não se tratar de um padrão, pois em Pontal do Araguaia foram encontrados dois ninhos no mesmo termiteiro. Embora muito próximas uma da outra, as análises dos microssatélites demonstraram que estas colônias se tratam de duas famílias distintas. Nas expedições realizadas com a finalidade de obter espécimes de *P. ailyae*, foram coletadas outras espécies do gênero para o desenvolvimento de outros trabalhos em nosso laboratório, e nestas coletas foram encontradas pequenas agregações de ninhos de espécies descritas como espécies que apresentam ninhos solitários, como *P. cupira*, *P. helleri* e *P. mulata*. Portanto, parece que não há um padrão quanto a esta característica.

### **5.5.2. Ornamentação de entrada dos ninhos**

Conforme observado no presente estudo, Siqueira *et al.* (2007) também verificaram que a ornamentação de entrada dos ninhos de *P. ailyae* se assemelha a um triângulo equilátero. Essas informações corroboram as descrições de Camargo & Pedro (2003). Segundo estes últimos autores, algumas espécies de *Partamona* são muito semelhantes no que diz respeito à morfologia e ao padrão de cores dos adultos, e só puderam ser classificadas como determinada espécie devido às informações obtidas sobre os hábitos de nidificação e ornamentação de entrada de seus ninhos, sendo características peculiares a cada espécie. Entretanto, embora auxiliem na identificação taxonômica, estas características não são determinantes para identificar a espécie, conforme visto na Figura 16.

### 5.5.3. *Inimigos naturais*

Alguns ninhos de *P. ailyae* foram envenenados e queimados porque os indivíduos da espécie foram confundidos com os indivíduos de *Trigona spinipes*. Embora *T. spinipes* realize um papel importante na polinização (Lorenzon *et al.* 1993), estudos mostram que esta espécie age, por vezes, como inseto-praga, prejudicando diferentes culturas (Silveira *et al.* 2010). Em muitos casos, a população desconhece a grande importância das espécies de *Partamona* como polinizadoras, tratando-as como inúteis.

Além da ação humana, algumas espécies de formigas também constituem ameaça para algumas espécies de *Partamona*. Miranda *et al.* (2015) observou um ninho de *P. rustica* sendo predado por uma formiga da espécie *Camponotus rufipes* Fabricius (1775). Estes autores observaram que *C. rufipes* se alimentou do mel e do pólen de *P. rustica*, como também predou as larvas das abelhas.

### 5.5.4. *Densidade dos ninhos e implicações para a conservação*

A possível baixa densidade dos ninhos de *P. ailyae* não é corroborada com o que tem sido verificado para outras espécies de *Partamona*, como *P. rustica*, *P. helleri* e *P. cupira*, por exemplo. Entre 20/07/2014 e 06/08/2014, foi realizada uma expedição de coleta na área de distribuição de *P. ailyae* e *P. cupira*. Neste período, nenhum ninho de *P. ailyae* foi encontrado, enquanto 102 ninhos de *P. cupira* foram localizados e coletados. A Figura 19 mostra alguns ninhos de *P. cupira* coletados em Delfinópolis-MG, ninhos estes muito próximos uns dos outros, um contraste muito evidente quando comparados ao que foi observado em *P. ailyae* (Figura 18).



**Figura 19.** Área amostrada para *P. cupira* em Delfinópolis-MG.

Estes achados para *P. ailyae* podem estar relacionados ao *status* de conservação da espécie, podendo haver um risco de extinção em algumas localidades. Siqueira *et al.* (2007) relataram que, apesar da grande distribuição geográfica, *P. ailyae* foi incluída na lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção no estado de Minas Gerais. Segundo estes autores, a dificuldade em encontrar ninhos da espécie se dá por pressões ambientais como o desmatamento para o avanço da agricultura e agropecuária e, como consequência, a diminuição de locais para nidificação.

Para estes indivíduos, um habitat ótimo é aquele que fornece os recursos necessários para a sua sobrevivência, como os locais para nidificação, por exemplo. A oferta e a competição por estes locais são fundamentais para determinar a presença de uma espécie em um local (Cane 2001) e qualquer fator que altere a abundância ou existência destes recursos pode interferir negativamente nas populações desses insetos (Rambaldi & Oliveira 2003, Antonini & Martins 2003).

O desconhecimento da população da elevada importância das abelhas como polinizadores extremamente eficientes em ecossistemas naturais requer urgentes esforços no sentido de criar estratégias para conservação destes insetos. O serviço ecológico prestado

pelas abelhas tem sido ameaçado em decorrência do grande declínio de suas populações (Biesmeijer *et al.* 2006; Bartolomeus *et al.* 2013). Esse declínio tem como principal causa a grande alteração e fragmentação do habitat, associadas a outras causas como o uso de agrotóxicos, competição por espécies invasoras e alterações climáticas (Thomson 2004; Whitehorn *et al.* 2012; Tylianakis 2013). Todas essas causas que reduzem as populações naturais das abelhas podem acarretar ainda a perda da diversidade genética, além de elevar os níveis de endogamia. Por serem haplodiplóides e apresentarem a determinação complementar do sexo (*CSD*), a diminuição da diversidade genética pode representar um risco para estes insetos (Zayed 2009).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Poucos são os trabalhos que abordam a variabilidade e estrutura genéticas das populações naturais de abelhas, bem como no que diz respeito à história natural destes insetos. Embora cada vez mais o interesse em utilizar o serviço ecológico prestado pelas abelhas esteja crescendo, o desconhecimento e falta de informações da biologia e da genética configura um empecilho para a conservação desses insetos. Diante disso, vale salientar, inicialmente, que os dados produzidos nesta pesquisa colaboram para reduzir as sérias lacunas em nosso conhecimento.

Além disso, o presente trabalho corroborou a hipótese inicial, onde os dados apontaram para uma dispersão sexo-assimétrica, em que as fêmeas são as responsáveis pela ocupação de áreas, pois possuem comportamento filopátrico, enquanto os machos constituem o sexo dispersor, sendo os responsáveis pela entrada de novos alelos na população. Ademais, verificamos que a segregação alélica para os oito locos microssatélites (heteroespecíficos) mostrou que as progênes de *P. ailyae* podem ser atribuídas ao acasalamento de uma rainha com um único macho, caracterizando uma estrutura familiar monogínica/monândrica.

Embora os resultados do presente estudo tenham contribuído para esclarecer certas questões, eles não podem ser considerados conclusivos. Ao contrário, espera-se que estes resultados sirvam de estímulo para o desenvolvimento de estudos continuados acerca da genética de populações, filogeografia e história natural de *Partamona ailyae* e outras espécies de Meliponini.

Para outros estudos envolvendo *P. ailyae*, primeiramente faz-se necessário aumentar a amostragem em toda a área de distribuição da espécie, como: i) as áreas em que foram obtidos espécimes de poucos ninhos, principalmente na região amazônica; ii) eliminar o “gap” amostral existente e; iii) amostrar localidades inseridas nos biomas Caatinga e Mata Atlântica. Além disso, para obtenção de resultados mais coerentes quanto às análises dos

microssatélites, faz-se necessário o desenvolvimento de análises utilizando *primers* homoespecíficos.

Realizadas estas etapas, estudos mais completos poderão ser desenvolvidos, principalmente no que diz respeito à filogeografia da espécie. O fato de *P. ailyae* ocorrer na Floresta Amazônica e na Mata Atlântica (foram obtidos recentemente representantes de nove ninhos da espécie em ambientes de Mata Atlântica, já identificados por especialista), possibilitará a investigação dos possíveis efeitos dos períodos glaciais do Pleistoceno sobre a conectividade e a diferenciação das populações que se distribuía entre as áreas destes dois biomas. Desta forma, será possível tentar associar a distribuição da variação genética entre as populações da espécie a eventos biogeográficos e paleoclimáticos ocorridos recentemente na história geológica do planeta.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso J (2012). Origem das linhagens mitocondriais nas abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) do Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 78 pp.
- Aguiar CML & Garófalo CA (2004). Nesting biology of *Centris (Hemisiella) tarsata* Smith (Hymenoptera, Apidae, Centridini). *Revista Brasileira de Zoologia*, **21**: 477-486.
- Aguiar CML & Garófalo CA (2006). Biologia de nidificação de *Centris* (Hymenoptera, Apidae, Centridini). *Anais do VII Encontro Sobre Abelhas*, Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Almeida-Muradian LB, Matsuda AH, Bastos DHM. (2007). Physiocochemical parameters of Amazon *Melipona* honey. *Quimica Nova* **30** (3): 707-708.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**: 403-410.
- Antonini Y, Martins RP (2003). The value of a Trees Species (*Caryocar brasiliense*) for a stingless bee *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*. *Journal of Insect Conservation* **7**: 167-174.
- Avice JC (2000). *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge (MA), 447pp.
- Avice JC (2004) *Molecular markers, natural history and evolution*. 2nd ed., Sunderland: Sinauer, 689 pp.
- Ayabe T, Hoshiba H, Ono M (2004). Cytological evidence for triploid males and females in the buble bee, *Bombus terrestris*. *Chromosome Research*, **12**: 215-223.
- Azevedo GG, Zucchi R. (2000). Relações etológicas entre *Partamona* Schwarz e *Parapartamona* Schwarz (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Anais do IV Encontro sobre abelhas*, Ribeirao Preto, SP: 258-264.

- Bartolomeus I, Ascher JS, Gibbs J, Danforth BN, Wagner D, Hedtke SM, Winfree R (2013). Historical changes in northeastern US bee pollinators related to shared ecological traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**: 4656-4660.
- 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.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**: 37-48.
- Beye M, Hasselmann M, Fondrk MK, Page RE, Omholt SW (2003). The gene CSD is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* **114**: 419-429.
- Biesmeijer JC, Roberts SPM, Reemer M, Ohlemüller R, Edwards M, Peeters T, Shaffers AP, Potts SG, Kleukers R, Thomas CD, Settele J, Kunin WE (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, **313**: 351-354.
- Brito RM, Francisco FO, Françoso E, Santiago LR, Arias MC (2013). Very low mitochondrial variability in a stingless bee endemic to cerrado. *Genetics and Molecular Biology*, **36**: 124-128.
- Brosi BJ, Armsworth PR, Daily GC (2008). Optimal design of agricultural landscapes for pollination services. *Conservation Letters* **1**: 27-36.
- Brosi BJ (2009). The complex responses of social stingless bees (Apidae: Meliponini) to tropical deforestation. *Forest Ecological Manage.* Doi: 10.1016/j.foreco.2009.02.025.

- Brusca, RC & Brusca, GJ (2007). Invertebrados. 2ª ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 968p.
- Camargo JMF, Pedro SRM (2003). Meliponini Neotropicais: o Gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera: Apidae, Apinae) – Bionomia e Biogeografia. *Revista Brasileira de Entomologia* **47**: 31-372.
- Camargo JMF, Pedro SRM (2012) Meliponini Lepeletier (1836). In Moure JS, Urban D, Melo GAR (Eds.). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region, online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed 07 april 2015.
- Campêlo MCS, Freire DAC, Abrantes MR, de Sousa ÊS & da Silva JBA (2016). Potencial antimicrobiano de própolis e cera de diferentes espécies de abelhas sem ferrão. *Acta Veterinaria Brasilica*, **9 (4)**: 397-400.
- Cane JH (2001). Habitat fragmentation and native bee: a premature verdict? *Conservation Ecology* **5 (1)**: 3.
- Carvalho GA (2001). The Number of Sex Alleles (CSD) in a Bee 3 Population and its Practical Importance (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Hymenoptera Research*, **10(1)**: 10-15.
- 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.
- Carvalho-Zilse CD, & Kerr WE (2006). Utilização de marcadores microssatélites para estudos populacionais em *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). *Magistra* 18: n 4, p213-220.
- Chapman RE, Wang J, Bourke AFG (2003). Genetic analysis of spatial foraging patterns and resource sharing in bumble bee pollinators. *Molecular Ecology* **12 (10)**: 2801-2808.

- Crozier RH & Crozier YC (1993). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, **33**: 97-117.
- Cruz DO, Jorge DMM, Pereira JOP, Torres DC, Soares CEA, Freitas BM, Grangeiro TB (2006). Intraspecific variation in the first internal transcribed spacer (ITS1) of the nuclear ribosomal DNA in *Melipona subnitida* (Hymenoptera, Apidae), an endemic stingless bee from northeastern Brazil. *Apidologie* **37**: 376-386.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, **9**: 772-772.
- Darvill B, Knight ME, Goulson D (2004). Use of genetic markers to quantify bumblebee foraging range and nest density. *Oikos* **107** (3): 471-478.
- Dick CW, Roubik DW, Gruber KF, Bermingham E (2004). Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. *Molecular Ecology* **13** (12): 3775-3785.
- Dowling TE, Moritz C, Palmer JD, Rieseberg LH (1996). Nucleic acids III: analysis of fragments and restriction sites. "In": *Molecular Systematics*. 2<sup>nd</sup> edition (eds. Hillis DM, Moritz C, Mable BK). 249-320, Sinauer Associates, Massachusetts.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005). Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **22**: 1185-1192.
- Drummond AJ, Rambaut A, Surch MA (2015). Beast v1.8.2. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/beast/>. Acessado em 30 de março de 2016.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, **11**: 2571-2581.

- Dutra RP, Nogueira AMC, Marques RRO, Costa CP, Ribeiro MNS (2008). Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **18** (4): 557-562.
- Earl DA (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, **4**(2): 359-361.
- Ellis JS, Knight ME, Darvill B, Goulson D (2006) Extremely low effective population sizes, genetic structuring and reduced genetic diversity in a threatened bumble species, *Bombus sylvarum* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology* **15**: 4375-4386.
- Engel MS, Grimaldi DA (2004). New light shed on the oldest insect. *Nature*, **427**: 627-629.
- Engels W, Imperatriz-Fonseca VL (1990). Caste development, reproductive strategies and control of fertility in honeybees and stingless bees, p. 165-230. *In: Social Insects: an Evolutionary Approach to Castes and Reproduction* (Engels W, ed.). Springer-Verlag, Berlin, 265pp.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611–2620.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010). Arlequin version 3.5.1.2: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**: 564-567.
- Fernandes, C. R. M., Martins, C. F., Ferreira, K. M., & Del Lama, M. A. (2012). Gene variation, population differentiation, and sociogenetic structure of nests of *Partamona seridoensis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Biochemical genetics*, **50** (5-6), 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, UFSCAR, São Carlos, SP, 98 pp.
- Francini IB (2009). Variabilidade Genética do loco *csd* em populações de cativo de *Melipona interrupta manaosensis* Schwarz, 1932 e *Melipona seminigra merrillae* Cockerell, 1919 (Apidae, Meliponini) na Amazônia. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas. 93pp.
- Francini IB (2013). Monandria e Poliandria como estratégia evolutiva no complexo de subespécies de *Melipona seminigra* Friese, 1903 (Apidae, Meliponini) na Amazônia. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas. 109pp.
- Francisco FO, Santiago LR, Arias MC (2013). Molecular genetic diversity in populations of the stingless bee *Plebeia remota*: A case study. *Genetics and Molecular Biology*, **36**: 118-123.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA, McInnes KH (2010). Introduction to Conservation Genetics. 2nd ed., Cambridge: Cambridge Univ. Press 617 pp.
- Frazão RF, Silveira OTL (2003). Levantamento preliminar das abelhas “sem ferrão” das ressacas de Macapá e Santana para um aproveitamento sustentável (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). In: Takiyama LR & Silva AQ. *Diagnóstico das ressacas do Estado do Amapá: Bacias do Igarapé da Fortaleza e Rio Curiaú*. Macapá-AP, CPAQ/IEPA e DGEO/SEMA: 233-239.
- Freitas BM, Imperatriz-Fonseca VL, Medina LM, Kleinert AMP, Galleto L, Nates-Parra G & Quezada-Euán JJG (2009). Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*, **40**: 332-346.

- Fu YX (1997). Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **145**: 915-925.
- Hall HG, Smith DR (1991). Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy Science USA* **88**: 4548-4552.
- 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.
- Harrison S, Hastings A (1996). Genetic and evolutionary consequences of metapopulation structure. *Tree*, **11**: 180-183.
- Hasselmann M, Gempe T, Schiott M, Nunes-Silva CG, Otte M, Beye M (2008). Evidence for the evolutionary nascent of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature* **454**: 519-523.
- Heimpel GE, Boer JG (2008). Sex determination in the Hymenoptera. *Annual Review of Entomology* **53**: 209-230.
- Heled J, Drummond AJ (2010). Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution*, **27**: 570-580.
- Hughes WHO, Oldroyd BP, Beekmann M, Ratnieks FLW (2008). Ancestral monogamy shows kin selection is key to evolution of eusociality. *Science*, **30**:1213-1216
- Imperatriz-Fonseca VL & Nunes-Silva P (2010). As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. *Biota Neotropica*, **10(4)** 59-62.
- Jarne P & Lagoda P (1996). Microsatellites: from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**: 424-429.
- Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST (2005). Isolation by distance web service v.3.23. *BMC Genetics* **6**: 13. <http://ibdws.sdsu.edu/>
- Kambhampati S, & Smith PT (1995). PCR primers for the amplification of four insect mitochondrial gene fragments. *Insect molecular biology*, **4(4)**, 233-236.

- 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 (1969). Some aspects of the evolution of the social bees. *Evolution Biology*, **3**: 119-175.
- Kerr WE (1996). *Biologia e manejo da Tiúba: a abelha do Maranhão*. São Luis: Ed. EDUFMA, 156 pp.
- Kerr WE, Carvalho GA, Coletto-Silva A, Assis MGP (2001). Aspectos pouco mencionados da Amazônia. *Parcerias Estratégicas* **12**: 20-41.
- Kevan PG, Phillips TP (2001). The economic impacts of pollinator declines: an approach to assessing the consequences. *Conservation Ecology* (5) **1**: 8. URL: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art8/>.
- Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences* **274**: 303-313.
- Knight ME, Martin AP, Bishop S, Osborne JL, Hale RJ, Sanderson RA, Goulson D (2005). An interspecific comparison of foraging range and nest density of four bumble bee (*Bombus*) species. *Molecular Ecology* **14** (6): 1811–1820.
- Knight ME, Osborne JL, Sanderson RA, Hale RJ, Martin AP, Goulson D (2009). Bumblebee nest density and the scale of available forage in arable landscapes. *Insect Conservation and Diversity* **2**: 116-124.
- Larsen TH, Williams NW & Kremen C (2005). Extinction order and altered community structure rapidly disrupt ecosystem functioning. *Ecology Letters*, **8**: 538-547.
- Librado P, Rozas J (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**: 1451-1452.

- Lonsdorf E, Kremen C, Ricketts T, Winfree R, Williams N, Greenleaf S (2009). Modelling pollination services across agricultural landscapes. *Annals of Botany* **103** (9): 1589-1600.
- Lorenzon MCA, Rodrigues AG, Souza JRGC (1993). Comportamento polinizador de *Trigona spinipes* (Hymenoptera: Apidae) na florada de cebola (*Allium cepa* L.) híbrida. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 28, n.2, p.217-221.
- Lucena DCL (2015). A colonização de áreas urbanas por abelhas solitárias – *Centris (Hemisiella) tarsata* Smith, 1874 (Hymenoptera: Apidae: Centridini) como estudo de caso. Dissertação de Mestrado, UFSCAR, São Carlos, SP, 87 pp.
- 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.
- Manrique AJ, Santana WC (2008). Flavonoides, actividades antibacteriana Y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* Y *Nannotrigona* sp. de Brasil e Venezuela. *Zootecnia Tropical* **26** (2): 157-166.
- Michener CD (2007). *The Bees of the World*, 2nd Ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 953 pp.
- Miranda, AF (2012). Estudos citogenéticos e moleculares do gênero *Partamona*: Filogenia e Cromossomo B (Dissertação de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa).
- Miranda EA, Carvalho AF, Andrade-Silva ACR, Silva CI, Del Lama MA (2015). Natural history and biogeography of *Partamona rustica*, an endemic bee in dry forests of Brazil. *Insectes Sociaux* **62**: 255-263.
- Miranda EA, Phylogeography of *Partamona rustica* (Hymenoptera, Apidae), an endemic stingless bee from the Neotropical dry forest diagonal

- 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.
- Nei M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583-590.
- Nei M (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia Univ. Press, 512 pp.
- 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.
- Nogueira-Neto P (1954). Notas bionômicas sobre Meliponíneos. III. Sobre a enxameagem. *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, **42**: 419-451.
- Oliveira RC (1998). Divergência genética por marcadores RAPD em *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, 50 pp.
- Palmer M, Bernhardt E, Chornesky E, Collins S, Dobson A, Duke C, Gold B, Jacobson R, Kingsland S, Kranz R, Mappin M, Martinez ML, Micheli F, Morse J, Pace M, Pascual M, Palumbi S, Reichman OJ, Simons A, Townsend A & Turner M (2004). Ecology for a crowded planet. *Science*, **304**: 1251-1252.
- Palsboll PJ, Berube M, Allendorf FW (2007). Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution*, **22**: 11-16.
- Palumbi SR, Cipriano F, Hare MP. 2001. Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data: the three-times rule. *Evolution*, **55**: 859-868.
- Parker PG, Snow AA, Shung MD, Booton GC, Furest PA (1998). What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, **79**: 361-182.
- Paxton R, Weibschuh N, Engels W, Hartfelder K, Quezada-Euan JG (1999). Not only single mating in stingless bees. *Naturwissenschaften*, **86**: 143-146.

- Peakall R, Smouse PE (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, **28**: 2537-2539.
- Pedro SEM, Camargo JMF. 2003. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Entomologia* **47**: 1-117.
- Pedro SRM (2014). The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* **61** (4): 348-354.
- Peters JM, Queller DC, Imperatriz-Fonseca VL, Strassmann JE (1998). Microsatellite loci for stingless bees. *Molecular Ecology*, **7**: 784-787.
- Peters JM, Queller DC, Imperatriz-Fonseca VL, Roubik DW (1999). Mate number, kin selection and social conflicts in stingless bees and honeybees. *Proceedings of Royal Society of London*, **266**: 379-384.
- Pinheiro JN & Freitas BM (2010). Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. *Oecologia Australis*, **14**(1): 266-281.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945–959.
- Rafael, J.A. (2012). Prefacio. In J.A. Rafael (Ed.), *Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia* (pp. xiii-xiv). Ribeirão Preto: Holos.
- Rambaldi DM, Oliveira DAS (orgs) (2003). *Fragmentação de Ecossistemas: Causas e Efeitos Sobre a Biodiversidade e Recomendações de Políticas Públicas*. Brasília: MMA/SBF. 510 p.
- Rambaut A & Drummond AJ (2009). Tracer v 1.5. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>. Acessado em 30 de março de 2016.

- Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, **19**: 2092-2100.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn S (2001). *Biologia Vegetal*. 6ª edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 906pp.
- Roubik DW (1989). *Ecology and natural history of tropical bees*. New Cork, Cambridge University Press.
- Sheppard WS, McPherson BA (1991). Ribosomal DNA diversity in Apidae, In “*Diversity in the genus Apis*”, Smith DR (ed.), Westview, Boulder (CO), pp. 89-102.
- Silva RB. 2007. *Variabilidade genética de Melipona quadrifasciata (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) no Estado de Minas Gerais – Brasil*. Dissertação de Mestrado, UFV, Viçosa. 53 pp.
- Silveira FA, Melo GAR, Almeida EAB (2002). *Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação*. Editora IDMA, 1ª edição. Belo Horizonte.
- Silveira TMT, Raseira MCB, Nava DE, Couto M (2010). Influência do dano da abelha irapuá em flores de mirtilheiro sobre a frutificação efetiva e as frutas produzidas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 303-307.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reactions primers. *Annals of the Entomological Society of America*, **87**: 651-701.
- Strassmann J (2001). The rarity of multiple mating by females in the social hymenoptera, *Insectes Sociaux*, **48(1)**: 1-13.
- Tavares MG, Dias LAS, Borges AA, Lopes DM, Busse AHP, Costa RG, Fernandes-Salomão, Campos LAO (2007). Genetic divergence between populations of the stingless bee urucu amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): Is there a new

*Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais?. *Genetics and Molecular Biology* **30** (3): 667-675.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (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.

Tóth E, Strassmann JE, Nogueira-Neto P, Imperatriz-Fonseca VL, Queller DC. 2002. Male production in stingless bees: variable outcomes of Queen Dwork conflict. *Molecular Ecology* **11**: 2661-2667.

Tylianakis JM (2013). The global plight of pollinators. *Science*. **339**: 1532-1533.

Trivers RL, Hare H (1976). Haplodiploidy and the evolution of the social insects. *Science*, **191**: 249-263.

Van Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM & Shipley P (2004). Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data, *Molecular Ecology Notes* **4**: 535-538.

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991). Chelex 100 as a médium for simple extraction of DNA of PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* **10** (4): 506-513.

Waples RS, Gaggiotti O (2006). What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology* **15**: 1419-1439.

Werneck MV (2008). Uso de marcadores microssatélites para a avaliação genética de populações de *Melipona mandacaia* Smith, 1863 (Hymenoptera, Apoidea) no Estado da Bahia. Tese de Mestrado – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 33 p. Whitehorn

PR, O'Connor S, Wackers FL, Goulson D (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, **336**: 351-352.

Wright S (1933). Inbreeding and homozygosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **19**: 411-420.

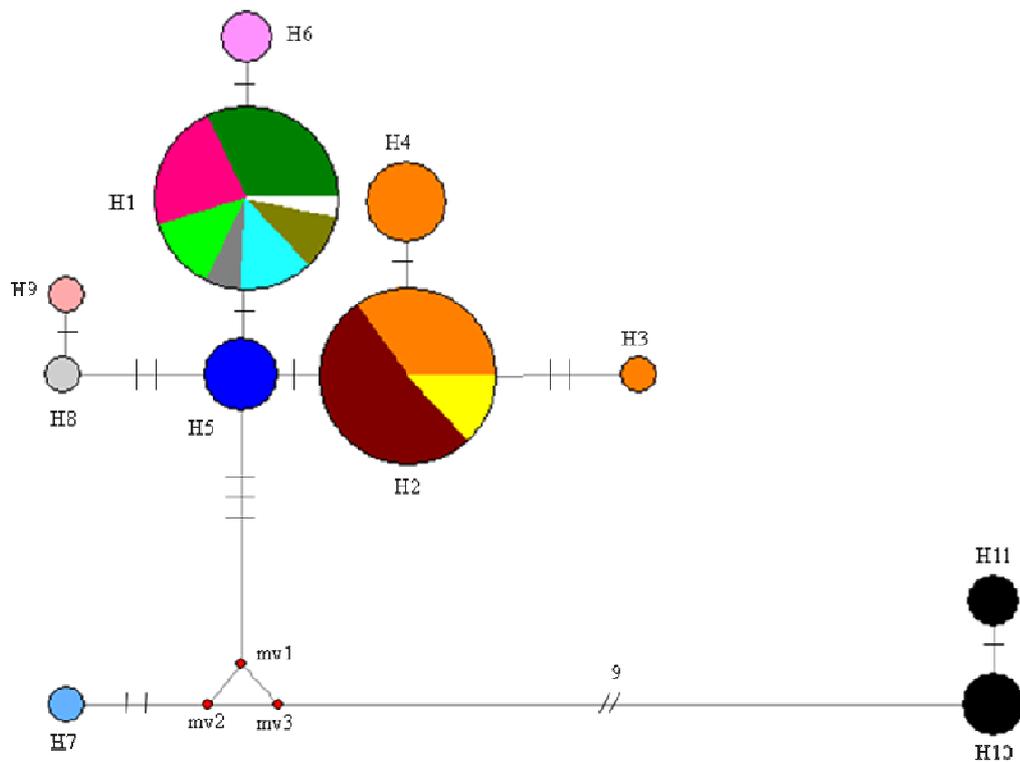
Yamauchi K, Yoshida T, Ogawa S, Itoh S, Ogawa Y, Jimbo S, Imai HT (2001). Spermatogenesis of diploid males in the formicine ant, *Lasius sakagami*. *Insectes Sociaux*, **48**: 28-32.

Zayed A & Packer L (2005). Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**: 10742-10746.

## Apêndice 1

Tabela 8. Distribuição dos haplótipos de COI de *P. ailyae* nos sítios amostrados, exceto Barreiras-BA.

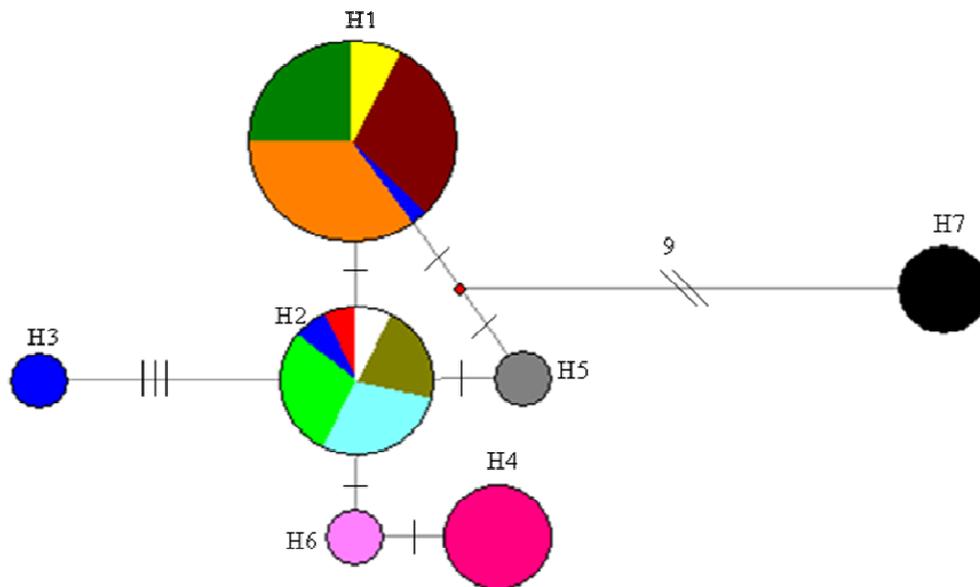
	Localidades amostradas	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	N
1	Icém-SP	7											7
2	Irapuã-SP	1											1
3	Caldas Novas-GO	10											10
4	Aragarças-GO	2											2
5	Crixás-GO					4							4
6	Goiânia-GO	3											3
7	Morrinhos-GO	4											4
8	Catalão-GO						2						2
9	Nova Xavantina-MT		8	1	5								14
10	Barra do Garças-MT		3										3
11	Pontal do Araguaia-MT		12										12
12	Araguari-MG	4											4
13	Belterra-PA							1					1
14	Carutapera-MA								1				1
15	Mirador-MA									1			1
16	Porto Velho-RO										3	2	5
	<b>Total</b>												<b>74</b>



**Figura 20.** Rede de haplótipos de COI verificadas em 74 amostras de 16 sítios. As cores identificam os sítios amostrais e estão de acordo com a Tabela 8.

**Tabela 9.** Distribuição dos haplótipos de CytB de *P. ailyae* nos sítios amostrados.

	Localidades amostradas	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	N
1	Icém-SP				7				7
2	Irapuã-SP		1						1
3	Barreiras-BA		1						1
4	Caldas Novas-GO	10							10
5	Aragarças-GO					2			2
6	Crixás-GO	1	1	2					4
7	Goiânia-GO		3						3
8	Morrinhos-GO		4						4
9	Catalão-GO						2		2
10	Nova Xavantina-MT	14							14
11	Barra do Garças-MT	3							3
12	Pontal do Araguaia-MT	12							12
13	Araguari-MG		4						4
14	Porto Velho-RO							5	5
	<b>Total</b>								<b>72</b>

**Figura 21.** Rede de haplótipos de CytB verificadas em 72 amostras de 14 sítios. As cores identificam os sítios amostrais e estão de acordo com a Tabela 9.

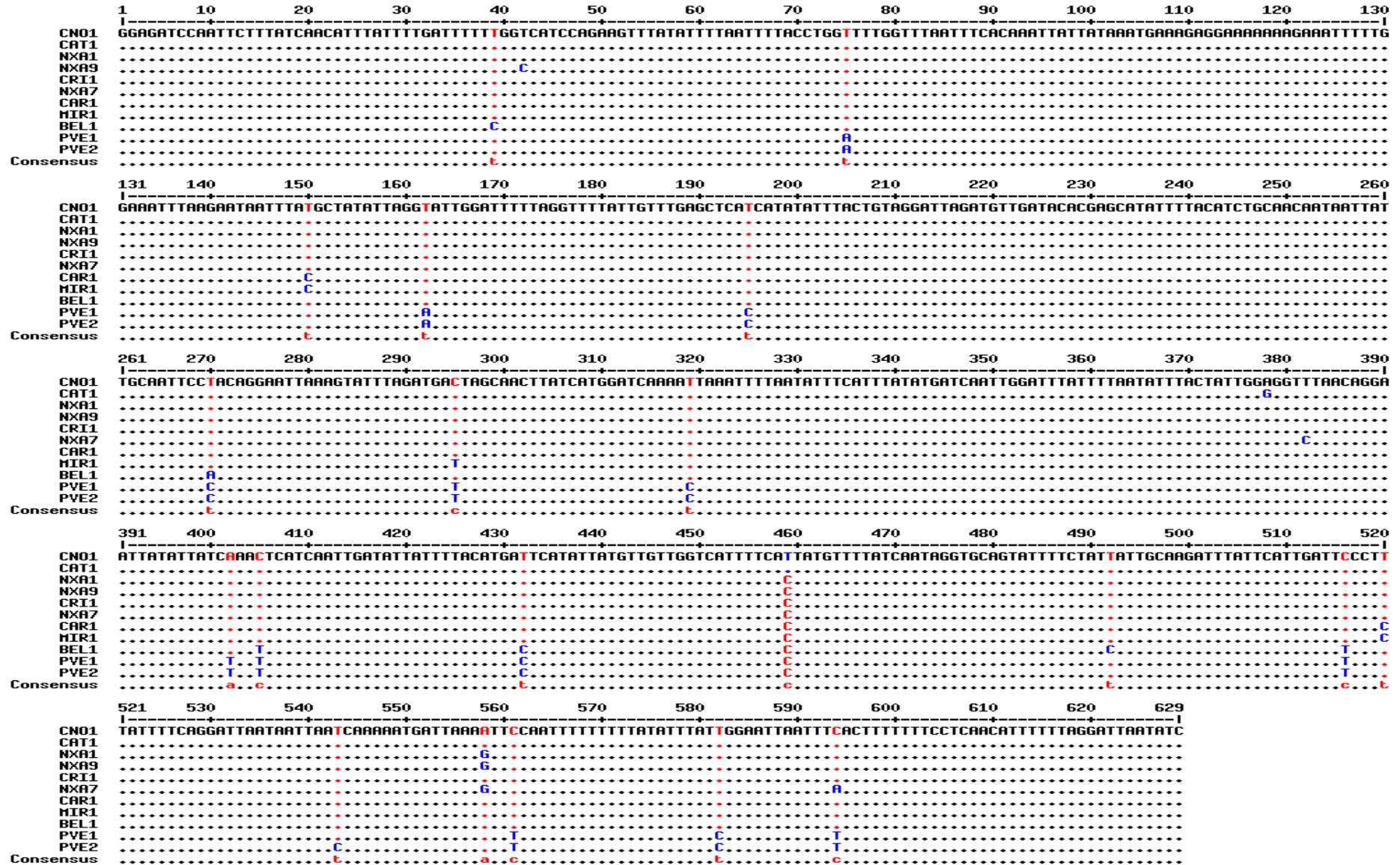


Figura 22. Haplótipos distintos de *P. ailyae* para o gene COI.

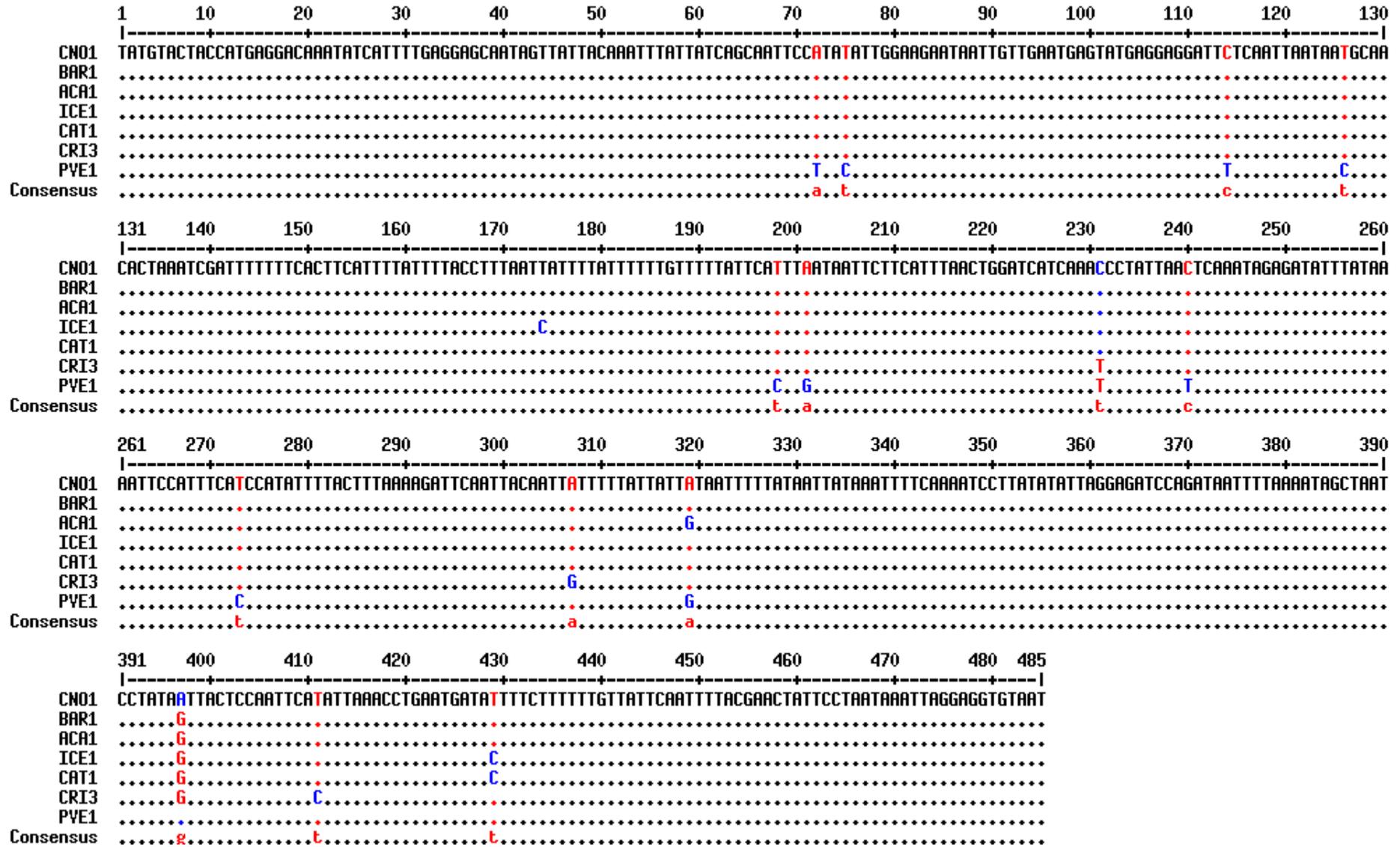


Figura 23. Haplótipos distintos de *P. ailyae* para o gene *CytB*.





```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CN01D07P6TECA TATAGATAGAAACCAATCTGACTTACGTCGATTTGAACTCAATCATGTAAGATTTAAAAGTCGARCAGACTTAATCATTAACTTCTGCATTAAATTTATCTTAATTCACATCGAGGTCGCAATC
CN02D08P6TECA .....
CN06D01P7TECA .....
NXA1D10P6TECA .....
CH 1D11P6TECA .....
ARA1D12P6TECA .....
ARA2D5P7TECA .....
Consensus .....

131     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CN01D07P6TECA ATTTTTTCTATATGACCTATAAAAAATATACGCTGTTATCCCTAAGGTAATTTATTCTAATATTTTAAATTAATAATCATTATTTTCTTTAATTTAAGTTACTATAAATTAATTTTAAAT
CN02D08P6TECA .....
CN06D01P7TECA .....
NXA1D10P6TECA .....
CH 1D11P6TECA .....
ARA1D12P6TECA .....
ARA2D5P7TECA .....
Consensus .....

261     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360     370     380     390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CN01D07P6TECA TTAATAATCTCCCACTAATATTTTATAAATTTATAATTTTATAAAATAAAATAATAAATATAAATTTCTATAGGGTCTTATCGTCCATAAATAAATTTTAAACATTTTATAAATTTAAT
CN02D08P6TECA .....
CN06D01P7TECA .....
NXA1D10P6TECA .....
CH 1D11P6TECA .....
ARA1D12P6TECA .....
ARA2D5P7TECA .....
Consensus .....

391     400     410     420     430     440     450     460     470     480     490     500     510     520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CN01D07P6TECA TTATATAAATAATATGAGACAGTATATATTTTCATTATCCTTTTCATTCCAGATTTCAATTAATAATCAATTGATTATGCTACCTTTGTACAGTCAGATATACTGCAGCCATTTAATATTTTCATTGGGCA
CN02D08P6TECA .....
CN06D01P7TECA .....
NXA1D10P6TECA .....
CH 1D11P6TECA .....
ARA1D12P6TECA .....
ARA2D5P7TECA .....
Consensus .....

521     530     540     550     560     569
|-----|-----|-----|-----|-----|
CN01D07P6TECA GATTGACTTAAATATTTCTCAATAAGACATGTTTTGATAAACAGGTG
CN02D08P6TECA .....
CN06D01P7TECA .....
NXA1D10P6TECA .....
CH 1D11P6TECA .....
ARA1D12P6TECA .....
ARA2D5P7TECA .....
Consensus .....

```

Figura 26. Sequências de *P. ailyae* para o gene ribossomal 16S.

Locos	Alelos	Localidades																
		IRA	MIR	CAR	BEL	ACA	CAT	GOI	BGA	CRI	MRR	ARA	PVE	ICE	CNO	PAR	NXA	
Mbi232	108	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	
	117	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	120	0,500	0,500	0,500	0,500	0,250	0,250	0,167	0,000	0,125	0,000	0,125	0,700	0,000	0,050	0,125	0,357	
	123	0,500	0,000	0,000	0,000	0,500	0,750	0,667	1,000	0,875	1,000	0,875	0,300	0,929	0,950	0,708	0,357	
	126	0,000	0,000	0,000	0,000	0,250	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,250	
	129	0,000	0,500	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,042	0,000	
	132	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036	
Mbi254	202	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	205	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,000	0,250	0,000	0,000	0,150	0,000	0,107	
	208	0,500	0,500	0,000	0,000	1,000	1,000	0,667	0,667	0,500	0,875	0,250	0,400	0,857	0,300	0,708	0,536	
	211	0,500	0,000	1,000	0,500	0,000	0,000	0,167	0,000	0,125	0,125	0,500	0,600	0,143	0,350	0,250	0,286	
	214	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000	
	217	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,150	0,000	0,036	
	220	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	223	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
226	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,333	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,042	0,036		
Phel-1	222	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	
	228	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	230	0,000	0,500	0,500	0,500	0,500	0,250	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,400	0,000	0,000	0,125	0,179	
	232	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167	0,107	
	234	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,071	
	236	0,000	0,500	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000	
	240	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036	
	242	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,333	0,625	0,250	0,000	0,000	0,286	0,000	0,208	0,107
	244	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000	0,125	0,125	0,125	0,300	0,000	0,250	0,000	0,143	

	<b>246</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,833	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,143
	<b>248</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,250	0,100	0,286	0,000	0,125	0,036
	<b>250</b>	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,125	0,375	0,000	0,000	0,350	0,208	0,036
	<b>252</b>	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,000	0,071	0,000	0,000	0,071
	<b>260</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167	0,333	0,000	0,000	0,125	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036
	<b>262</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,286	0,050	0,000	0,000
	<b>266</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,250	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036
	<b>268</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000
	<b>270</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,000
	<b>272</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000
	<b>274</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>278</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000
	<b>280</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,042	0,000
	<b>282</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>284</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,042	0,000
	<b>328</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Phel-2</b>	<b>263</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,250	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,036
	<b>265</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>267</b>	1,000	0,500	0,000	1,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,375	0,000	0,750	0,200	0,786	0,100	0,292	0,214
	<b>269</b>	0,000	0,500	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,143
	<b>271</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,250	0,500	1,000	0,833	0,500	0,875	0,125	0,000	0,214	0,300	0,458	0,571
	<b>273</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000	0,125	0,125	0,125	0,000	0,000	0,550	0,042	0,036
	<b>275</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,042	0,000
	<b>277</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>279</b>	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>281</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,300	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>293</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	
<b>Phel-3</b>	<b>93</b>	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,000	0,300	0,000	0,100	0,000	0,036

	<b>95</b>	1,000	1,000	1,000	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,875	1,000	0,500	1,000	0,900	1,000	0,964
	<b>97</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Phel-4</b>	<b>243</b>	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167	0,125	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,125	0,227
	<b>245</b>	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,136
	<b>247</b>	1,000	0,500	0,500	1,000	0,500	1,000	1,000	0,167	0,500	1,000	1,000	0,800	1,000	0,750	0,625	0,409
	<b>249</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000	0,667	0,375	0,000	0,000	0,000	0,000	0,250	0,250	0,227
<b>Phel-6</b>	<b>167</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,300	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>169</b>	0,000	0,500	0,500	0,500	0,500	0,750	1,000	0,833	0,875	0,875	1,000	0,700	1,000	0,950	0,917	0,643
	<b>171</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036
	<b>175</b>	1,000	0,500	0,500	0,500	0,500	0,250	0,000	0,167	0,125	0,125	0,000	0,000	0,000	0,050	0,083	0,321
<b>Phel-7</b>	<b>282</b>	1,000	1,000	1,000	1,000	0,750	1,000	1,000	0,833	0,750	1,000	1,000	0,900	1,000	1,000	0,958	0,929
	<b>284</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,250	0,000	0,000	0,000	0,250	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,071
	<b>286</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>288</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,042	0,000

**Quadro 1:** Frequências alélicas obtidas para oito locos microssatélites analisados em uma operária adulta de *P. ailyae* de cada um dos ninhos coletados em 16 localidades.