

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**KÁTIA MARIA FERREIRA**

**“A colonização de uma área por espécies de abelhas sem ferrão. Um Estudo de Caso: *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)”**

**São Carlos – SP  
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**“A colonização de uma área por espécies de abelhas sem ferrão. Um Estudo de Caso: *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)”**

**KÁTIA MARIA FERREIRA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológicas), Área de Concentração: Genética e Evolução.

**São Carlos – SP**  
**2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

F383ca

Ferreira, Kátia Maria.

A colonização de uma área por espécies de abelhas sem ferrão. Um estudo de caso : *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera : Apidae: Meliponini) / Kátia Maria Ferreira. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
99 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Genética de populações. 2. Microsatélite. 3. Variabilidade genética. 4. DNA mitocondrial. 5. Haplótipos. I. Título.

CDD: 575.15 (20ª)

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

**“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 de Kátia Maria Ferreira

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

Marco Antonio Del Lama

Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares

Ademilson E. E. Soares

Profa. Dra. Alexandra Sanches

Alexandra Sanches

Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi

Márcia Maria Gentile Bitondi

Prof. Dr. Lúcio Antonio de Oliveira Campos

Lúcio Antonio de Oliveira Campos

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Antônio e Maria pelo amor, carinho, educação, incentivo e apoio em todos os momentos;

Ao Matheus, meu presente de Deus, simplesmente por estar presente em minha vida e ser uma criança maravilhosa;

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Antônio Del Lama pela amizade, orientação, oportunidade, pelo exemplo de conduta profissional que possibilitaram a realização e conclusão deste trabalho;

À minha irmã Karem e a minha sobrinha Emanoeli, por tornarem do sábado, o dia da semana mais emocionante;

À Profa. Dra. Sílvia Nassif Del Lama, pela amizade e valiosas sugestões para a conclusão desse trabalho;

Aos meus amigos de laboratório Luana, Natália, Juliana, Antonio, pelo convívio, momentos de alegria e descontração;

Às minhas queridas amigas Angélica, Margarita, Patrícia, Thaís e Isabel por estarem ao meu lado;

À Profa. Dra. Maria Cristina Arias e ao Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares pelas amostras de *P. helleri* concedidas para análise;

À Profa. Dra. Anete Pereira de Souza (CBMEG - UNICAMP) e Dra. Fernanda Cidade pela colaboração para o delineamento dos microssatélites espécie-específicos;

À Profa. Dra. Norma Mortari, pela disponibilização do uso do seqüenciador do Laboratório de Imunogenética – DNA (DGEv – UFSCar);

Ao Marcelo e Vanessa pela ajuda com os microssatélites;

À Dra. Sílvia R. M. Pedro por compartilhar seu conhecimento para a identificação morfológica de alguns exemplares de *Partamona helleri*.

À Profa. Dra. Vera Lúcia Imperatriz-Fonseca, pelo entusiasmo em coordenar o nosso Projeto Temático FAPESP;

Aos membros da banca Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi, Prof. Dr. Lúcio Antonio de Oliveira Campos, Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares, Profa. Dra. Alexandra Sanches, pela leitura atenta, pelos comentários e sugestões.

À FAPESP pela bolsa (Processo 05/60893-2) e auxílio financeiro (Processo 04/15801-0) concedidos.

Enfim, a todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>1. APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA.....</b>	<b>1</b>
1.1. As abelhas sem ferrão: sua importância na polinização e a criação racional.....	5
1.2. A relevância deste estudo.....	11
1.3. A espécie escolhida, <i>Partamona helleri</i> .....	13
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
3.1. Material.....	21
3.2. Métodos.....	24
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
4.1. Biologia da nidificação.....	31
4.2. Genética Populacional.....	39
4.2.1. Análise do DNA mitocondrial.....	39
4.2.2. Análise Microssatélites.....	56
4.3. Genética Familiar.....	69
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>73</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>96</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Substratos utilizados em áreas urbanizadas para nidificação de algumas espécies de abelhas sem ferrão, como muros de tijolos (A e C), laje de casas (B) e pequenos orifícios encontrados em paredes (D).....3
- Figura 2.** Espécies de abelhas com ferrão e sem ferrão visitando flores encontradas em jardins. As fotos foram reproduzidas a partir de pesquisa na internet.....4
- Figura 3.** Vista lateral de uma fêmea adulta de *Partamona helleri* (A); em B, vista frontal da cabeça (Fotos de Sylvia Maria Matsuda, Laboratório de Abelhas – IB/USP).....14
- Figura 4.** Ninhos de *Partamona seridoensis* (A) e *P. helleri* (B) construídos em associação com termiteiro da espécie *Constrictotermes sp* ou sob pedras, respectivamente.....15
- Figura 5.** Mapa Político do Brasil destacando em cinza os estados da região nordeste, sudeste e sul do país nos quais a espécie *P. helleri* é encontrada.....17
- Figura 6.** Foto ilustrativa do Campus da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos). Os pontos em amarelo indicam a distribuição dos ninhos de *P. helleri* coletados entre as Áreas Norte e Sul do Campus, separadas pela reta em vermelha.....22
- Figura 7.** Ninhos de *P. helleri* coletados na UFSCar e construídos em diversos substratos, como aparelhos de ar condicionado (A) e sobre paredes e lajes de prédios (B, C e D). A seta vermelha em (A) indica um ninho de pombo.....31



- Figura 8.** Fragmentos amplificados para os genes mitocondriais *cyt b* (amostras 1 a 3) e *COI* (amostras 4 a 6) em *P. helleri* visualizados em gel de poliacrilamida 8% não desnaturante e corado com prata. As amostras 1 e 6 são fêmeas da espécie *Apis mellifera*, utilizadas como controle.....38
- Figura 9.** Alinhamento de cinco seqüências nucleotídicas correspondentes aos quatro haplótipos observados para o gene *cyt b* de *P. helleri*. Os números escritos na frente dos respectivos Campi (UFSCar, USP-SP e USP-RP) indicam os ninhos nos quais o haplótipo foi observado.....40
- Figura 10.** Rede de haplótipos construída a partir de 73 seqüências nucleotídicas obtidas para uma região do gene mitocondrial *cyt b* de *Partamona helleri*.....45
- Figura 11.** Alinhamento de seqüências nucleotídicas obtidas para *COI* de *P. helleri* relacionadas aos três haplótipos encontrados nos ninhos coletados na UFSCar, USP-RP e USP-SP. Os números escritos após o nome dos Campi se referem aos ninhos nos quais os haplótipos foram observados.....47
- Figura 12.** Rede haplotípica construída para uma região contendo 611 pb do gene mitocondrial *COI* de *Partamona helleri* a partir de 73 seqüências nucleotídicas obtidas.....51
- Figura 13.** Variação fenotípica detectada para os microssatélites Mbi278 e Mbi215 em operárias adultas de *Partamona helleri* provenientes de diferentes ninhos coletados na UFSCar, USP de São Paulo e Ribeirão Preto. O tamanho dos alelos em pares de bases foi descrito por Brito (2005).....58

**Figura 14.** Eletroferogramas dos locos Phel-2 (alelos 285 e 297) e Phel-3 (alelos 97 e 99) de fêmeas *P. helleri*, para ilustrar a visualização dos alelos submetidos à análise em MegaBACE™ 1000.....61

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Microssatélites específicos (Phel-1 a Phel-7) e heterológos (Tc3, T3, T4 e Mbi) testados em *Partamona helleri*, com respectivos “motivos” de repetições, temperaturas de anelamento (Ta), números de ciclos (Nc) e tamanhos dos fragmentos em pares de bases, segundo Brito (2005), Paxton *et al.* (1999a) e os dados encontrados neste trabalho para a espécie estudada (<sup>1</sup>); (-) indica que não houve amplificação.....30
- Tabela 2.** Composição e diversidade nucleotídicas estimadas para *cyt b* considerando as três populações de *P. helleri*.....41
- Tabela 3.** Substituições nucleotídicas encontradas para o fragmento de 485 pb do gene *cyt b* de *Partamona helleri* em relação aos ninhos coletados na UFSCar, USP-RP e USP-SP. Os asteriscos indicam as posições nas quais ocorreram alterações de aminoácidos.....43
- Tabela 4.** Alterações nucleotídicas observadas para uma região do gene *COI* de *Partamona helleri* considerando os ninhos amostrados nos Campi UFSCar, USP-RP e USP-SP.....48
- Tabela 5.** Composição e diversidade nucleotídicas para o fragmento analisado do gene *COI* de *P. helleri* considerando os Campi da UFSCar, USP-RP e USP-SP.....49
- Tabela 6.** Número de indivíduos analisados por localidade (N), número de alelos (Na) e alelos efetivos (Ne), heterozigosidades observadas (Ho), esperadas (He) e média (H), índice de fixação (F) e valores de  $\chi^2$  para equilíbrio de Hardy Weinberg (HWE) estimados para os ninhos de *P. helleri* coletados nos Campi da UFSCar, USP-RP e USP-SP. Em vermelho e com asteriscos se encontram os locos que não estão em HWE.....62

<b>Tabela 7.</b> Valores de t e significância (P) obtidos na comparação entre as heterozigosidades médias das três populações de <i>Partamona helleri</i> estudadas.....	63
<b>Tabela 8.</b> Valores obtidos para estatística-F e sua significância (P) considerando cada loco microssatélite estudado e o valor médio em amostras de <i>P. helleri</i> coletadas em três áreas.....	64
<b>Tabela 9.</b> Exemplo de segregação alélica de operárias provenientes de alguns ninhos de <i>P. helleri</i> coletados nos Campi da UFSCar, USP-RP e USP-SP considerando os locos Mbi232 e Mbi254.....	70

## RESUMO

As abelhas, por serem visitantes florais obrigatórios, são consideradas os principais agentes polinizadores das angiospermas. O crescente interesse pelos serviços das abelhas tem gerado esforços para o desenvolvimento de estratégias de manejo para fins conservacionistas. A utilização sustentável dos polinizadores requer o conhecimento da diversidade regional dos visitantes florais obtido mediante a identificação dos agentes efetivos responsáveis pela polinização das culturas. Além disso, conhecer a biologia reprodutiva e a estrutura populacional dessas espécies, bem como elucidar quais os fatores que tornam possível a colonização de certa área por uma espécie de abelha, são requisitos necessários para o delineamento de estratégias de manejo e conservação. Visando verificar a hipótese de que certa área pode ser colonizada por um número reduzido de linhagens maternas das fêmeas fundadoras de uma espécie de “abelha sem ferrão”, amostras de 73 ninhos de *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) localizados nos Campi da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar, n = 34), da Universidade de São Paulo em São Paulo (USP-SP, n = 14) e da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto (USP-RP, n = 25) foram analisadas para dois genes mitocondriais, *citocromo B (cyt b)* e *citocromo oxidase I (COI)*, com o fim de determinar o número de diferentes haplótipos. Um fragmento dos genes *citocromo b* e *citocromo oxidase I*, de 485 pb e 611 pb, respectivamente, foram seqüenciados para todos os ninhos amostrados. A análise das seqüências nucleotídicas permitiu identificar somente um haplótipo de *cyt b* para as amostras da UFSCar e um haplótipo, distinto do anterior por uma substituição de base, privativo das colônias do Campus da USP-SP; ao contrário, as

amostras da USP-RP apresentaram três haplótipos distintos, um dos quais compartilhado com as amostras da UFSCar. Dentre as substituições nucleotídicas identificadas, algumas resultaram em alterações de aminoácidos no produto do gene *cyt b*. Resultado similar foi observado para o gene *COI*. Os valores do  $F_{st}$  estimado para o DNA mitocondrial a partir dos genes *cyt b* e *COI* foram iguais a 31,8% e 36,1%, respectivamente. A taxa de substituição nucleotídica estimada foi maior para *cyt b* em comparação com *COI*; dessa forma, o primeiro gene parece ser menos conservado em relação ao outro nas abelhas sem ferrão. O maior número de haplótipos observados na USP-RP pode ser resultante da introdução no local de colônias trazidas de outras regiões do país. A fim de verificar a ocorrência de estruturação populacional para genes nucleares, estas amostras foram igualmente analisadas para vários locos microssatélites. Dentre 18 microssatélites heterólogos testados, somente quatro - Mbi215, Mbi278, Mbi232 e Mbi254 - apresentaram variação genética. A prospecção de locos microssatélites específicos para *Partamona helleri*, utilizando o método do enriquecimento para a construção de bibliotecas de DNA, permitiu caracterizar sete locos espécie-específicos. Amostras dos 73 ninhos (duas operárias por colônia) foram analisadas para estes onze locos microssatélites. As populações apresentaram significativa diferenciação interpopulacional ( $F_{st} = 0,129$ ;  $P = 0,000$ ). Os valores do  $F_{st}$  estimados para genes mitocondriais e para genes nucleares (microssatélites) foram comparados para estabelecer se há evidências de dispersão diferencial de machos e fêmeas na espécie. Não foram detectadas evidências de dispersão sexo-assimétrica (fêmeas colonizadoras, machos dispersores). Análises da segregação fenotípica nas progênies de vários ninhos revelaram a ocorrência

de monandria na espécie estudada e, portanto, uma estrutura sociogenética simples - monoginia/monandria. A presença de operárias “estranhas” aos ninhos analisados foi raramente observada.

**Palavras-chave:** *Partamona helleri*. DNA mitocondrial. Microsatélite. Variação genética. Estrutura populacional.

## ABSTRACT

Bees are obligatory floral visitors and are considered the main pollinators of angiosperms. The increasing interest in the services of bees has led to efforts to develop management strategies for conservation purposes. The sustainable use of pollinators requires knowledge on the regional diversity of floral visitors obtained from the identification of the agents responsible for the effective pollination of crops. Furthermore, understanding the reproductive biology and population structure of these species as well as the factors that enable the colonization of certain areas by a species of bee are necessary requirements to designing management and conservation strategies. To test the hypothesis that a certain area may be colonized by a small number of maternal lineages of female founders of a species of stingless bee, samples from 73 nests of *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) located on the Brazilian campuses of the *Universidade Federal de São Carlos* (UFSCar, n = 34), *Universidade de São Paulo* in São Paulo (USP-SP, n = 14) and *Universidade de São Paulo* in Ribeirão Preto (USP-RP, n = 25) were analyzed for two mitochondrial genes – cytochrome b (*cyt b*) and cytochrome oxidase I (*COI*) – in order to determine the number of different haplotypes. A fragment of the cytochrome b (485 bp) and cytochrome oxidase (611 bp) genes was sequenced for all nests sampled. The analysis of nucleotide sequences identified only one *cyt b* haplotype in samples from UFSCar and a second haplotype, distinct from the former by a base substitution, in samples from USP-SP, while samples from USP-RP exhibited three distinct haplotypes, one of which was shared by the samples from UFSCar. Among the nucleotide substitutions, some resulted in amino acid changes in the product of the *cyt b*



gene. A similar result was observed with the *COI* gene.  $F_{st}$  values estimated for the mitochondrial DNA from the *cyt b* and *COI* genes were 31.8% and 36.1%, respectively. The estimated rate of nucleotide substitution for *cyt b* was higher than that found for *COI*. Thus, the former gene was found to be less conserved than the latter in stingless bees. The larger number of haplotypes observed in the samples from USP-RP may be due to the introduction of colonies from other regions of the country. To determine the occurrence of population structure for nuclear genes, the samples were also examined for several microsatellite loci. Among the 18 heterologous microsatellites loci tested, only four – Mbi215, Mbi278, Mbi232 and Mbi254 – exhibited genetic variation. The prospection of species-specific microsatellite loci for *Partamona helleri* using the enrichment method for the construction of DNA libraries allowed characterizing seven new loci. Samples from 73 nests (two workers per colony) were analyzed for eleven microsatellite loci. The populations exhibited significant differentiation ( $F_{st} = 0.129$ ,  $P = 0.000$ ).  $F_{st}$  values estimated for mitochondrial genes and nuclear genes (microsatellites) were compared to establish whether there is evidence for differential male and female dispersal ability in this species. No evidence was found of sex-asymmetrical dispersal (colonizing females are colonizers; males are dispersers). Analysis of phenotypic segregation in the progenies of several nests revealed the occurrence of monandry in the species studied and, consequently, a simple sociogenetic structure – monogyny/monandry. The presence of 'foreign' workers was rarely observed in the nests analyzed.

**Key words:** *Partamona helleri*. Mitochondrial DNA. Microsatellite. Genetic variation. Population structure.

## 1. Apresentação do Problema

A polinização é uma interação mutualista entre plantas e animais - as plantas recebem o benefício da fertilização cruzada e os animais geralmente obtêm alimento (WASER *et al.*, 1996). Aproximadamente 90% das 250.000 espécies conhecidas de Angiospermas dependem da polinização por animais como aves, mamíferos e insetos. As abelhas constituem o grupo mais importante de polinizadores – em torno de 67% das espécies conhecidas de angiospermas depende da polinização por estes insetos para sua reprodução sexuada (MICHENER, 2000; RAVEN *et al.*, 2001). Esta relevância nasce do fato de que aproximadamente 16 mil espécies de abelhas, amplamente distribuídas pelos continentes, são visitantes florais obrigatórios, pois necessitam do pólen e néctar encontrados nas flores para provisão do ninho e nutrição da prole e dos adultos (ROUBIK, 1989).

Vários autores consideram as interações entre as plantas com flores e seus polinizadores o resultado de relações coevolutivas. De acordo com Biesmeijer *et al.* (2005), o tipo de ornamentação e a forma da entrada dos ninhos das “abelhas sem ferrão” possuem alguns padrões igualmente observados nas flores, como centros escuros, faixas radiais e pontos periféricos. No entanto, Kallimanis *et al.* (2009) estabelecem ressalvas para o uso de explicações coevolutivas para as interações planta - polinizador, pois estes autores consideram que algumas características da relação podem ter sido produzidas estocasticamente.

Para as abelhas, o habitat é uma matriz onde os fatores que favorecem a presença de uma espécie em determinado sítio, tais como alimento e locais de nidificação, estão distribuídos em mosaico e de forma espacialmente

heterogênea, obrigando-as a efetuarem vôos por longas distâncias para forragearem (ROUBIK, 1989). A oferta desses recursos e a competição por eles são importantes aspectos para determinar a presença de uma espécie em um local (CANE, 2001). As espécies têm necessidades diferentes e cada uma delas tem uma forma própria de responder aos distúrbios do ambiente.

Devido ao processo de urbanização, motivado pelo crescimento da população humana, algumas espécies de abelhas têm utilizado os ambientes urbanos, buscando ali locais alternativos para nidificação e obtenção de alimento (Figura 1). Como as áreas naturais legalmente protegidas constituem uma pequena parte da superfície terrestre, o ambiente urbano pode proporcionar importante oportunidade de conservação, apesar dos recursos alimentares estarem ali mais dispersos, fazendo com que as populações presentes em áreas urbanizadas sejam menos similares entre si quando comparadas com as de ambientes rurais, os quais podem apresentar ainda maior abundância e riqueza de espécies (CANE & TEPEDINO, 2001; ZANETTE *et al.*, 2004, WINFREE *et al.*, 2007).

As abelhas são insetos com boa capacidade de dispersão e forrageadores centrais, ou seja, retornam ao local ocupado anteriormente depois da atividade de forrageio (ROUBIK, 1989). As áreas urbanas podem ser consideradas uma opção principalmente para abelhas generalistas, pois estas possuem maior chance de sobrevivência, ao contrário das abelhas especialistas que apresentam limitações quanto à dispersão para forragear e encontrar locais ricos em recursos tróficos, sendo, portanto, mais sensíveis às perturbações do ambiente (ZANETTE *et al.*, 2004; NATES-PARRA, 2005).

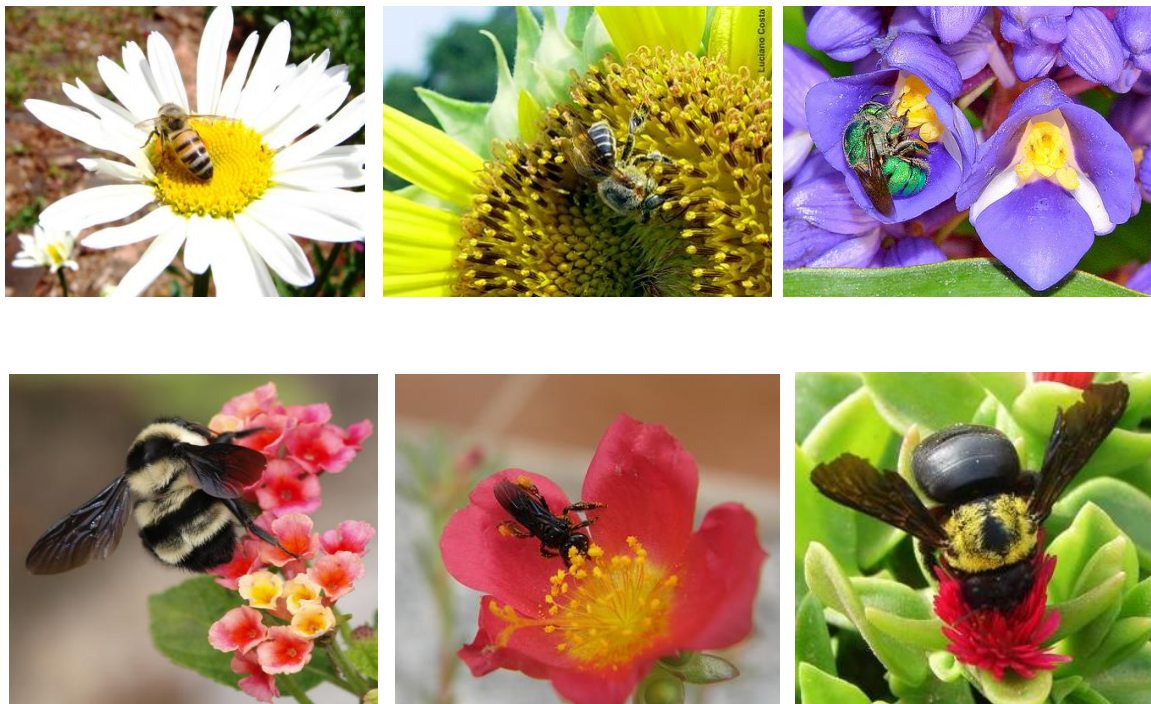


**Figura 1.** Substratos utilizados em áreas urbanizadas para nidificação de algumas espécies de abelhas sem ferrão, como muros de tijolos (A e C), laje de casas (B) e pequenos orifícios encontrados em paredes (D). Imagens sem escala.

Apesar do efeito negativo atribuído ao processo de urbanização, vários estudos sobre ecologia urbana consideram a importância dos ambientes urbanos como corredores e/ou “albergues” de muitas espécies de insetos (NIEMELÄ, 2000; NIEMELÄ *et al.*, 2000; ZANETTE *et al.*, 2005; SUKOPP, 2002). A construção de parques e jardins, bem como a preservação de áreas verdes naturais independentemente do tamanho que apresentam, pode ser uma alternativa para a manutenção e o aumento da biodiversidade em ambientes urbanos (MATTESON *et al.*, 2008; FETIDGE *et al.*, 2008; AHRNÉ *et al.*, 2009).

Os jardins e parques urbanos são considerados importantes ferramentas no manejo e conservação de várias espécies de abelhas (Figura 2). Contudo,

algumas condições precisam ser satisfeitas para que isso ocorra, entre elas: i) a escolha da planta a ser utilizada, pois quanto maior a diversidade floral, maior será a abundância de abelhas visitantes; ii) a distribuição das plantas no local deve evitar ao máximo a competição por alimento dentre e entre os diversos grupos de abelhas, nativas e introduzidas; iii) a seleção de plantas que tenham diferentes períodos de floração para reduzir a tendência de sazonalidade, propiciando alimento durante todo o ano; iv) introduzir ninhos artificiais como locais alternativos de nidificação para abelhas e vespas solitárias (WOJCIK *et al.*, 2008; GASTON *et al.*, 2005; McFREDERICK & LEBUHN, 2005).



**Figura 2.** Espécies de abelhas com ferrão e sem ferrão visitando flores encontradas em jardins. As fotos foram reproduzidas a partir de pesquisa na internet.

Estudos têm indicado que o processo de urbanização altera o comportamento, morfologia, dinâmica populacional e estrutura social dos animais

que vivem ou passam a habitar os locais urbanos (SHOCHAT *et al.*, 2006). Para Cane *et al.* (2005), as abelhas apresentam respostas heterogêneas à fragmentação do habitat.

Faeth *et al.* (2005) analisaram a área metropolitana de Phoenix (Arizona, Estados Unidos) e verificaram mudanças nas relações presa – predador, causada pela falta de predadores naturais das aves existentes nesta área, tornando-as a principal força controladora de artrópodes no local estudado. Com a redução de seus inimigos naturais e o aumento populacional, as aves urbanas alteraram seu comportamento forrageador, afetando a sobrevivência dos artrópodes presentes na região.

Segundo McIntyre (2000), são poucos os trabalhos que evidenciam a utilização dos recursos encontrados nas cidades e no seu entorno pelos artrópodes, dificultando o desenvolvimento de estratégias que visam sua conservação e o entendimento de quais são os fatores que definem a sobrevivência destas espécies nessas áreas, bem como seus padrões de abundância e distribuição.

### **1.1. As abelhas sem ferrão: sua importância na polinização e a criação racional**

Nas últimas décadas tem sido descrita uma diminuição das populações de polinizadores em consequência da ruptura dos sistemas de polinização associada a atividades humanas (KEARNS *et al.*, 1998; BROSI, 2009), embora haja controvérsias a este respeito (CANE, 2001; ROUBIK, 2001). O declínio de polinizadores tem causado uma redução na produtividade agrícola, incentivando a colaboração entre economistas e especialistas em polinização para quantificar o

valor dos serviços de polinização e avaliar os custos da diminuição de polinizadores (KEVAN & PHILLIPS, 2001; BROSI *et al.*, 2008; LONSDORF *et al.*, 2009).

Entre as abelhas indígenas ou nativas encontram-se as pertencentes à tribo Meliponini, visitantes florais generalistas que podem responder por 40 a 90% da polinização de árvores nativas dependendo do ecossistema (KERR *et al.*, 1996). Como referido por Silberbauer-Gottsberger; Gottsberger (1988), este grupo de abelhas poliniza entre 60 a 75% das espécies vegetais do cerrado. Na Amazônia, a propagação de cerca de 38% da vegetação nativa depende da polinização por abelhas nativas (KERR *et al.*, 2001).

As fêmeas dos meliponídeos possuem ferrão e estruturas associadas reduzidas, razão pela qual são denominadas “abelhas sem ferrão”. De tamanho variável, são abelhas com corpo de tamanho pequeno a médio (2 mm a 1.5 cm). Estas abelhas possuem distribuição Pantropical, apresentam comportamento eusocial, embora algumas espécies sejam cleptobióticas e utilizam diferentes substratos para nidificação, principalmente cavidades pré-existentes (MICHENER, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2002). Segundo alguns pesquisadores, mais da metade dos ninhos dos meliponídeos não é conhecida e muitas espécies ainda requerem melhor estudo e descrição (ROUBIK, 2006; ALBUQUERQUE & CAMARGO, 2007).

As abelhas sem ferrão constituem grupo importante de polinizadores da flora nativa, como as mirtáceas brasileiras e diversas plantas frutíferas economicamente exploradas como acerola, tamarindo, goiaba, jabuticaba, macadamia, pitanga e o camu-camu (CASTRO 2002; ALVES & FREITAS, 2006; MAUÉS & COUTURIER, 2002; GRESSLER *et al.*, 2006).

Recentemente, a utilização de diversas espécies de abelhas como polinizadores em sistemas agrícolas tem se tornado igualmente uma tendência mundial (DANFORTH, 2007; KREMEN *et al.*, 2007; KLEIN *et al.*, 2007; JULIER & ROULSTON, 2009). Alguns estudos realizados em diferentes países relatam o emprego das abelhas nativas ou sem ferrão como agentes polinizadores de sistemas agrícolas economicamente importantes como café, cupuaçu, morango, tomate, girassol, entre outros (CASTRO, 2002; SLAA *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2007; VEDDELER *et al.*, 2008; MACHADO & CARVALHO, 2006).

Kasina *et al.* (2009) observaram que a polinização realizada por abelhas aumentava o rendimento e a qualidade da produção para muitas plantas cultivadas. Cerca de 40% do valor anual da colheita corresponderam aos lucros líquidos obtidos pela utilização de abelhas, principalmente as nativas ou indígenas.

Além das abelhas sem ferrão constituírem importantes agentes de polinização de espécies de plantas naturais e cultivadas, sua criação racional tem crescido consideravelmente, constituindo inclusive importante fonte de renda de populações do norte/nordeste.

Frazão e Silveira (2003), analisando áreas de ressaca no Estado do Amapá, verificaram que seis espécies de abelhas sem ferrão podem ser utilizadas na meliponicultura pelas comunidades locais para produção de mel, cera e outros produtos, assim como em atividades de polinização de plantas cultivadas em diversos sistemas agroflorestais.

Dentre estes produtos, alguns estudos têm caracterizado física e quimicamente o mel e a própolis destas abelhas e relatam sua importância para a medicina, uma vez que apresentam propriedades antitumorais, anticarcinogênicas



e potencial antimutagênico, além de ação bactericida e de funcionar como agente imunomodulador (SFORCIN, 2007, ODDO *et al.*, 2008; ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2007; DUTRA *et al.*, 2008; MANRIQUE & SANTANA, 2008). Além disso, a própolis produzida por algumas abelhas sem ferrão, entre elas *Partamona* spp. e *Melipona* spp., apresentou maior atividade antibacteriana do que a própolis de *Apis mellifera* (BANKOVA & POPOVA, 2007).

No Nordeste do Brasil, alguns produtores, incluindo uma tribo dos índios Pankararé, utilizam a meliponicultura como importante atividade alternativa de renda (MODERCIN *et al.*, 2007). Dentre as abelhas criadas estão: canudo (*Scaptotrigona* sp.), tubiba (*Trigona* sp.), jataí (*Tetragonisca* sp.), rajada ou cabeça branca (*Melipona* sp.), moça branca ou amarela (*Frieseomellita* sp.), breu ou zamboque (*Melipona* sp.), mandurí (*Melipona* sp.), cupira (*Partamona* sp.), mosquito (*Plebeia* sp.) e jandaíra (*Melipona subnitida*).

No entanto, frequentemente, a criação destas abelhas ocorre de forma indiscriminada e sem qualquer tipo de manejo (FREITAS *et al.*, 2000). Além disso, muitas espécies de abelhas sem ferrão estão seriamente ameaçadas de extinção em consequência das alterações pelas quais os seus ambientes estão sofrendo, causados principalmente pelo desmatamento, uso indiscriminado de agrotóxicos e pela ação predatória de melieiros (KERR, 1996). No Brasil, embora não haja registro de espécies extintas, algumas abelhas sem ferrão que dependem das árvores para construção de ninhos desapareceram em áreas onde a vegetação foi substituída por pastagens e culturas agrícolas ou passou por processo de urbanização.

A criação descuidada e o desmatamento de áreas verdes naturais têm colocado várias espécies em perigo de extinção. Hoje, cerca de 100 meliponídeos

encontram-se nesta situação (KERR, 2002; FREITAS *et al.*, 2000; RESENDE *et al.*, 2008; PEREIRA, 2006; SAMEJIMA *et al.*, 2004; BROSI, 2009). Marinho *et al.* (2005), Lopes *et al.* (2005) e Nogueira-Ferreira e Augusto (2007) sugerem a ampliação de pesquisas voltadas para a preservação das mesmas delineando estratégias de exploração racional dos recursos naturais, visto que são de grande importância por razões ecológicas e econômicas.

O crescente interesse mundial na utilização dos serviços de polinização de espécies de abelhas em sistemas naturais e agrícolas esbarra em limitações para que esta iniciativa possa ser incrementada, especialmente nos países tropicais. Entre os desafios a serem vencidos podemos citar, primeiramente, a identificação dos polinizadores efetivos das culturas de interesse e, na sequência, o conhecimento da diversidade regional dos visitantes florais. Além deste conhecimento taxonômico, é essencial conhecer em detalhes a biologia reprodutiva e a estrutura populacional das espécies de abelhas para a avaliação da viabilidade do uso destas espécies como polinizadores e para o desenvolvimento de estratégias de manejo, visando a conservação e utilização sustentável de polinizadores silvestres.

Apesar de sua relevância para o sucesso destes programas, os estudos sobre biologia reprodutiva de abelhas são ainda insuficientes, pois dispomos de informações para poucas espécies da fauna brasileira. Esta fauna de abelhas é altamente diversificada (3.000 a 5.000 espécies) e o conhecimento de sua taxonomia e da riqueza regional dos táxons é ainda muito limitado.

Dados a respeito da biologia reprodutiva das abelhas para uso em polinização de culturas no Brasil precisam ser rapidamente gerados como requisito para a seleção de espécies e avaliação da viabilidade de manejo destas

populações. Aspectos da biologia reprodutiva, tais como a capacidade reprodutiva das fêmeas e os fatores genéticos e ecológicos que viabilizam o sucesso de colonização de uma área por uma espécie de abelha, são ainda pouco conhecidos, tanto em habitats naturais quanto em agroecossistemas e/ou ambientes urbanos.

Nos últimos anos, a utilização de metodologias moleculares em estudos sobre abelhas tem permitido a investigação de questões relacionadas à evolução e diversificação dos grupos, biologia reprodutiva e aspectos ecológicos, especialmente aqueles relacionados ao forrageamento (CHAPMAN *et al.*, 2003; DARVILL *et al.*, 2004; KNIGHT *et al.*, 2005). Relações filogenéticas em alguns grupos de abelhas sociais têm sido estabelecidas por meio de ferramentas moleculares (COSTA *et al.*, 2003; CAMERON & MARDULYN, 2003; CAMERON & WILLIAMS, 2003; MICHEL-SALZAT *et al.*, 2004; RASMUSSEN & CAMERON, 2010), assim como a história biogeográfica destas espécies (DICK *et al.*, 2004; BATALHA-FILHO *et al.*, 2010).

Estudos sobre a diversidade genética, fluxo gênico e estrutura genética de populações de abelhas têm sido realizados em espécies eusociais, como *Apis mellifera* (DEL LAMA *et al.*, 1988; DEL LAMA *et al.*, 1990; SHEPPARD *et al.*, 1991; VIARD *et al.*, 1998; MEIXNER *et al.*, 2000; DINIZ *et al.*, 2003), *Bombus* (WIDMER & SCHMID-HEMPEL, 1999; CHAPMAN *et al.*, 2003; DARVILL *et al.*, 2004), e em meliponídeos dos gêneros *Plebeia* (FRANCISCO *et al.*, 2001; FRANCISCO, 2002), *Tetragonisca* (OLIVEIRA *et al.*, 2004), *Melipona* (WALDSCHMIDT *et al.*, 2000; WEINLICH *et al.*, 2004), *Trigona* (CAMERON *et al.*, 2004; FRANCK *et al.*, 2004) e *Partamona* (BRITO & ARIAS, 2008, 2010).

Além disso, aspectos da reprodução como o sistema de acasalamento e o parentesco entre fêmeas de espécies com hábitos distintos de nidificação, vêm sendo investigados com os marcadores moleculares (DANFORTH *et al.*, 1996; PAXTON *et al.*, 2000; ZIMMERMANN *et al.*, 2009). Estes têm permitido ainda a investigação de questões como o efeito da fragmentação de habitats sobre as populações de insetos (KRAUSS *et al.*, 2004; BROUAT *et al.*, 2004) e abelhas (SILVA, 2002; SOFIA *et al.*, 2005).

## **1.2. A relevância deste estudo**

Considerando a importância das abelhas para a polinização e diante do cenário ambiental tão adverso para a manutenção, preservação e conservação destas espécies, estudos relativos à biologia reprodutiva e aos mecanismos que permitem a colonização de uma área pelas abelhas são essenciais para o delineamento de estratégias que contribuam para a manutenção dos polinizadores. Segundo Slaa *et al.* (2006), o conhecimento sobre a reprodução das abelhas sem ferrão permitirá que estas sejam utilizadas em projetos de polinização assistida.

Das considerações acima decorre que a manutenção e preservação de espécies de abelhas potencialmente úteis na polinização exigem que se conheça como uma espécie coloniza certa área. Estudos desta natureza requerem o acompanhamento de ninhos de uma espécie existentes em área limitada e de fácil observação. Neste sentido, abelhas que nidificam em ambientes urbanos e seus entornos são mais fáceis de serem monitoradas que abelhas que vivem em matas ou florestas densas. Estas condições são satisfeitas pelos ninhos de *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) encontrados no interior do

Campus da UFSCar. Desde 1985, os ninhos ali existentes foram assistematicamente monitorados (Del Lama MA, informação pessoal). As observações realizadas indicavam que a área era colonizada por um número reduzido de fêmeas (colônias fundadoras) e que o crescimento da população local se dava essencialmente pela reprodução das colônias existentes (enxameação) e não pela entrada de novos enxames. Esta observação vai ao encontro do fato bem estabelecido de que a colônia-filha é produzida a partir de indivíduos e material da colônia-mãe, o que impõe óbvios limites à dispersão das fêmeas fundadoras, tornando a população viscosa. Com o passar dos anos, o número de novas colônias foi gradativamente aumentando, verificando-se hoje ali ninhos espalhados por toda a área referida ( $n > 60$ ).

Estas observações levaram à proposição da seguinte “hipótese de trabalho”: *a área foi colonizada por um número reduzido de linhagens maternas, isto é, por poucas fêmeas fundadoras. Neste caso, necessariamente, o necessário fluxo gênico para promover a entrada de variação nova na população deve ser função dos machos (dispersores), promovendo acasalamentos mais casuais. Com a diminuição das chances de ocorrência de endogamia e, por conseqüência, menor chance de ocorrer a homozigose dos alelos do loco sexual, as condições que levam à produção de machos diplóides não serão satisfeitas (BEYE et al., 2003; HASSELMANN et al., 2008).*

Formulada a hipótese de trabalho, naturalmente se seguiu o propósito de testá-la utilizando os ninhos desta espécie como estudo de caso, ensejando a realização deste trabalho. Para dar maior robustez ao teste de hipótese, amostras de ninhos de *Partamona helleri* localizados no campus da USP de Ribeirão Preto

(USP-RP) e no campus da USP de São Paulo (USP-SP) foram igualmente submetidas à análise.

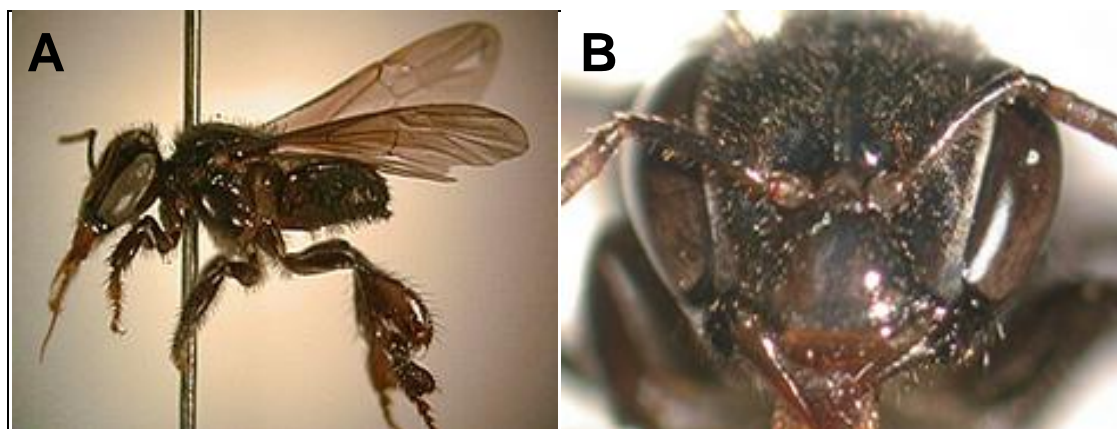
A se confirmar a validade desta hipótese, este achado terá implicações na criação de espécies de abelhas com interesse na polinização. Atualmente, é voz corrente que a criação de espécies de abelhas sem ferrão exige a manutenção de um número significativo de colônias. Para algumas espécies, *Melipona quadrifasciata*, por exemplo, o número estimado de colônias para sustentar um número adequado de alelos sexuais está acima de 40 colônias. A difusão de tais conhecimentos, se por um lado chama a atenção para o problema da endogamia e suas consequências para a determinação do sexo nos himenópteros, por outro lado desestimula o pequeno criador, incapaz de obter e manter um número elevado de colônias.

Portanto, estudos semelhantes ao aqui proposto são necessários para que se possam testar as idéias correntes, com reflexos positivos e imediatos para o manejo e criação de espécies sociais.

### **1.3. A espécie escolhida, *Partamona helleri***

O gênero *Partamona* está incluído na tribo Meliponini e compreende 33 espécies descritas. Com ampla distribuição geográfica, exclusivamente neotropical, estas espécies são encontradas desde o sul do México até o sul do Brasil. Os locais de nidificação ocorrem em florestas, cerrados, caatingas, regiões montanhosas, na Cordilheira Centro-Americana e nos Andes, chegando a regiões com mais de 2.000 metros de altitude. A população dos ninhos pode variar entre 1.000 a 3.000 indivíduos adultos (PEDRO & CAMARGO, 2003).

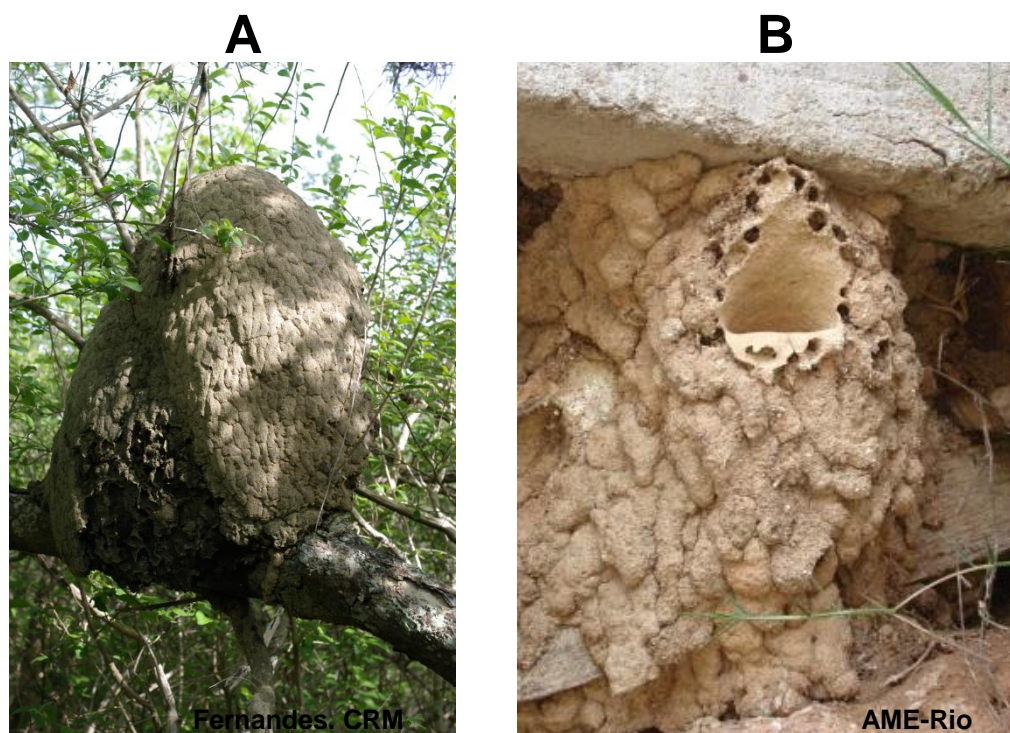
As espécies de *Partamona* são muito semelhantes morfologicamente. Há um número reduzido de caracteres morfológicos passíveis de codificação e polarização, prejudicando o estabelecimento de afinidades filogenéticas dentro do grupo (Figura 3). Acresce-se a esta dificuldade o fato de que os machos de muitas espécies não serem conhecidos. A despeito disto, a partir de associações entre eventos de disjunções e quebras geográficas, o gênero foi dividido em cinco grupos filogenéticos: *bilineata/epiphytoplila*, *musarum*, *nigrior* e *cupira*. (Pedro & Camargo 2003).



**Figura 3.** Vista lateral de uma fêmea adulta de *Partamona helleri* (A); em B, vista frontal da cabeça (Fotos de Sylvia Maria Matsuda, Laboratório de Abelhas – IB/USP).

Os ninhos destas abelhas apresentam uma grande variedade de tipos de entradas, as quais são extremamente elaboradas e ornamentadas, podendo variar na forma e cor, embora tenham o entorno formando o desenho de um triângulo. Quanto à nidificação, as espécies adaptadas a ambientes alterados pela ação humana nidificam freqüentemente em vasos de plantas, frestas de paredes e beirais de casas, enquanto as termitófilas obrigatórias constroem seus ninhos

em termiteiros ativos ou inativos; há ainda as que nidificam sob raízes de epífitas (Figura 4). No entanto, os hábitos de nidificação de várias espécies, p.e., *Partamona subtilis* e *P. litoralis*, são desconhecidos (Pedro & Camargo 2003).



**Figura 4.** Ninhos de *Partamona seridoensis* (A) e *P. helleri* (B) construídos em associação com termiteiro da espécie *Constrictotermes* sp ou sob pedras, respectivamente.

Os ninhos das espécies de *Partamona*, independentemente do substrato que utilizam, são formados por uma estrutura de entrada, uma câmara vestibular (esta estrutura é autapomórfica para o gênero) e uma ou mais câmaras de crias e potes de alimento. A comunicação entre o vestíbulo e a câmara de crias é feita, geralmente, através de uma galeria. O uso de terra cimentada com resinas, nas edificações do ninho, exceto nos favos, potes e lamelas, predomina em todas as espécies. Outra característica de *Partamona*, exceto em *P. testacea*, é a presença na parte inferior da entrada de um emaranhado de túbulos interligados,



construídos unicamente de terra ou de terra e resina. A função destes túbulos é ainda desconhecida, mas podem estar repletos de abelhas vivas; algumas vezes, também, observa-se lixo no interior destes (AZEVEDO & ZUCCHI, 2000).

Barreto e Castro (2007) estudaram *Partamona rustica* e *P. cupira* em uma área de caatinga na região de Milagres (Bahia) e verificaram que estas e outras abelhas do gênero nidificam em associação com termiteiros ativos ou abandonados da espécie *Constrictotermes cyphergaster*.

A espécie objeto deste estudo, *Partamona helleri*, também conhecida como Cupira do Sudeste, está incluída no clado cupira e encontra-se distribuída ao longo de toda a Mata Atlântica e áreas abertas do nordeste de Santa Catarina até a região de Salvador (Bahia), atingindo a oeste o vale do Rio São Francisco (Minas Gerais), na região dos cerrados (Figura 5). É a única espécie da região Sudeste do Brasil que não nidifica em associação com termiteiros, podendo ser encontrada em áreas urbanas. Quando em ambientes sem influência antrópica, seus ninhos são construídos sob raízes de epífitas. Difere das demais espécies devido à ausência de estrias longitudinais nas bordas inferior e superior da estrutura de entrada do ninho e pelo fato desta apresentar o desenho de um triângulo equilátero com vértices alargados como na Figura 4B (PEDRO & CAMARGO, 2003).

Estudos sobre a biologia e a ecologia de *P. helleri*, incluindo aqui a utilização de recursos tróficos pela espécie, são esparsos. A análise polínica das massas retiradas das corbículas de abelhas coletadas no Campus da ESALQ-USP (Piracicaba, SP) demonstrou que as operárias de *P. helleri* e de *Plebeia droryana* foram as que apresentaram maior uniformidade na utilização das fontes



**Figura 5.** Mapa Político do Brasil destacando em cinza os estados da região nordeste, sudeste e sul do país nos quais a espécie *P. helleri* é encontrada.

de pólen observadas no local de estudo. Além disso, as plantas das famílias Caesalpiniaceae, Liliaceae, Myrtaceae e Solanaceae foram as mais utilizadas para coleta de recursos tróficos por *P. helleri* na área estudada (CARVALHO *et al.*, 1999). Ramalho (2004) estudou um fragmento de Mata Atlântica no Estado de São Paulo e observou operárias adultas da espécie coletando material em flores de plantas de outras famílias como Rubiaceae, Fabaceae e Lauraceae, além das já citadas.

Taura e Laroca (2004) estudaram as interações existentes entre as abelhas e flores de *Vassobia breviflora* no Jardim Público de Curitiba. Os autores verificaram que *P. helleri* é uma das espécies mais comumente encontradas nestas flores, principalmente em coleta de néctar. Segundo Azevedo *et al.* (2007), essa abelha também foi observada nas flores do feijão guandu, planta bastante

cultivada no Brasil. Carvalho (2007) atribui a *P. helleri*, juntamente com outros meliponídeos, o papel de agente polinizador do cafezeiro-do-mato, importante planta forrageira do Pantanal Mato-Grossense e de grande valor medicinal.

Se a biologia e a ecologia destas espécies são pouco conhecidas, os dados disponíveis na literatura sobre a Genética de Populações e Genética Ecológica das espécies de *Partamona* são igualmente restritos. Ao analisar citologicamente oito espécies desse gênero, Costa *et al.* (1992) observaram que todas apresentaram  $2n = 34$  cromossomos; contudo, um sistema de cromossomos supranumerários, variável de 0 a 4 cromossomos, foi encontrado em *Partamona helleri*.

Tosta *et al.* (2004) utilizaram RAPD para detectar seqüências de DNA associadas aos cromossomos B de *P. helleri*, identificando um marcador específico que se hibridizava somente em indivíduos que continham cromossomos supranumerários. Mais recentemente, Tosta *et al.* (2007) delinearam um marcador SCAR para os cromossomos B desta espécie passível de análise em qualquer estágio do ciclo de vida deste inseto e observaram que todos, alguns ou nenhum dos indivíduos de uma mesma colônia podem apresentar cromossomos B.

Marthe *et al.* (2007) analisaram trinta colônias de *Partamona helleri* mediante a técnica PCR-RAPD dividindo-as em três grupos de acordo com a presença, a ausência e o número de indivíduos de uma colônia que continham cromossomos B. Estes autores observaram que o grau de variabilidade genética dos ninhos analisados não estava associado à presença de cromossomos B.

Operárias adultas de ninhos de *P. mulata* e *P. helleri* coletados em diferentes regiões do Brasil foram analisadas para genes mitocondriais por RFLP-

PCR e para alguns locos de microssatélites utilizando oligos iniciadores heterólogos (BRITO, 2005; BRITO & ARIAS, 2008, 2010). Os dados obtidos pelas autoras indicaram que ou as populações de *P. mulata* passaram por uma redução populacional recente ou que a colonização da área analisada tenha ocorrido a partir de fêmeas de um único sítio. Resultado distinto foi observado em *P. helleri*, visto que a distribuição descontínua dos haplótipos encontrados sugeria que as populações estudadas tiveram contato no passado e atualmente estejam se diferenciando graças ao isolamento estabelecido. Adicionalmente, as autoras relataram a ocorrência de monandria em *P. mulata* e de duas patrilineas em algumas colônias de *P. helleri*.

Espécies eusociais como *Partamona helleri* são freqüentemente utilizadas para averiguar a importância do parentesco na evolução de sociedades complexas. No entanto, os estudos genéticos minimizam a função organizadora do ambiente na moldagem da expressão e desenvolvimento de características socialmente importantes. Sustentando tal afirmação, Hamilton (1964) postula que o ambiente social desempenha papel fundamental na determinação de fenótipos de organismos sociais. Desta forma, torna-se essencial que estudos genéticos sejam acompanhados de estudos ecológicos para que se possa compreender satisfatoriamente aspectos da biologia reprodutiva, da estrutura sociogenética dos ninhos e dos fatores que viabilizam o sucesso de uma espécie na colonização de certa área, objetivos do presente trabalho.

## 2. Objetivo

Considerando os aspectos acima referidos sobre as abelhas sem ferrão, sua importância ecológica e como fonte alternativa de renda, o perigo de acentuado declínio populacional de várias destas espécies e a pouca informação disponível na literatura sobre a biologia e genética destas abelhas, o objetivo deste estudo foi testar a “hipótese de trabalho” anteriormente definida, a saber, *uma área é colonizada por um número reduzido de linhagens maternas e o fluxo gênico interpopulacional ocorre graças principalmente aos machos dispersores*, utilizando *Partamona helleri* como estudo de caso.

A validação da hipótese exige o cumprimento de três etapas:

i) estimar o número de linhagens maternas que deram origem à população de *Partamona helleri* atualmente residente nas áreas de estudo. O número de fêmeas fundadoras será estabelecido a partir dos haplótipos mitocondriais observados, considerando-se a herança materna deste tipo de marcador;

ii) estimar o nível de variação genética intra e interpopulacional mediante o uso de marcadores microssatélites, estabelecendo o papel dos machos na promoção do fluxo gênico entre populações;

iii) a partir das segregações fenotípicas observadas nos locos microssatélites, determinar a estrutura sociogenética nidal, isto é, averiguar se as famílias resultam de uma estrutura monogínica/monândrica.

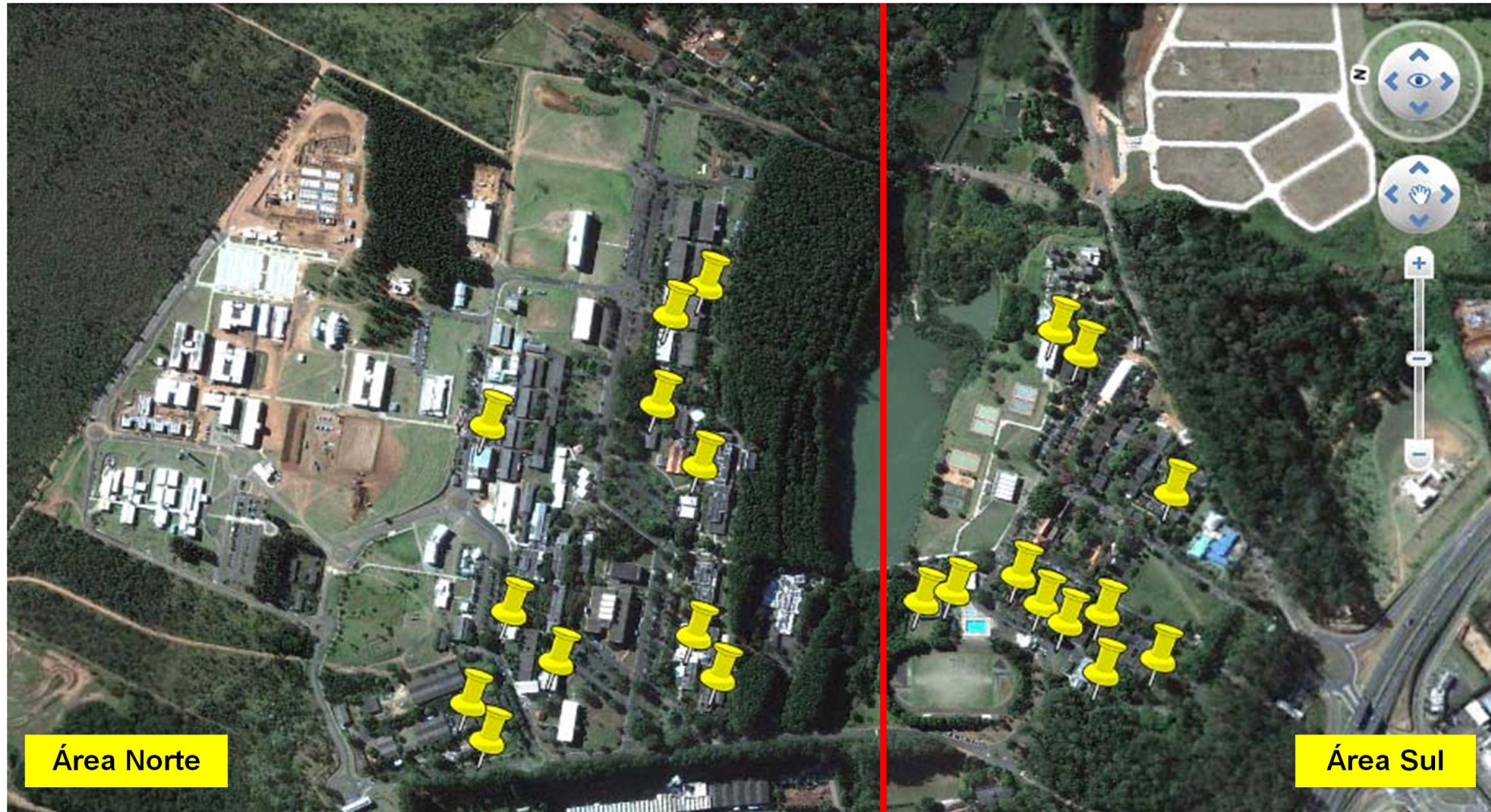
### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Material

O material analisado consistiu de operárias adultas provenientes de 73 ninhos de *Partamona helleri* coletados em três áreas: o Campus da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar, n = 34), o Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto (USP-RP, n = 25) e o Campus da USP em São Paulo (USP-SP, n = 14). As coletas nos dois Campi da Universidade de São Paulo foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares (USP-RP) e com a Profa. Dra. Maria Cristina Arias (USP-SP).

Os ninhos coletados na UFSCar pertencem a 22 sítios de coleta distribuídos igualmente entre as Áreas Norte e Sul do Campus (Figura 6), ou seja, as duas áreas analisadas apresentaram onze locais de amostragem dos ninhos de *P. helleri*, sendo que em alguns destes foi coletado material de dois ou mais ninhos adjacentes.

O Campus da UFSCar está situado na área rural da cidade de São Carlos (São Paulo) e o clima é caracterizado como tropical, com verão úmido e inverno seco (Cwai) e quente com um período seco bem definido (Awai). O terreno da Universidade, atravessado pelos córregos Monjolinho e Fazzari, foi subdividido em área urbanizada e não urbanizada, segundo o tipo de utilização do solo. A flora é diversificada, consistindo de plantas características de Mata Ciliar e Cerrado, bem como plantações de *Eucalyptus* sp. e *Pinus* sp., espécies arbóreas e arbustivas (naturais e exóticas), com diferentes tipos de árvores



**Figura 6.** Foto ilustrativa do Campus da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos). Os pontos em amarelo indicam os locais de coleta dos ninhos de *P. helleri* coletados entre as Áreas Norte e Sul do Campus, separadas pela reta em vermelha.



frutíferas como goiabeiras e jaqueiras presentes nos jardins ou gramados (PAESE, 1997).

No Campus USP-SP, localizado no Planalto Paulistano, se encontra uma área de aproximadamente 102.110 m<sup>2</sup> – a Reserva Florestal – composta em sua maior parte por vegetação característica de Floresta Estacional Semidecídua. Cerca de 8% da área total do Campus é ocupada por edificações e o restante de sua extensão é representado por avenidas, estacionamentos arborizados e áreas verdes, onde predominam gramados e jardins, incluindo plantas exóticas e algumas árvores frutíferas. Segundo dados da Estação Hidrometeorológica da Cidade Universitária, o clima da região é classificado como Cwa ou subtropical úmido (PAIVA, 2006).

O Campus USP-RP está situado em uma região que apresenta clima tropical de altitude com as estações bem definidas de verão chuvoso e inverno seco. Pouco resta da vegetação nativa que cobria a área do Campus em consequência da agricultura, edificações e desmatamentos; contudo, em certos locais foram feitos reflorestamentos com exemplares de espécies nativas brasileiras e exóticas, incluindo algumas espécies de árvores frutíferas, tais como bananeiras, goiabeiras, laranjeiras, mangueiras, entre outras (VARANDA *et al.*, 2005).



### 3.2. Métodos

Coleta do Material: As coletas de material biológico no Campus da UFSCar foram realizadas nos dias 13/07/2004 e 23/02/2007 durante o período diurno, por este compreender os horários de maior atividade da colônia, facilitando a coleta. Um saco plástico foi colocado na abertura de entrada/saída de abelhas de cada ninho com o intuito de capturar número suficiente de fêmeas para análise. Em seguida, o material coletado foi depositado em recipientes devidamente identificados e armazenados à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até ser analisado. As abelhas provenientes dos dois Campi da USP foram coletadas nos dias 06/12/2006 (USP-SP) e 13/06/2007 (USP-RP) sendo estocadas em álcool para conservação.

Análise mitocondrial: O DNA total foi extraído a partir do mesossoma (tórax) ou de uma perna do terceiro par das operárias coletadas, segundo o método de fenol-clorofórmio (SHEPPARD & McPHERON, 1991) ou Chelex 100 (WALSH *et al.*, 1991), respectivamente, para análise dos genes mitocondriais citocromo b (*cyt b*) e subunidade I do complexo citocromo oxidase c (*COI*). Nas reações para amplificação via PCR de regiões *cyt b* e *COI* foram utilizados os primers delineados com base no genoma mitocondrial de *Apis mellifera* (HALL & SMITH, 1991; DICK *et al.*, 2004). A PCR dos fragmentos de interesse ocorreu em volume final de 25  $\mu\text{L}$  contendo água esterilizada, 1X tampão de reação, 1  $\mu\text{M}$  de cada primer, 2.5 mM de cloreto de magnésio, 250  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 1U de Taq DNA Polimerase (Biotools) e 1  $\mu\text{L}$  de DNA extraído. As reações compreenderam 35

ciclos a 94°C por 30 segundos, 20 segundos à temperatura de hibridização do primer utilizado (*cyt b* - 54°C e *COI* - 50°C) e um minuto à 70°C para extensão da fita de DNA. A visualização dos fragmentos gerados ocorreu em gel de poliacrilamida 8% não desnaturante e corado com prata.

A presença de haplótipos mitocondriais para as regiões estudadas dos genes *cyt b* e *COI* foi verificada por seqüenciamento direto do produto da PCR de uma operária de cada um dos ninhos coletados na UFSCar e nos Campi USP-RP e USP-SP.

Os produtos de amplificação foram purificados utilizando-se 1U da enzima SAP, 10U de *ExoI* e 8 µL do DNA amplificado em cada reação, sendo incubados a 37°C por uma hora e a 80°C por quinze minutos. Em seguida, uma alíquota dessa reação foi aplicada em gel de agarose 1% para verificar sua eficiência e dar continuidade ao seqüenciamento. O volume final da reação de seqüenciamento ocorreu em 10 µL, incluindo 3.5 µL de Tampão Save Money 2.5x, 0.5 µl de Big Dye, 1 µM de primer Forward ou Reverse e 1 µL de DNA purificado, posteriormente a reação foi processada no seqüenciador automático ABI 3700.

Os eletroferogramas obtidos foram analisados no programa Codon Code versão 3.7.1 (CodonCode, Dedham, Massachusetts, United States) e as seqüências nucleotídicas editadas alinhadas no programa MultAlin© (disponível em: <http://bioinfo.genopole-touhouse.prd.fr/multalin.multalin.html>) para verificar e comparar possíveis substituições de bases. O Software Gene Runner© (versão 3.05) foi utilizado nas análises de restrição e na conversão dos códons em aminoácidos. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Arlequin versão 3.5.1.2 (EXCOFFIER *et al.*, 2005), de acordo com os parâmetros

estabelecidos por Tamura e Nei (1993) e considerando o valor de  $\alpha = 0,05$ . As redes de haplótipos foram construídas no software TCS versão 1.21 com  $\alpha = 0,05$  (CLEMENT *et al.*, 2000).

Prospecção de microssatélites: O isolamento de microssatélites específicos para *P. helleri*, a partir da construção de bibliotecas de DNA enriquecidas (BILLOTTE *et al.*, 1999), foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Anete Pereira de Souza e sua aluna de Doutorado Fernanda Cidade, ambas do Laboratório de Análise Genética e Molecular (CBMEG) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Inicialmente, o DNA total extraído do mesossoma de 36 operárias adultas de *P. helleri*, segundo o método fenol-clorofórmio (SHEPPARD & McPHERON, 1991), foi digerido com *RsaI* e os fragmentos obtidos foram ligados aos adaptadores Rsa21 e Rsa25 pela enzima T4 ligase. Essa reação é importante por garantir que cada fragmento tenha uma terminação comum e conhecida para a hibridização dos primers nas reações de PCR futuras. Em seguida, no processo de seleção dos fragmentos contendo microssatélites o DNA ligado foi purificado, as “esferas magnéticas” (beads) recobertas por estreptavidina foram hibridizadas aos fragmentos com oligos biotinizados (sonda) e essa mistura foi lavada para remoção de fragmentos não específicos, utilizando-se do sobrenadante na PCR com os fragmentos de DNA enriquecidos.

Após esse processo, foi feita a clonagem dos fragmentos enriquecidos no vetor plasmidial pGEM-T para serem inseridos em células bacterianas competentes de *Escherichia coli*. Colônias recombinantes selecionadas (n = 96)

passaram pelo processo de isolamento do DNA plasmidial (Mini-prep) para posterior reação de seqüenciamento, a qual ocorreu em um volume final de 10 µL, contendo 1 µL de água MilliQ, 2 µL de Tampão Save Money, 1 µL dos primers T7 (Foward) e SP6 (Reverse) na concentração de 5pmol, 4 µL de DNA plasmidial e 2 µL de Big Dye (versão 3.1). A reação de seqüenciamento consistiu de um passo inicial de 96°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos a 96°C por 45seg, 50°C por 30seg e 4 minutos a 60°C.

As seqüências obtidas foram analisadas nos programas Codon Code versão 3.5.7 (CodonCode, Dedham, Massachusetts, United States) e SSRIT (endereço eletrônico <http://www.gramene.org/db/searches/ssrtool>) para edição e busca de seqüências repetitivas nos eletroferogramas do seqüenciamento e determinar presença ou ausência de microssatélites, respectivamente. A confecção dos primers ocorreu com o auxílio dos softwares Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e Gene Runner© (versão 3.05). Desse modo, sete pares de primers denominados Phel-1 a Phel-7 foram confeccionados e o primer forward de cada par foi marcado com um fluoróforo (FAM, HEX ou TET). As seqüências nucleotídicas dos respectivos primers seguem abaixo:

**Phel-1 F:** 5' – TCGGCCGCTCATGGATAAGTC – 3'

**Phel-1 R:** 5' – TCAACGCCAGTCGAGAAGAGGATG – 3'

**Phel-2 F:** 5' – CGTTCAATTTACCGCACAA – 3'

**Phel-2 R:** 5' – CCACGTATCCAGGCTTTTTA – 3'

**Phel-3 F:** 5' – GTCGCAATAGCAATAGG – 3'

**Phel-3 R:** 5' – TGGTCGTCATCTGTTTT – 3'

**Phel-4 F:** 5' – AATAACACGCGCACCATCA – 3'

**Phel-4 R:** 5' – ACACATACAGAAGAACGAAGAAAA – 3'

**Phel-5 F:** 5' – GTAAGGAAATGCAAGGAACT – 3'

**Phel-5 R:** 5' – AAAATAAAAATGCATAAAACAA – 3'

**Phel-6 F:** 5' – TTGGCACGAAAAGAACA – 3'

**Phel-6 R:** 5' – TTGAAAGCTGAAAATCCA – 3'

**Phel-7 F:** 5' – TTACATAAGAGCAAAACT – 3'

**Phel-7 R:** 5' – TCGAAAATGAAATAAATA – 3'

Análise de microssatélites: Foram testados sete pares de primers (Phel-1 a Phel-7) prospectados especificamente para *P. helleri* e 18 locos microssatélites utilizando primers heterólogos, sendo dois delineados para *Trigona carbonaria* (GREEN *et al.*, 2001), dois de *Scaptotrigona postica* (PAXTON *et al.*, 1999a) e 14 desenvolvidos para *Melipona bicolor* (PETERS *et al.*, 1998), totalizando 25 locos microssatélites.

A PCR foi realizada em volume final de 10 ou 25 µL, contendo 1 µL do DNA extraído, 1 µM de cada primer, 2.5 mM de cloreto de magnésio, 250 µM 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 por um minuto. A identificação dos alelos foi feita em gel de poliacrilamida 9% não desnaturante e corado com prata, com exceção dos microssatélites específicos (Phel-1 a Phel-7) e dos heterólogos Mbi232 e Mbi254 os quais tiveram o primer

forward marcado com fluoróforo. Para estes, o produto da PCR foi diluído 10X e uma alíquota de 2  $\mu$ L foi misturada com 7.75  $\mu$ L de Tween 20 0.1% e 0.25  $\mu$ L de ET550-R (padrão de tamanho), e posteriormente submetida à corrida no seqüenciador automático MegaBACE™1000. Os resultados obtidos foram analisados no software MegaBACE Genetic Profiler versão 1.2. Algumas informações sobre os microssatélites analisados estão disponíveis na Tabela 1.

Nos programas Arlequin versão 3.5.12 (EXCOFFIER *et al.*, 2005) e GenAlex 6.41 (PEAKALL & SMOUSE, 2006) foram feitas a estimativa dos parâmetros de diversidade, considerando  $\alpha=0.05$  e dois indivíduos selecionados aleatoriamente de cada ninho coletado nos três Campi para os locos microssatélites Mbi215, Mbi278, Mbi232, Mbi254 e Phe1 a Phe1-7. A significância das diferenças na diversidade genética entre as áreas de estudo foram testadas utilizando teste t pareado dos valores arcoseno transformados das heterozigosidades intralocos esperadas, He (ARCHIE, 1985). O programa GenAlex 6.41 foi ainda utilizado para realizar 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.

Análise aloenzimática: Para checar algumas amostras ao nível de espécie, os extratos de cabeça e mesossoma de 18 operárias adultas de *P. helleri* pertencentes a um ninho amostrado na UFSCar e a 4 ninhos coletados no Campus USP de Ribeirão Preto (USP-RP 5, USP-RP 8, USP-RP 16 e USP-RP 18) foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de amido (SMITHIES, 1955) para identificação dos fenótipos para 10 sistemas aloenzimáticos (EST, HK, GPI,

MDH,  $\alpha$ GPDH,  $\beta$ HBDH, ME, PGM, 6-PGD e ICD). A revelação histoquímica destes fenótipos foi realizada de acordo com protocolos descrito por Harris e Hopkinson (1976).

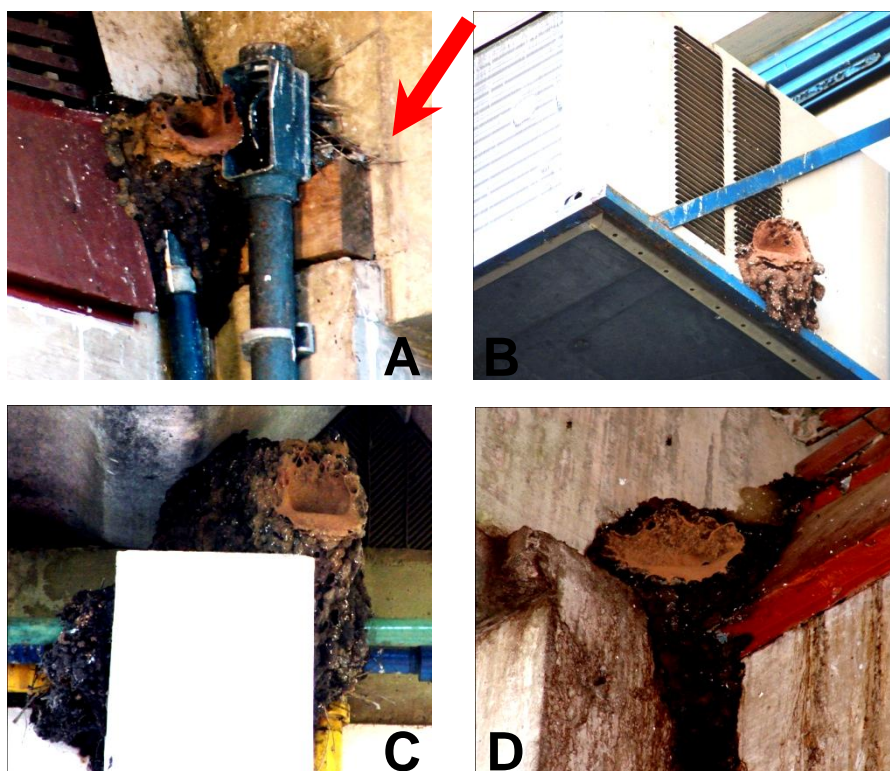
**Tabela 1.** Microssatélites específicos (Phel-1 a Phel-7) e heterológos (Tc3, T3, T4 e Mbi) testados em *Partamona helleri*, com respectivos “motivos” de repetições, temperaturas de anelamento (Ta), números de ciclos (Nc) e tamanhos dos fragmentos em pares de bases, segundo Brito (2005), Paxton *et al.* (1999a) e os dados encontrados neste trabalho para a espécie estudada (<sup>1</sup>); (-) indica que não houve amplificação.

Locos	Repetições	Ta (°C)	Nc	Tamanho (pb)	Fluoróforo
Tc3.56	TC	-	-	-	
Tc3.302	TTC	52	30	158	
T3-32	CT	-	-	-	
T4-171	CTCA	50	30	112	
Mbi11	ACC	52	30	137	
Mbi28	TCC	50	30	105	
Mbi32	AGC	52	30	140	
Mbi33	TCC	-	-	-	
Mbi201	TTC	54	30	140	
Mbi215	TTC	50	30	88 - 95	
Mbi218	CTT	62	30	118	
Mbi232	CTT	48	35	136 - 184 <sup>1</sup>	FAM
Mbi254	AAG	52	30	211 - 238 <sup>1</sup>	FAM
Mbi256	AGA	-	-	-	
Mbi 259	(AGG)(AGA)(GGA) GAA(GGA)	-	-	-	
Mbi278	CTT	54	30	102 - 104	
Mbi305	(TCT)CCTTCG(TCT)(CAT) (CAG)(CAT)(CCT)	-	-	-	
Mbi522	TGC	54	30	135	
Phel-1	AC	55	30	220 - 234 <sup>1</sup>	TET
Phel-2	TC	52	30	245- 297 <sup>1</sup>	TET
Phel-3	CT	53	30	97 - 101 <sup>1</sup>	JOE
Phel-4	GT	62	30	246 - 252 <sup>1</sup>	FAM
Phel-5	CA	55	30	100 - 114 <sup>1</sup>	TET
Phel-6	CA	52	30	172 - 182 <sup>1</sup>	HEX
Phel-7	TG	48	30	282 - 294 <sup>1</sup>	HEX

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Biologia de nidificação

Os ninhos de *Partamona helleri* coletados no Campus UFSCar foram construídos apoiados sobre diferentes superfícies, como paredes, interior de aparelhos de ar-condicionado e canos de PVC ou em vigas de prédios, protegidos da ação de chuvas, sol e ventos fortes; contudo, não estavam em locais totalmente fechados. Uma colônia desta espécie foi fundada ao lado de um ninho ativo de pombo comum. Segundo Pedro e Camargo (2003), é comum encontrar colônias construídas em ninhos abandonados do pássaro conhecido como “joão graveteiro” (*Phacellodomus* sp.) (Figura 7).



**Figura 7.** Ninhos de *P. helleri* coletados na UFSCar e construídos em diversos substratos, como aparelhos de ar condicionado (A) e sobre paredes e lajes de prédios (B, C e D). A seta vermelha em (A) indica um ninho de pombo.



A utilização de diferentes substratos permitiu que os ninhos apresentassem uma ampla variação de altura em relação ao solo. Enquanto a maioria dos ninhos estava a vários metros do chão, poucos encontravam-se a 1.70 m de altura, como verificado em outros trabalhos (PEDRO & CAMARGO, 2003; TEIXEIRA & CAMPOS, 2005; TAURA & LAROCA, 2001).

A maioria dos ninhos coletados, cerca de 20 entre 34 colônias, foi amostrada na região do Campus designada como Área Sul (Anexo 1). A denominação se deve ao fato desta área ser o local inicial da ocupação do Campus, pois abriga os prédios mais antigos da Universidade. Alguns ninhos ali encontrados pareciam ter mais idade, devido à resina escurecida.

Apesar disso, as Áreas Norte e Sul apresentaram a mesma quantidade de locais de coleta, totalizando 11 sítios para cada região (Figura 6). Além disso, os ninhos observados na Área Norte apresentaram uma disposição mais esparsa, talvez por essa região ocupar uma área maior do Campus e incluir os prédios mais recentes e muitos ainda em construção, originando novos sítios de nidificação para a espécie estudada.

Em diversos pontos de coleta da Área Sul foi possível observar a presença de dois ou mais ninhos adjacentes em um único prédio, diferentemente do observado na Área Norte. Segundo Batista *et al.* (2003), o comportamento agressivo de *P. helleri* determina que seus ninhos sejam construídos com certa distância um do outro. Todavia, é possível que tal afastamento entre os ninhos possa estar relacionado à disponibilidade de recursos, como alimento e locais para nidificação, e não somente à agressividade, considerando-se a distribuição verificada no Campus UFSCar.

Em estudo conduzido no Campus Federação/Ondina da Universidade Federal da Bahia foi reportado um agrupamento de ninhos de *T. spinipes* em determinada área do Campus. As abelhas desta espécie são maiores que as do gênero *Partamona* e igualmente apresentam comportamento agressivo. A agregação de ninhos verificada parecia estar associada a melhores oportunidades para alimentação e nidificação (SOUZA *et al.*, 2005).

Alguns ninhos da Área Norte do Campus UFSCar não apresentaram atividade, ou seja, haviam sido destruídos mediante fogo e/ou veneno para reforma dos prédios nos quais estavam abrigados ou ainda por estarem situados em lugares com grande tráfego de pessoas. Posteriormente, verificamos que alguns destes ninhos foram reconstruídos. Nogueira-Neto (1997) inferiu que a fundação de novos ninhos não ocorre durante o inverno devido à redução na disponibilidade de alimento.

O horário de maior atividade no período diurno dos ninhos coletados na UFSCar foi entre as 10:00 - 10:30 horas da manhã, resultado semelhante ao observado por Teixeira e Campos (2005) para colônias amostradas na cidade de Viçosa (MG). Nos dias frios, as abelhas passaram a sair do ninho após esse horário, visto que a atividade de vôo das operárias é influenciada também por fatores externos, como intensidade luminosa e, principalmente, temperatura (AZEVEDO, 1997; HILÁRIO *et al.*, 2001; POMPEU, 2003).

Foi observado que a entrada dos ninhos coletados de *P. helleri* possui a forma popularmente conhecida como “boca de sapo”, entrada característica dos ninhos desta espécie e que apresenta diâmetros variáveis (Figura 7). Esta entrada possui uma rampa superior e outra inferior que se afunilam gradualmente até formarem um fundo arredondado com orifício. Outro aspecto

dessa entrada é a presença de alvéolos isolados ou enfileirados na rampa superior para unir a rede de tubos construída na estrutura de entrada do ninho (PEDRO & CAMARGO, 2003).

Segundo Couvillon *et al.* (2008), o tamanho da entrada determina as estratégias de defesa e o tráfego de indivíduos. A arquitetura observada nos ninhos de *P. helleri*, pela presença das rampas superior e inferior, permite que as abelhas consigam estabilizar a relação defesa/tráfego, pois o pequeno orifício na base do “funil” limita a entrada de forrageadoras e permite a presença de abelhas defensoras ao redor do mesmo.

Contudo, a utilização das diferentes arquiteturas de entradas observadas nos ninhos de abelhas nativas não pode ser o único critério para diferenciar as espécies dentro do grupo. Franck *et al.* (2004) estudaram duas populações de *Trigona hockingsi* localizadas no Norte e Sul da Austrália e verificaram que os ninhos dessas abelhas, embora tivessem estruturas de entrada similares, ao serem analisados para diversos microssatélites e uma região do gene mitocondrial *citocromo b*, pertenciam à duas espécies distintas. Segundo esses autores, as modificações na arquitetura dos ninhos foram resultantes de mecanismos simples, sem importância para o processo de especiação destas abelhas.

O comportamento agressivo das operárias foi observado durante a coleta dos ninhos no Campus da UFSCar, através de mordidas e tentativas de penetração nos ouvidos, como já relatado em outros trabalhos (BRITO, 2005; BORGES, 2007).

As operárias responsáveis pela defesa do ninho encontram-se alojadas no vestíbulo e, segundo Roubik (2006), somente as espécies que apresentam ninhos expostos possuem este tipo de comportamento, como *P. helleri*.

Essa agressividade não se restringe somente aos seres humanos; ela foi observada entre outras espécies de abelhas, como *Trigona spinipes* e *Melipona rufiventris* (NIEH *et al.*, 2005).

Em área do Campus da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) foram relatados alguns casos de agressividade por parte de *Apis mellifera* em relação a *Trigona spinipes* quando estas se encontravam na mesma flor (AGOSTINI & SAZIMA, 2003).

Eventos agressivos envolveram *Partamona* sp. e *Apis mellifera* em um prédio construído na Universidade Federal de Juiz de Fora (SOUZA *et al.*, 2002).

Por outro lado, uma associação não relatada anteriormente foi verificada em diferentes locais situados na Área Norte do Campus UFSCar, nos quais três ninhos de *Partamona helleri* foram construídos ao lado de colônias de *Apis mellifera*, tendo ambos os ninhos muitos indivíduos e intensa atividade. Rasmussen (2004) estudou ninhos de *Trigona cilipes* construídos no interior dos ninhos da vespa *Epipona tatus* e da formiga *Azteca* e inferiu que a plasticidade comportamental das abelhas sem ferrão explicaria essas associações no processo de nidificação.

Vários estudos procuraram estabelecer a relação existente entre *Apis mellifera* e as abelhas sem ferrão ou nativas quanto à agressividade e fonte de recursos para nidificação e alimentação. Oliveira e Cunha (2005) observaram operárias de *A. mellifera* voando juntamente com indivíduos de *Partamona*

*vicina* em áreas desmatadas da Amazônia Central. Uma predominância de diferentes espécies de meliponídeos foi verificada na Ilha Grande (SP) em detrimento de *Apis mellifera* (LORENZON *et al.*, 2006).

Segundo uma revisão elaborada por Paini (2004), a introdução e a convivência com *A. mellifera* são fatores prejudiciais para a sobrevivência das abelhas nativas. Jha e Vandermeer (2009) não observaram competição envolvendo contato físico entre abelhas africanizadas e nativas; contudo, verificaram uma redução no número de abelhas sem ferrão em flores que possuíam muitas abelhas africanizadas forrageando. De acordo com Cairns *et al.* (2005), as abelhas africanizadas encontradas na região de Yucatán estariam adotando novos comportamentos para competir com as espécies nativas do mesmo local.

Biesmeijer e Slaa (2006) observaram, através da análise e comparação de 28 estudos, que *Apis mellifera* possui colônias muito numerosas e um eficiente mecanismo de recrutamento, tornando-a mais efetiva na coleta de alimento do que as abelhas de tamanho médio como *Partamona*, *Scaptotrigona* e *Melipona*. Para esses autores, *P. helleri* apresentou a menor largura de nicho trófico, juntamente com *Scaptotrigona*, provavelmente devido a estratégias de forrageamento, como preferência por certos tipos de flores, e pela competição com *A. mellifera*. Carvalho *et al.* (1999) observaram o contrário para *P. helleri* em uma área do Campus da ESALQ-USP de Piracicaba. Ali, *P. helleri* possuiu um amplo nicho trófico, apresentando ainda maior uniformidade na utilização das fontes polínicas ou plantas visitadas estimada em 68%, em relação a outras espécies de abelhas sem ferrão e *A. mellifera*.

Um estudo realizado em uma área com vegetação típica de cerrado, como verificado na UFSCar, localizada na cidade de Patrocínio Paulista (São Paulo), indicou uma pequena sobreposição na utilização de recursos florais entre *A. mellifera* e diversas espécies de meliponídeos, incluindo *P. helleri* (NOGUEIRA-FERREIRA & AUGUSTO, 2007).

Pelo período de coleta corresponder ao horário de atividade de vôo das operárias de *P. helleri*, várias operárias amostradas na UFSCar carregava em suas corbículas algum tipo de material, provavelmente pólen ou resina. O primeiro destes materiais, o pólen, apresentava-se como uma “pequena bola” maciça e lisa; já o segundo, tinha igualmente a forma arredondada, porém era mais escuro, pegajoso e aderente.

A análise polínica de operárias de *P. helleri* coletadas no Campus da UNICAMP revelou a presença de pólen coletado nas flores de *Eucalyptus*, goiabeira, flamboyant, tipuana, limoeiro, entre outras plantas encontradas também na UFSCar (CARVALHO *et al.*, 1999; PAESE, 1997).

Agostini e Sazima (2003) também observaram indivíduos de *P. helleri* na planta comumente conhecida como odontonema na ESALQ (USP de Piracicaba); contudo, as plantas mencionadas anteriormente nos Campi da UNICAMP e UFSCar também foram observadas e relatadas nesse estudo.

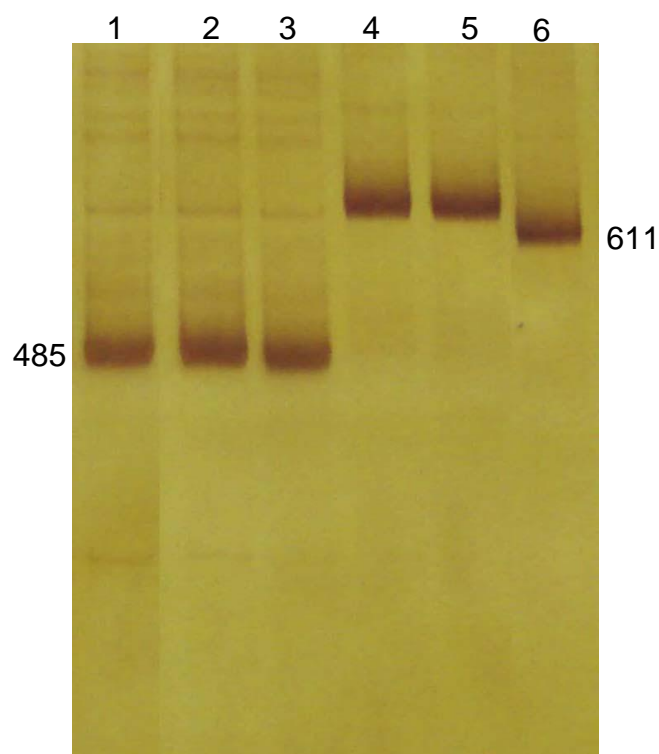
Diante das informações referidas, pode-se inferir que a biologia de nidificação de *Partamona helleri* apresenta algumas características, apresentadas por outras espécies de abelhas sem ferrão, como a abelha *Tetragonisca angustula*, que tornam possível sua sobrevivência em ambientes urbanos; dentre elas, destacam-se a flexibilidade na coleta de alimento e na escolha do local para construir seu ninho, tamanho populacional reduzido em

torno de 2.000 a 5.000 indivíduos por colônia e a presença de uma eficiente estratégia de proteção ou defesa do ninho (SOUZA *et al.*, 2005).

## 4.2. Genética Populacional

### 4.2.1. Análise do DNA mitocondrial

Os fragmentos amplificados dos genes mitocondriais *COI* e *citocromo b* de *Partamona helleri* podem ser visualizados na Figura 8.



**Figura 8.** Fragmentos amplificados para os genes mitocondriais *cyt b* (amostras 2 e 3) e *COI* (amostras 4 e 5) de *P. helleri* visualizados em gel de poliacrilamida 8% não desnaturante e corado com prata. As amostras 1 e 6 são fêmeas da espécie *Apis mellifera*, utilizadas como controle.

Os primers testados em *Eulaema nigrita* (DICK *et al.*, 2004) permitiram a amplificação de um fragmento de 611 pares de bases (pb) para *COI* em *P. helleri*, mesmo tamanho do produto obtido para *A. mellifera*, segundo a seqüência do genoma mitocondrial determinada por Crozier e Crozier (1993). Contudo, no gel de poliacrilamida não desnaturante (Figura 8), os fragmentos

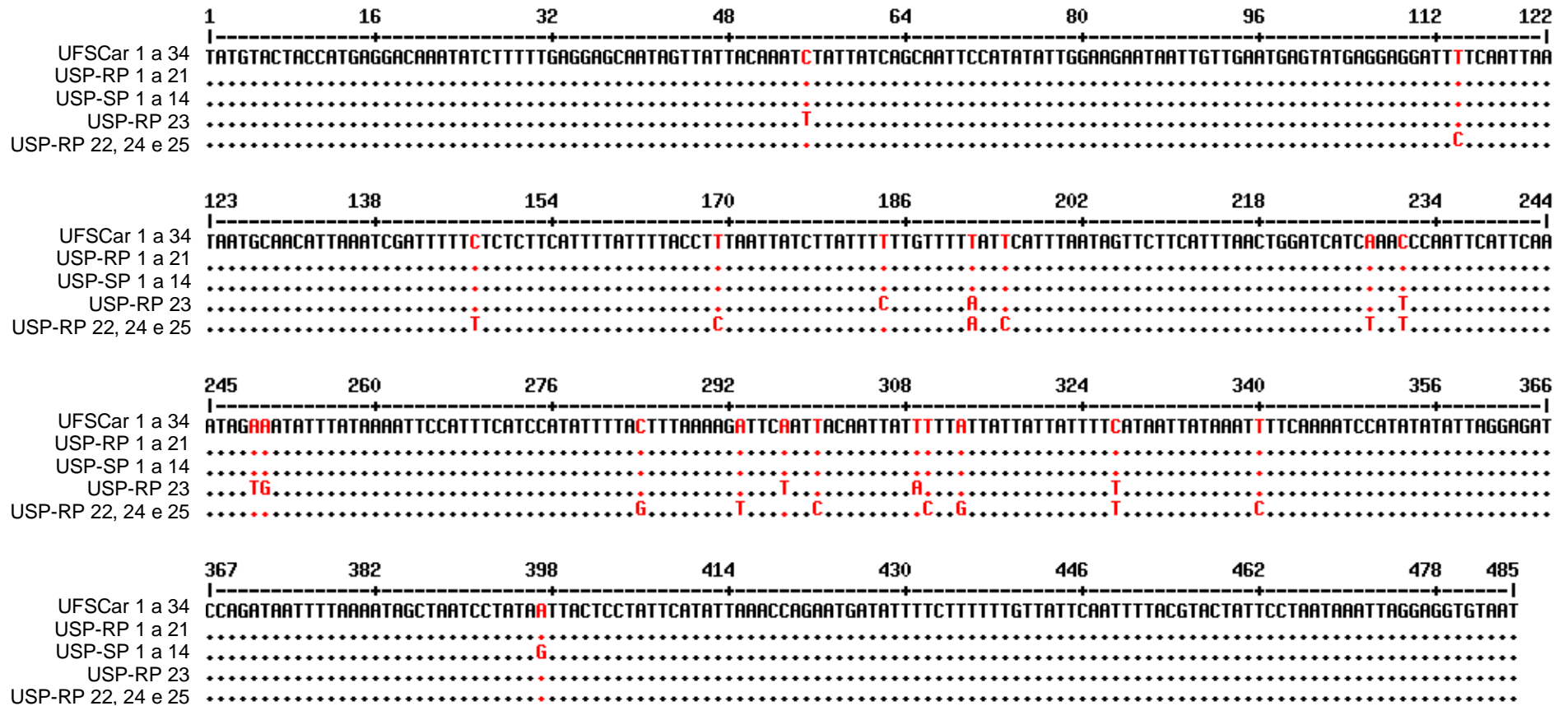


obtidos para as duas espécies parecem ter tamanhos diferentes. Esta aparente diferença pode ser decorrente de um polimorfismo conformacional da fita dupla de DNA (DSCP), ou seja, substituições nucleotídicas do tipo C/G em seqüências ricas em bases A/T alteram a mobilidade eletroforética da molécula de DNA observada no gel; dessa forma, os fragmentos aparentariam ter tamanhos diferentes. Ferreira *et al.* (2009) observaram este tipo de polimorfismo para o gene *cyt b* de *Apis mellifera*.

Quanto ao fragmento analisado do gene *cyt b* de *P. helleri*, este possui 485 pares de bases, o mesmo tamanho que a região correspondente amplificada para *A. mellifera* e *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* e *Melipona q. anthidioides* (Ferreira *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2008).

Foram seqüenciadas amostras de 73 fêmeas de *P. helleri* para *cyt b* e *COI*, compreendendo uma amostra de cada ninho coletado nos Campi da UFSCar, USP-RP e USP-SP. Todas as seqüências nucleotídicas obtidas apresentaram o tamanho em pares de bases esperado para cada gene mitocondrial estudado, 485 e 611 pb, respectivamente.

O alinhamento múltiplo das seqüências de *cyt b* mostrou que todas as amostras dos ninhos distribuídos pelo Campus da UFSCar possuíam a mesma seqüência nucleotídica ou haplótipo. Os ninhos coletados na USP-RP apresentaram três haplótipos, um deles compartilhado com amostras da UFSCar e os outros dois exclusivos deste Campus (os ninhos USP-RP 22, USP-RP 23, USP-RP 24 e USP-RP 25). Na USP-SP foi observado um haplótipo, diferente do caracterizado nos ninhos dos Campi da UFSCar e



**Figura 9.** Alinhamento de cinco seqüências nucleotídicas correspondentes aos quatro haplótipos observados para o gene *cyt b* de *P. helleri*. Os números escritos na frente dos respectivos Campi (UFSCar, USP-SP e USP-RP) indicam os ninhos nos quais o haplótipo foi observado.

USP-RP. A Figura 9 ilustra o alinhamento de algumas seqüências nucleotídicas que correspondem aos haplótipos de *cyt b* verificados nos Campi estudados.

Os baixos valores obtidos para diversidade nucleotídica indicam que as diferenças entre as seqüências nucleotídicas encontradas no Campus USP-RP não são significativas, visto que o haplótipo observado na UFSCar é o mais freqüente entre as amostras analisadas. A baixa diversidade nucleotídica é justificada ainda pela presença de um único haplótipo no Campus da UFSCar e outro na USP-SP. A composição nucleotídica estimada para os quatro haplótipos indicou que a região do gene *cyt b* estudada é rica em bases A/T e a proporção entre as bases se manteve apesar das substituições (Tabela 2).

**Tabela 2:** Composição e diversidade nucleotídicas estimadas para *cyt b* considerando as três populações de *P. helleri*.

Campi amostrados	Composição nucleotídica (%)				Diversidade nucleotídica (média por loco)
	T	A	C	G	
UFSCar	43.09	34.85	12.99	9.07	0.000000 ± 0.000000
USP-RP	43.06	34.79	13.02	9.13	0.007993 ± 0.004626
USP-SP	43.09	34.64	12.99	9.28	0.000000 ± 0.000000

O haplótipo encontrado na USP-SP diferiu daquele observado em fêmeas coletadas na UFSCar e USP-RP devido a uma substituição de base (A ↔ G) na posição 397, adicionando um sítio de restrição para *EcoRI* e alterando o aminoácido nesta posição, em que uma isoleucina é substituída por uma valina, ou vice-versa. A seqüência de aminoácidos da proteína formada por esse gene foi baseada nos genomas mitocondriais de *A. mellifera* e *Melipona*

*bicolor* (CROZIER & CROZIER, 2003; SILVESTRE *et al.*, 2008) que definem as três bases iniciais da seqüência de nucleotídeos como o primeiro aminoácido da proteína.

Com relação aos dois diferentes haplótipos encontrados na USP-RP, estes totalizaram 20 substituições nucleotídicas quando comparadas às seqüências da UFSCar e USP-SP (Tabela 3), levando a alteração de sete aminoácidos, principalmente entre fenilalanina e leucina nas posições 184, 192, 310 e 313. Algumas diferenças com relação à presença e/ou ausência de sítios de restrição para *EcoRI* nas posições 192, 195, 297, 300 e 310 também foram geradas por tais substituições. A mutação na posição 169 produziu um sítio de restrição para *MseI* nas amostras dos ninhos USP-RP 22, USP-RP 24 e USP-RP 25. Dessa forma, 13 das 20 mutações encontradas no gene *cyt b* são transições entre bases pirimidínicas T ↔ C, seguidas por algumas transversões T ↔ A.

Em trabalho de Iniciação Científica (com apoio FAPESP) realizado por Luana Bergamo em nosso laboratório, amostras de *P. helleri* de ninhos coletados em Viçosa (MG) e cidades próximas não exibiram alterações de aminoácidos para *cyt b*, visto que a seqüência de aminoácidos foi idêntica à apresentada pelas fêmeas coletadas na UFSCar. Ressalte-se que Bergamo (dados não publicados) utilizou os mesmos primers que o utilizado neste trabalho, encontrando três substituições nucleotídicas em relação às amostras da UFSCar.

A taxa de substituição nucleotídica entre as seqüências foi estimada em 4,3% no presente trabalho, maior do que o valor encontrado para quatro seqüências nucleotídicas obtidas em duas subespécies de *Melipona quadrifasciata*, cujo valor foi estimado em 3.7% (SOUZA *et al.*, 2008).

**Tabela 3.** Substituições nucleotídicas encontradas para o fragmento de 485 pb do gene *cyt b* de *Partamona helleri* em relação aos ninhos coletados na UFSCar, USP-RP e USP-SP. Os asteriscos indicam as posições nas quais ocorreram alterações de aminoácidos.

Posições das bases	Ninhos			
	UFSCar 1 a 34	USP-SP 1 a 14	USP-RP 22, 24 e 25	USP-RP 23
55	C	C	C	T
114	T	T	C	T
147	C	C	T	C
169	T	T	C	T
184*	T	T	T	C
192*	T	T	A	A
195	T	T	C	T
228	A	A	T	A
231	C	C	T	T
249*	A	A	A	T
250	A	A	A	G
284	C	C	G	C
293*	A	A	T	A
297	A	A	A	T
300	T	T	C	T
309	T	T	T	A
310*	T	T	C	T
313*	A	A	G	A
327	C	C	T	T
340*	T	T	C	T
397*	A	G	A	A

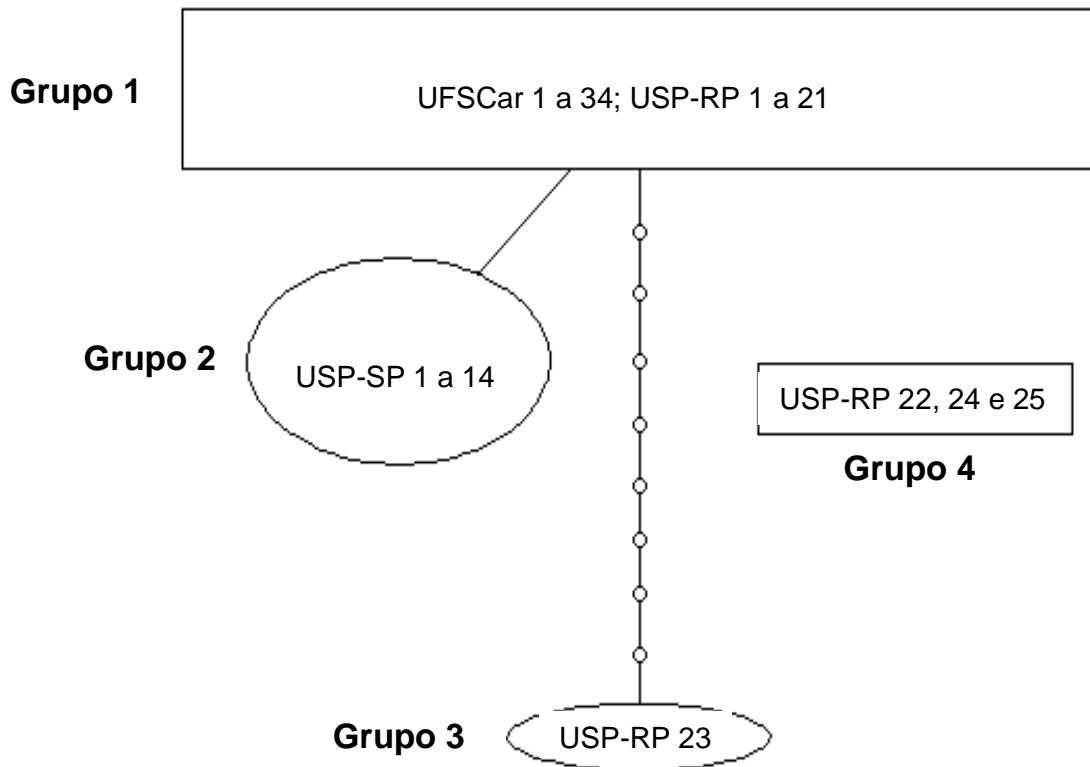
Segundo alinhamento estabelecido pelos dados disponíveis no NCBI (página de acesso na internet: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), o principal banco para armazenamento de seqüências de DNA e proteínas, a porcentagem de substituição nucleotídica verificada em quatro amostras de *Trigona carbonaria* oriundas da Austrália foi 1%. Em *Apis mellifera* essa estimativa alcançou 5,4%, considerando algumas seqüências distribuídas entre quatro subespécies dos

três principais ramos evolutivos de *Apis* e a variação entre as amostras seqüenciadas de uma subespécie (FERREIRA *et al.*, 2009).

Em contraste com estes trabalhos, no presente estudo foi analisado um número maior de seqüências provenientes de fêmeas coletadas em diferentes ninhos de *P. helleri* e os resultados obtidos corroboram o fato dessa região gênica ser menos conservada.

A análise de variância molecular (AMOVA) para *cyt b* considerando todos os ninhos coletados nos três Campi como um único grupo, atribuiu 68.16% da variação genética total a diferenças dentro de populações, ou seja, entre os ninhos de cada Campus analisado e 31.84% desta variação total a diferenças entre as populações analisadas. Como esperado, o valor de  $F_{st}$  obtido ( $F_{st} = 0.318$  e  $P = 0.000$ ) indicou estruturação entre os ninhos de *P. helleri* amostrados na UFSCar, USP-RP e USP-SP, pois os haplótipos têm a tendência de serem exclusivos de um dos três Campi estudados. Contudo, essa estruturação se deve principalmente ao haplótipos observados na USP-RP, como verificado pelos valores de  $F_{st}$  par a par.

A rede de haplótipos construída a partir de 73 seqüências nucleotídicas obtidas para *cyt b* permitiu distribuir essas seqüências entre quatro grupos distintos de haplótipos de acordo com a presença, ausência, número e tipo de substituições (Figura 10). Todas as amostras da UFSCar e 21 ninhos da USP-RP ficaram no grupo 1, que inclui o haplótipo mais comum e do qual os outros haplótipos devem ter se derivado. Ao grupo 2 pertencem as seqüências dos ninhos da USP-SP por diferir do grupo 1 em apenas um passo mutacional. No grupo 3 se encontra o ninho 23 da USP-RP que se diferencia do haplótipo basal pela presença de nove substituições de bases. O grupo 4 é formado pela



**Figura 10.** Rede de haplótipos construída a partir de 73 seqüências nucleotídicas obtidas para uma região do gene mitocondrial *cyt b* de *Partamona helleri*.

seqüência caracterizada nos ninhos 22 a 25 da USP-RP que, devido ao elevado número e ao tipo de mutações, não foi possível agrupar esta seqüência à rede.

A elevada porcentagem de substituições e a análise da rede de haplótipos indicavam que as amostras dos grupos 3 e 4 poderiam se tratar de uma espécie diferente de *P. helleri*. Dessa forma, algumas fêmeas dos ninhos 22, 23, 24 e 25 do Campus da USP-RP foram enviados para a Dra. Sílvia R. M. Pedro, que juntamente com o Dr. João M. F. Camargo realizaram uma ampla revisão no gênero *Partamona*, a fim de serem identificadas morfologicamente. Ao mesmo tempo, amostras de um destes ninhos (USP-RP 25) foram analisadas eletroforeticamente para sistemas alozímicos utilizando amostras de

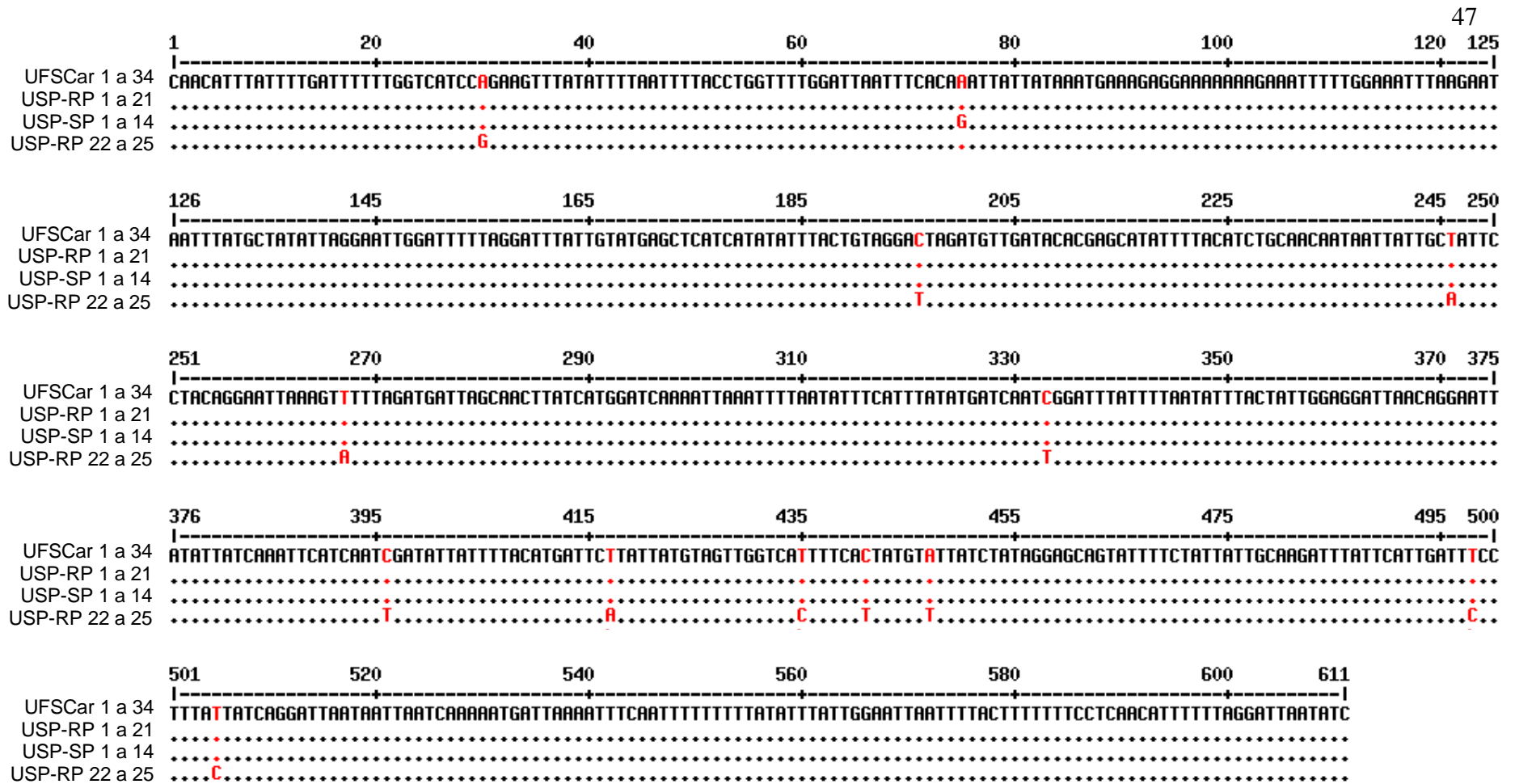
São Carlos como controle. Os resultados obtidos confirmaram que as fêmeas analisadas dos grupos 3 e 4 pertencem à espécie *P. helleri*.

O alinhamento das seqüências de parte do gene *COI* para 73 diferentes amostras de *P. helleri* coletadas na UFSCar, USP-RP e USP-SP pode ser verificado na Figura 11. As amostras provenientes da UFSCar apresentaram seqüências nucleotídicas idênticas que diferem do haplótipo obtido para USP-SP por uma alteração de base na posição 75 do fragmento. No Campus USP-RP foram verificados dois haplótipos para *COI*, um compartilhado com as amostras da UFSCar e um segundo haplótipo, verificado nos ninhos 22, 23, 24 e 25, que apresenta 12 substituições nucleotídicas.

Com relação às mutações pontuais, a região de estudo do gene *COI* apresentou quatro transversões (T↔A) e nove transições, sendo duas A↔G e sete T↔C (Tabela 4). A análise de restrição permitiu verificar a presença de um sítio de corte para a enzima *TaqI* na posição 396 e outro para *HinfI* na posição 498 em amostras da UFSCar e USP-RP, respectivamente, e nas seqüências analisadas da USP-SP foi detectado um sítio de restrição na posição 75 para *TsaI*. Outras diferenças foram verificadas nessa análise, principalmente nas amostras com maior número de substituições nucleotídicas; contudo, tais enzimas são pouco utilizadas e, por isso, não foram incluídas nos resultados.

As doze alterações de bases nitrogenadas em *COI*, ao contrário do observado para *cyt b*, não levaram a troca de aminoácidos na proteína formada, com base nos parâmetros estabelecidos para o DNA mitocondrial de *Apis mellifera* e *Melipona bicolor* que determina a leitura de códons tendo início no primeiro nucleotídeo da seqüência. Bergamo (dados não publicados) verificou treze diferentes substituições nucleotídicas em amostras de *P. helleri* de Minas





**Figura 11.** Alinhamento de seqüências nucleotídicas obtidas para *COI* de *P. helleri* relacionadas aos três haplótipos encontrados nos ninhos coletados na UFSCar, USP-RP e USP-SP. Os números escritos após o nome dos Campi se referem aos ninhos nos quais os haplótipos foram observados.

**Tabela 4.** Alterações nucleotídicas observadas para uma região do gene *COI* de *Partamona helleri* considerando os ninhos amostrados nos Campi UFSCar, USP-RP e USP-SP.

Posições das bases	Ninhos		
	UFSCar 1 a 34	USP-SP 1 a 14	USP-RP 22 a 25
30	A	A	G
75	A	G	A
196	C	C	T
246	T	T	A
267	T	T	A
333	C	C	T
396	C	C	T
417	T	T	A
435	C	C	T
441	C	C	T
447	A	A	T
498	T	T	C
505	T	T	C

Gerais em relação à seqüência caracterizada neste trabalho; no entanto, tais alterações não resultam em troca de aminoácidos. Portanto, se considerarmos a seqüência dos aminoácidos obtida nestes dois estudos (SP x MG), pode-se concluir que todas as colônias possuíam a mesma seqüência de aminoácidos, indicando alto grau de conservação funcional para essa região do gene em *Partamona helleri*.

Foi realizada também uma busca por seqüências nucleotídicas correspondentes à região estudada de *COI* para outras espécies de abelhas

sem ferrão no NCBI (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Várias seqüências foram obtidas e traduzidas para serem alinhadas com aquelas da UFSCar, USP-RP, USP-SP e Minas Gerais. Com base neste alinhamento, foi possível verificar que a seqüência de aminoácidos de *Partamona helleri* diferiu da espécie *Meliwillea bivea* em um único aminoácido na posição 22.

Os índices de diversidade nucleotídica estimados para o fragmento de *COI* indicaram baixa divergência entre as seqüências obtidas, provavelmente devido à freqüência do haplótipo UFSCar, encontrado na maioria das amostras analisadas (Tabela 5) e à presença de um haplótipo nos Campi UFSCar e USP-SP. Pelo fato do fragmento estudado para *COI* apresentar maior tamanho em pares de bases e variação similar, os valores de diversidade nucleotídica obtidos para esse gene foram menores em comparação com *cyt b*. Assim como verificado para *cyt b*, a região analisada do gene *COI* possui elevado conteúdo A/T; contudo, a terceira base mais freqüente foi guanina e não citosina como no primeiro gene citado. A proporção de bases entre os três haplótipos se manteve uniforme.

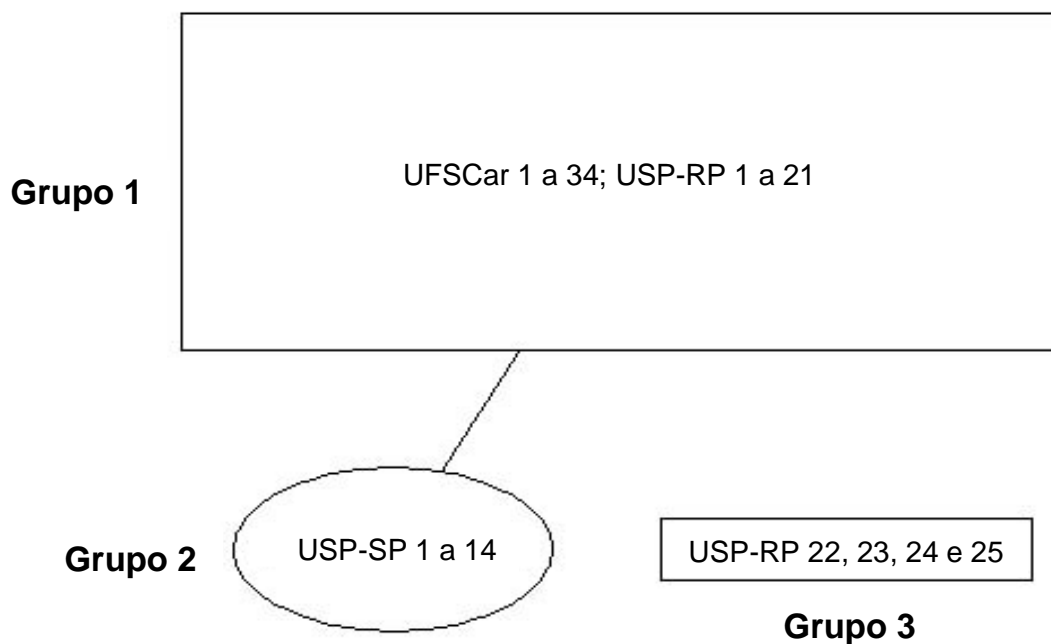
**Tabela 5.** Composição e diversidade nucleotídicas para o fragmento analisado do gene *COI* de *P. helleri* considerando os Campi da UFSCar, USP-RP e USP-SP.

Campi amostrados	Composição nucleotídica (%)				Diversidade nucleotídica (média por loco)
	T	A	G	C	
UFSCar	44.19	33.72	12.27	9.82	0.000000 ± 0.000000
USP-RP	44.16	33.74	12.30	9.79	0.005656 ± 0.003329
USP-SP	44.19	33.55	12.44	9.82	0.000000 ± 0.000000

A análise de variância molecular (AMOVA), considerando todas as amostras dos três Campi como um grupo, atribuiu 63.87% da variação genética total a diferenças dentro de populações e 36.13% a diferenças entre as populações dos três Campi analisados. O valor de  $F_{st}$  obtido ( $F_{st} = 0.361$ ;  $P = 0.000$ ) confirmou a estruturação populacional de *P. helleri* e como observado para *cyt b*, alguns haplótipos estão presentes em um dos três Campi estudados, principalmente na USP-RP onde ocorrem as seqüências com maior número de alterações.

A rede haplotípica formada pelas 73 seqüências nucleotídicas permitiu dividir as amostras em três grupos (Figura 12). No grupo 1 encontram-se todas as seqüências da UFSCar e 21 amostras da USP-RP que compartilham o mesmo haplótipo; este, por ser o mais freqüente, foi considerado basal com relação à seqüência encontrada nas abelhas coletadas na USP-SP, diferindo em uma substituição de base. Os ninhos USP-RP 22, USP-RP 23, USP-RP 24 e USP-RP 25 não foram agrupados devido ao tipo e número de alterações nucleotídicas, discordando em parte do resultado observado para *cyt b*, uma vez que o ninho USP-RP 23 foi agrupado com as demais amostras. Na tentativa de inclusão das amostras que foram mantidas em um grupo à parte, uma rede de haplótipos foi construída reunindo os dados de *cyt b* e *COI*, mas o resultado permaneceu inalterado.

As seqüências obtidas para os genes *cyt b* e *COI* de *P. helleri* no presente trabalho, foram alinhadas com seqüências encontradas no banco de dados do NCBI de outras espécies de abelhas sem ferrão. A análise dos alinhamentos resultantes evidenciou um número maior de substituições nucleotídicas entre e dentre as espécies analisadas para o fragmento de *cyt b*



**Figura 12.** Rede haplotípica construída para uma região contendo 611 pb do gene mitocondrial *COI* de *Partamona helleri* a partir de 73 seqüências nucleotídicas obtidas.

em comparação com *COI*, sugerindo que nos meliponídeos esses genes mitocondriais apresentam diferentes níveis de conservação, ou seja, o fragmento estudado do gene *COI* é mais conservado do que o *cyt b*. Em *P. helleri* a porcentagem de substituição de bases para *COI* foi estimada em 2% contra os 4.3% estimados para um fragmento menor de *cyt b*. Além disso, a maioria das mutações em *COI* ocorre na terceira base do códon, garantindo que a seqüência de aminoácidos da proteína permaneça idêntica, diferente do resultado obtido em *cyt b*, no qual a substituição de uma base no haplótipo da USP-SP leva à alteração de aminoácido. Ressalte-se, contudo, que as duas regiões gênicas possuem o elevado conteúdo de A/T característico do DNA mitocondrial de *Apis mellifera*.

Quatro haplótipos foram identificados, sendo um compartilhado e três exclusivos, para os genes *cyt b* e *COI* de *P. helleri*. As análises de variância

molecular para os dois genes indicaram certo nível de diferenciação entre os três Campi estudados. Ao analisar ninhos de *P. helleri* coletados em Viçosa e quatro cidades vizinhas, Bergamo (dados não publicados) verificou seis haplótipos para fragmentos correspondentes de *cyt b* e *COI*, sendo alguns compartilhados entre as cidades e outros encontrados apenas em uma das localidades, confirmando a estruturação entre estas populações. Segundo a autora, mediante mutações ocorridas no haplótipo ancestral teriam se originado os demais haplótipos em um período recente; no decorrer do processo de colonização da cidade de Viçosa e seu entorno via enxameagem, as poucas fêmeas contendo esses haplótipos, incluindo o ancestral, disputaram por recursos e machos e colonizaram toda a área, contribuindo para produzir a estruturação genética das populações da espécie.

Análises citogenéticas dos cromossomos B em populações de *P. helleri* coletadas nas cidades de Cravolândia e Jequié (Bahia) revelaram a ocorrência de diferenciação geográfica na espécie, pois as populações estudadas apresentaram um grande cromossomo B acrocêntrico totalmente heterocromático em Jequié e parcialmente eucromático na cidade de Cravolândia, distinto dos outros cromossomos B descritos para *P. helleri* (MARTINS *et al.*, 2009).

Brito (2005) analisou quatro regiões do DNA mitocondrial via RFLP-PCR de várias colônias de *P. helleri* coletadas em quase toda a área de distribuição e verificou compartilhamento de haplótipos e acentuada estruturação entre as populações, indicando que estas estiveram interligadas no passado e se isolaram em determinados locais pela fragmentação da Mata Atlântica durante os períodos de glaciação do Pleistoceno.

O processo de diferenciação genética por isolamento geográfico parece não ser exclusivo das populações de *P. helleri*, uma vez que várias pesquisas envolvendo a utilização de marcadores genéticos como alozimas, microssatélites, RAPD, RFLP e análise citogenética estabeleceram sua ocorrência em diferentes populações de outras espécies de abelhas sem ferrão, entre elas: *Melipona quadrifasciata*, *Melipona mandacaia*, *Melipona rufiventris*, *Melipona subnutida*, *Plebeia remota*, *Scaptotrigona xanthotricha*, *Frieseomelitta varia* e *Nannotrigona testaceicornes* (TORRES *et al.*, 2009; WERNECK, 2008; TAVARES *et al.*, 2007; CRUZ *et al.*, 2006; FRANCISCO, 2002; DUARTE *et al.*, 2009; BATALHA-FILHO *et al.*, 2009; GONÇALVES, 2010; ASSIS, 2010).

Os autores destes trabalhos citam outros fatores que poderiam estar impedindo o fluxo gênico entre as populações de diferentes espécies de meliponídeos, ocasionando uma recente divergência genética. As possíveis explicações estariam relacionadas à preferência por locais de nidificação ou isolamento associados à fragmentação do habitat natural dessas abelhas e à baixa capacidade de dispersão relacionada ao tamanho corporal (espécies pequenas voam distâncias menores).

O fato do DNA mitocondrial apresentar herança materna faz com que este se torne uma importante ferramenta em estudos que tem como objetivo principal estimar o número de fêmeas fundadoras, como no caso da população de *Partamona helleri* encontrada nos Campi da UFSCar e da USP.

Dessa forma, a variação produzida pelas mutações nos genes *cyt b* e *COI* de *P. helleri* foi observada somente nos dois Campi da USP, uma vez que todas as amostras da UFSCar apresentaram a mesma seqüência nucleotídica.

Este fato comprova que a colonização dos Campi UFSCar e USP-SP foi estabelecida via enxameagem por um pequeno grupo de fêmeas, ou de uma única linhagem materna para cada Campus. Aparentemente, este fato não teria ocorrido durante a colonização do Campus USP de Ribeirão Preto, pois a presença de três haplótipos indica que, pelo menos, três linhagens maternas colonizaram a área. No entanto, a presença de haplótipos distintos no Campus USP-RP pode ser explicada pela introdução de colônias coletadas em outras áreas naturais e, portanto, envolvendo fêmeas de outras linhagens maternas. A introdução de colônias de meliponídeos neste campus tem sido comum ao longo dos anos, desde que o “apiário” da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto foi implantado nos anos 70 (Soares AEE, informação pessoal). Devido ao elevado número de substituições nucleotídicas, pode-se supor que as colônias mencionadas da USP-RP tenham sido trazidas de uma região distante. Este fato justificaria a não detecção de haplótipos intermediários entre os aqui caracterizados, produzindo o grande gap na árvore de haplótipos.

Taura e Laroca (2001) analisaram o Passeio Público localizado no centro da cidade de Curitiba quanto às abelhas ali encontradas e verificaram que algumas colônias de *Plebeia emerina* ocorriam em número abaixo do proposto por Kerr e Vencovski (1982) e Kerr (1985, 1987a). Nestes trabalhos, estes autores postulam que o número mínimo deve estar entre 40-44 colônias para a garantia da viabilidade de uma população local de meliponídeos, bem como a necessidade de se introduzir periodicamente uma rainha inseminada para evitar a redução da variabilidade genética. Os dados obtidos neste trabalho não sustentam esta proposição; ao contrário, dão algum embasamento genético à suposição de Nogueira-Neto (1997) que relata a



existência de um número muito pequeno de colônias na natureza para certas espécies de meliponídeos e a impossibilidade de se manter uma criação de abelhas em muitos lugares devido à necessidade de 44 colônias (ver ainda ALVES *et al.*, 2010).

Diante da nova visão de que certa área pode ser colonizada por um número reduzido de fêmeas, as estratégias de manejo e utilização sustentável de abelhas como agentes polinizadores devem ser repensadas. Um dos principais fatores que dificultam a criação e conservação sustentável de sistemas de polinizadores via abelhas sem ferrão é a necessidade de se obter um grande número de colônias para manter a estabilidade genética (LORENZON *et al.*, 2006; HEARD, 1999; SLAA *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-ACERETO *et al.*, 2006).

Nossos achados indicam que a criação racional de espécies de meliponídeos é altamente viável já que estas abelhas devem ter mecanismos não conhecidos para contornar as dificuldades impostas pelo mecanismo peculiar de determinação do sexo nos himenópteros.

#### 4.2.2. Análise de Microssatélites

Com relação aos resultados obtidos para os microssatélites utilizando primers heterólogos, verificou-se que seis dos dezoito locos testados não amplificaram - Tc3.32, Tc3.56, Mbi33, Mbi256, Mbi259 e Mbi305. Dentre os doze locos amplificados, oito mostraram-se monomórficos (Tc3.302, T4-171, Mbi11, Mbi28, Mbi32, Mbi201, Mbi218, e Mbi522), devido ao número reduzido de localidades amostradas ou ao emprego de primers delineados para outras espécies. Estes locos heterólogos geralmente revelam um menor número de alelos que seu uso na espécie original pela ocorrência de homoplasias e alelos nulos. Os locos Mbi232, Mbi254, Mbi215 e Mbi278, desenvolvidos para *Melipona bicolor*, apresentaram mais de um alelo e, portanto, foram considerados polimórficos.

Os doze microssatélites amplificados compreendem repetições perfeitas de di ou trinucleotídeos de acordo com dados de seqüenciamento (BRITO, 2005), que testou todos estes locos e mais alguns microssatélites delineados para *Apis mellifera* nas amostras de *P. helleri* coletadas em cinco estados do país, verificando polimorfismo nos locos Mbi215, Mbi278 e T4-171 nos ninhos estudados de São Paulo. Como visto anteriormente, o loco T4-171 não apresentou variação para as amostras analisadas neste trabalho, incluindo aquelas oriundas da USP-SP.

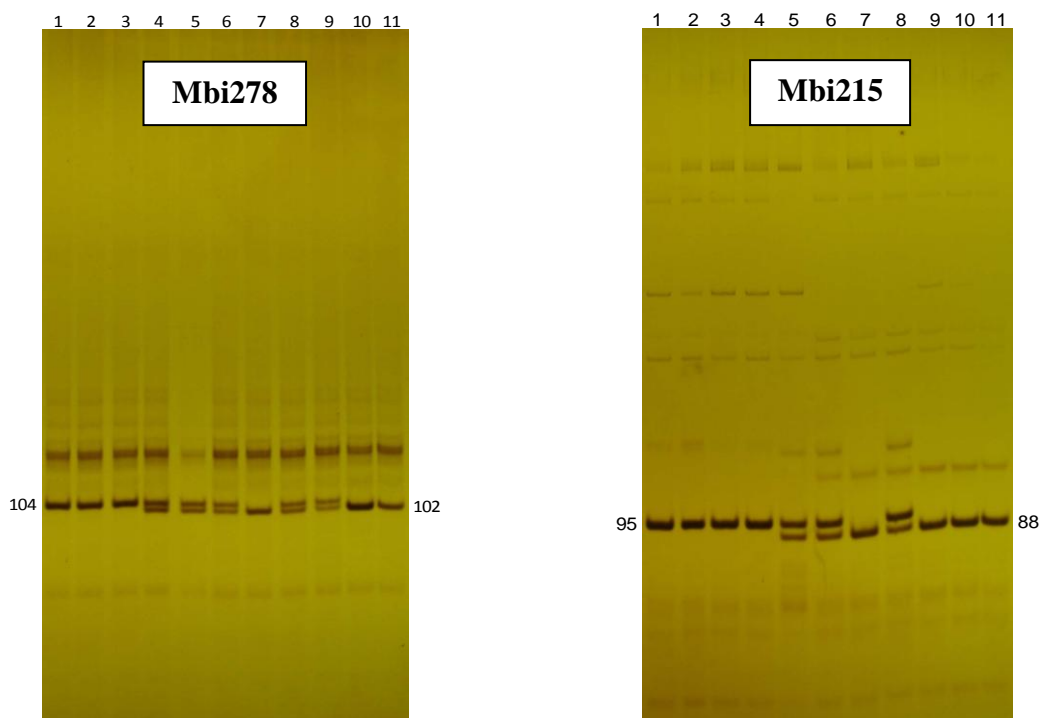
Borges (2007) selecionou inicialmente dez pares de primers delineados para *Melipona bicolor* para amplificação nas colônias de *P. helleri* amostradas em diferentes cidades do Estado de Minas Gerais e observou variação nos locos Mbi32, Mbi254, Mbi215 e Mbi278.

As autoras dos dois trabalhos acima referidos atribuíram a baixa variabilidade genética em número de locos e alelos encontrada nas populações estudadas, menor do que aquela observada neste trabalho, à utilização de primers heterólogos para amplificação dos microssatélites e destacam a importância do desenvolvimento de primers homoespecíficos para *P. helleri* permitindo a obtenção de resultados mais coerentes.

Os locos Mbi215 e Mbi278 no presente trabalho apresentaram somente dois alelos para as colônias de *P. helleri* coletadas nos Campi da UFSCar e USP (Figura 13), como verificado por Brito (2005) e Borges (2007) no estudo de diferentes populações de *P. helleri* coletadas em diversos Estados brasileiros. Para *Melipona bicolor* estes locos apresentavam 3 e 5 alelos, respectivamente (PETERS *et al.*, 1999); contudo, o mesmo não foi observado para outras espécies do gênero - a maioria dos dados obtidos revelou dois alelos para Mbi215 e uma variação maior em número de alelos para Mbi278 (WERNECK, 2008; TÓTH *et al.*, 2002).

As freqüências alélicas obtidas para Mbi215 e Mbi278 indicaram que os alelos 95 e 104, respectivamente, foram os mais freqüentes entre os ninhos das localidades analisadas, tendo o loco Mbi215 apresentado as maiores diferenças a respeito das freqüências, principalmente no Campus da USP-RP (Anexo 2).

Para Mbi232, inicialmente foram identificados 9 alelos em géis de poliacrilamida 9% não desnaturante com tamanhos variando entre 110 e 170 pb, aproximadamente. Contudo, a utilização de primers marcados com fluoróforos e a detecção do produto gerado em seqüenciador automático permitiram distinguir 15 alelos com tamanhos entre 136 a 184 pares de bases.



**Figura 13.** Variação fenotípica detectada para os microssatélites Mbi278 e Mbi215 em operárias adultas de *Partamona helleri* provenientes de diferentes ninhos coletados na UFSCar, USP de São Paulo e Ribeirão Preto. O tamanho dos alelos em pares de bases foi descrito por Brito (2005).

A diferença no número de alelos verificada entre as duas técnicas para visualização de microssatélites pode ser explicada pelo fato dos géis de poli-acrilamida não conseguirem separar os alelos que continham de duas até seis bases de diferenças.

Quanto à distribuição dos alelos observados para Mbi232 entre UFSCar, USP-SP e USP-RP, pode-se verificar que somente três alelos (136, 151, 154, 163 e 169) estiveram presentes em todas as localidades estudadas e que as duas primeiras apresentaram a maior variação em número de alelos. Além disso, na UFSCar e USP-SP foram observados três alelos exclusivos para cada Campus, em comparação com a USP-RP que compartilhou alelos com os dois outros Campi. Os estudos realizados utilizando a análise do loco Mbi232

em outras espécies de abelhas sem ferrão não revelaram tantos alelos como neste trabalho, incluindo a espécie *Melipona bicolor* para a qual os primers foram delineados (PETERS *et al.*, 1999<sup>a</sup>; TAVARES *et al.*, 2007; SILVA, 2007). Tóth *et al.* (2002) ao analisarem a abelha *Tetragona clavipes* encontraram cerca de oito alelos para o loco em questão. Este fato deve estar associado ao método utilizado neste trabalho para caracterizar os alelos (mediante seqüenciador).

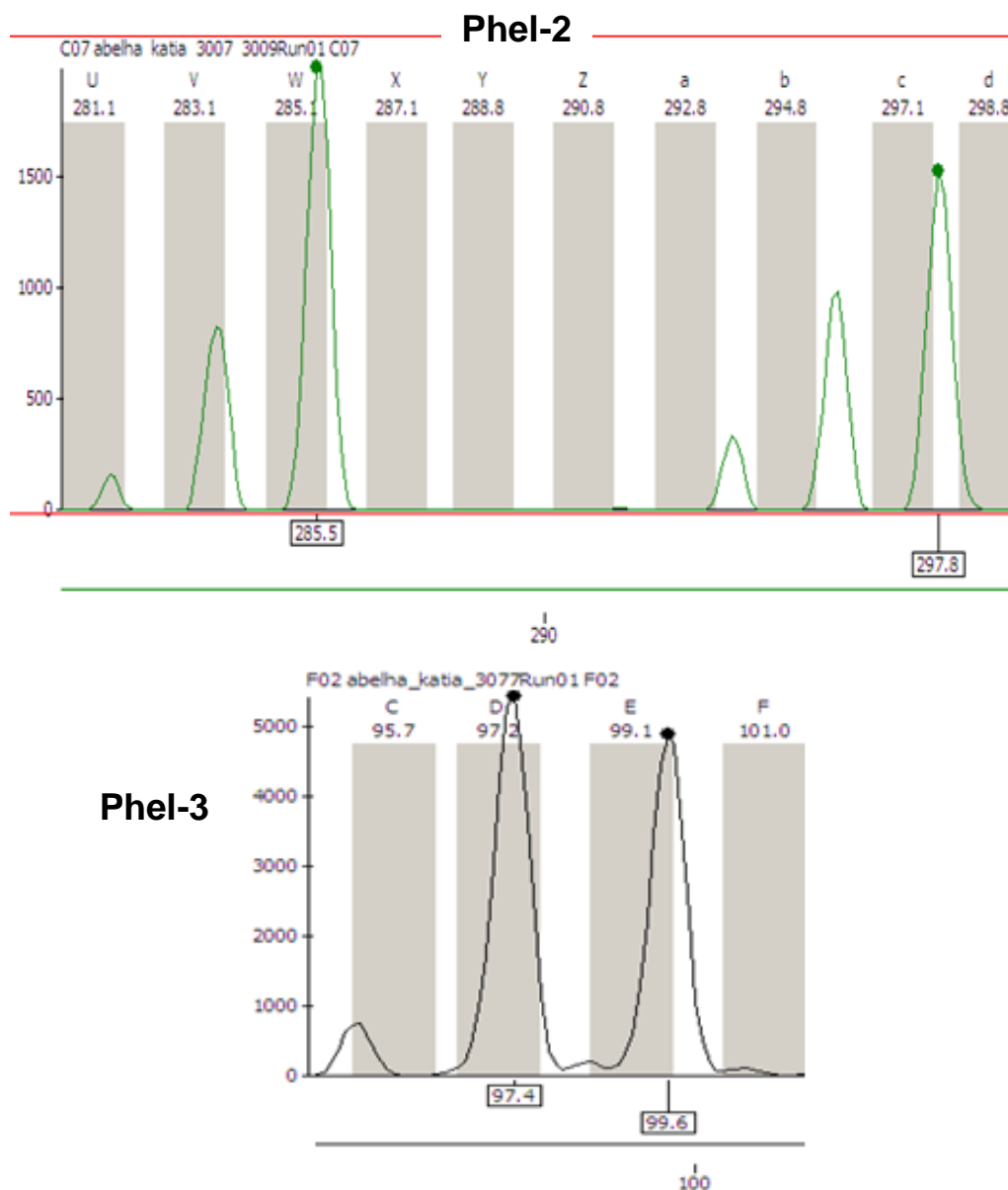
Da mesma forma que o loco Mbi232, o microssatélite Mbi254 foi inicialmente fenotipado em gel de poliacrilamida, tendo sido verificados cinco alelos, com tamanhos entre 230 e 190 pb. Contudo, a retipagem das amostras para Mbi254 utilizando seqüenciador automático permitiu identificar oito alelos com tamanhos entre 211 e 238 pares de bases. Com exceção dos alelos 217, 232 e 238 observados nas três áreas estudadas e do alelo 211 que foi considerado exclusivo do Campus UFSCar, os demais alelos foram compartilhados por ao menos duas áreas estudadas. O número de alelos observados neste trabalho foi maior que o encontrado para outros meliponídeos (PETERS *et al.*, 1999<sup>a</sup>; TAVARES *et al.*, 2007), provavelmente relacionado à metodologia empregada para a identificação dos alelos.

Bergamo (dados não publicados), analisando fêmeas de *P. helleri* coletadas de ninhos originários da cidade de Viçosa e região, observou que os locos Mbi215 e Mbi278 possuíam os mesmo alelos que os detectados no presente trabalho. Todavia, a autora encontrou maior número de alelos nos locos Mbi232 e 254 (17 e 10 alelos, respectivamente) que os identificados em fêmeas dos ninhos da UFSCar, USP-SP e USP-RP. Este achado pode estar associado à abrangência das áreas estudadas nos dois estudos.

Com relação aos microssatélites dinucleotídicos prospectados especificamente para *P. helleri* (Figura 14), pode-se verificar que todos os locos amplificaram e que um número maior de alelos foi observado para Phel-2, seguido pelos locos Phel-1, Phel-4, Phel-5, Phel-3, Phel-6 e Phel-7, respectivamente (Anexo 2). O microssatélite Phel-1 mostrou-se monomórfico na amostra da USP-RP. O Campus da USP-SP apresentou 8 alelos exclusivos para quatro locos (Phel-1, Phel-2, Phel-5 e Phel-6), enquanto a população USP-RP apresentou o menor número de alelos exclusivos, sendo um alelo para o loco Phel-2 e outro para Phel-3. Na área do Campus UFSCar foi observado um alelo exclusivo para Phel-2, Phel-3 e Phel-5, totalizando três alelos privativos. Além disso, com exceção de Phel-2 e Phel-7, que apresentaram dois alelos mais freqüentes nos três Campi estudados, nos outros cinco locos microssatélites amplificados apenas um alelo diferente em cada loco foi o mais freqüente nas áreas de estudo deste trabalho (Anexo 2).

O baixo número de locos obtidos a partir do seqüenciamento de 96 clones positivos isolados durante o processo para a obtenção da biblioteca genômica de microssatélites pode estar relacionado a alguns fatores como a qualidade reduzida de várias seqüências analisadas, o seqüenciamento de clones idênticos selecionados ao acaso e pelo fato das seqüências repetitivas estarem muito próximas de uma das extremidades, dificultando o delineamento de primers.

A análise dos locos microssatélites demonstrou que as populações dos Campi UFSCar e USP-SP se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para os locos Mbi215, Mbi278, Mbi254, Phel-1, Phel-2 e Phel-7; por outro lado, USP-RP mostrou-se em equilíbrio genético para todos os locos



**Figura 14.** Eletroferogramas dos locos Phel-2 (alelos 285 e 297) e Phel-3 (alelos 97 e 99) de fêmeas *P. helleri*, para ilustrar a visualização dos alelos submetidos à análise em MegaBACE™ 1000.

microsatélites estudados (Tabela 6). Contudo, se considerarmos nas análises para HWE uma ou outra operária aleatoriamente escolhida dentre as duas analisadas por ninho, verificamos que algumas re-amostragens nas três localidades passam a estar em equilíbrio para todos os locos estudados, o que sugere que a estrutura familiar dos dados, como a presença de alelos em alguns locos em frequência muito baixas em determinada área estudada,

**Tabela 6.** Número de indivíduos analisados por localidade (N), número de alelos (Na) e alelos efetivos (Ne), heterozigosidades observadas (Ho), esperadas (He) e média (H), índice de fixação (F) e valores de  $\chi^2$  para equilíbrio de Hardy Weinberg (HWE) estimados para os ninhos de *P. helleri* coletados nos Campi da UFSCar, USP-RP e USP-SP. Em vermelho e com asteriscos se encontram os locos que não estão em HWE.

Localidades		Mbi 232	Mbi 254	Mbi 215	Mbi 278	Phel-1	Phel-2	Phel-3	Phel-4	Phel-5	Phel-6	Phel-7
UFSCar H = 0.449±0.079	N	66	66	66	66	65	66	60	65	60	66	63
	Na	11	8	2	2	4	5	3	3	4	3	3
	Ne	4.125	5.574	1.658	1.993	1.563	3.108	1.164	1.115	1.897	1.079	2.806
	Ho	0.758	0.788	0.455	0.515	0.338	0.773	0.117	0.046	0.567	0.076	0.667
	He	0.758	0.821	0.397	0.498	0.360	0.678	0.141	0.103	0.473	0.074	0.644
	F	0	0.040	-0.146	-0.034	0.061	-0.139	0.171	0.552	-0.198	-0.030	-0.036
	$\chi^2$ HWE	99.477*	20.603	1.404	0.077	5.148	10.060	3.592	40.793*	6.522	0.102	1.893
USP-RP H = 0.363±0.091	N	50	50	49	49	50	49	44	49	50	50	50
	Na	7	4	2	2	1	5	2	4	3	2	3
	Ne	4.591	3.695	1.042	1.997	1.000	3.531	1.023	1.721	1.373	1.062	1.859
	Ho	0.800	0.820	0.041	0.633	0	0.714	0.023	0.408	0.320	0.060	0.520
	He	0.782	0.729	0.040	0.499	0	0.717	0.022	0.419	0.272	0.058	0.462
	F	-0.023	-0.124	-0.021	-0.267	0	0.003	-0.011	0.025	-0.177	-0.031	-0.125
	$\chi^2$ HWE	37.888	8.749	0.021	3.504	0	6.716	0.006	1.270	1.814	0.048	1.661
USP-SP H = 0.530±0.063	N	27	28	27	27	28	28	22	27	27	28	27
	Na	11	6	2	2	6	9	2	5	3	4	4
	Ne	7.327	3.900	1.906	1.934	2.187	5.026	1.252	1.674	2.006	1.347	2.282
	Ho	0.926	0.679	0.556	0.519	0.393	0.714	0.045	0.481	0.704	0.214	0.407
	He	0.864	0.744	0.475	0.483	0.543	0.801	0.201	0.403	0.501	0.258	0.562
	F	-0.072	0.087	-0.169	-0.074	0.276	0.108	0.774	-0.196	-0.404	0.168	0.275
	$\chi^2$ HWE	58.827	24.363	0.770	0.147	14.423	28.255	13.192*	2.714	9.921	27.028*	9.057



pode produzir resultados distintos. Algumas amostras verificadas nos três Campi inicialmente não amplificaram para determinado loco, o que justifica a ligeira diferença no número de indivíduos analisados (N) para cada microssatélite (Tabela 6). Estas amostras serão reamplificadas para complementar os resultados obtidos.

As populações de *P. helleri* pertencentes aos Campi da UFSCar, USP-RP e USP-SP exibiram heterozigosidades médias semelhantes de acordo com os valores de t (Tabela 7). Este achado, à primeira vista, contraria o fato de que neste local ocorreu introdução deliberada de colônias de outras regiões, hipótese aventada anteriormente para justificar a detecção ali de um maior número de haplótipos mitocondriais altamente diferenciados dos demais. Nesse caso, seria esperado que esta introdução resultasse em maior número de alelos, já que as colônias “estranhas” poderiam conter alelos privativos de seu sítio de origem. A aparente contradição entre estes resultados ainda merecerá uma investigação posterior.

**Tabela 7.** Valores de t e significância (P) obtidos na comparação entre as heterozigosidades médias das três populações de *Partamona helleri* estudadas.

Combinações	t	P
UFSCar x USP-SP	0.8968	0.1902
UFSCar x USP-RP	- 0.7032	0.2450
USP-SP x USP-RP	- 1.5309	0.0707

Valores negativos do coeficiente de endogamia (Fis), indicando excesso de indivíduos heterozigotos, foram observados em vários locos polimórficos analisados para as amostras de *P. helleri* coletadas nas três áreas de estudo. No entanto, estes valores não foram estatisticamente significantes na maioria dos casos. Os locos, Phel-1 e Phel-3 indicaram algum nível de endogamia, com valores de P significativos; no entanto, o valor médio de Fis obtido considerando todos os locos não foi estatisticamente significativo (Tabela 8).

**Tabela 8.** Valores obtidos para estatística-F e sua significância (P) considerando cada loco microssatélite estudado e o valor médio em amostras de *P. helleri* coletadas em três áreas.

Locos	Fis		Fst		Fit	
	Valor	P	Valor	P	Valor	P
<i>Mbi 232</i>	-0,012	0,686	0,110	0,001	0,099	0,003
<i>Mbi 254</i>	0,006	0,483	0,106	0,001	0,111	0,002
<i>Mbi 215</i>	-0,135	0,909	0,176	0,001	0,065	0,209
<i>Mbi 278</i>	-0,110	0,917	0,000	0,380	-0,110	0,906
<i>Phel-1</i>	0,154	0,024	0,134	0,001	0,268	0,001
<i>Phel-2</i>	-0,025	0,722	0,080	0,001	0,056	0,091
<i>Phel-3</i>	0,312	0,006	0,023	0,060	0,327	0,003
<i>Phel-4</i>	0,064	0,209	0,100	0,001	0,158	0,005
<i>Phel-5</i>	-0,219	1,000	0,044	0,006	-0,165	0,994
<i>Phel-6</i>	0,076	0,225	0,028	0,011	0,101	0,029
<i>Phel-7</i>	0,008	0,461	0,298	0,001	0,304	0,001
<b>Média</b>	-0,021	0,877	0,119	0,001	0,101	0,001

Resultados similares quanto à ausência de HWE e valores negativos de Fis para algumas populações foram verificadas em amostras de *P. helleri* coletadas em Viçosa e cidades próximas (Bergamo dados não publicados; BORGES, 2007).

A análise de variância molecular (AMOVA) atribuiu 88,1% da variação observada nos locos microssatélites a diferenças dentro de populações (entre indivíduos) e 11,9% a diferenças entre populações. O valor de Fst obtido (Fst = 0,119; P = 0,001) indica estruturação genética significativa entre os três Campi estudados decorrente da presença de alelos privados e freqüências distintas dos alelos de cada loco nestas populações. O teste de atribuição, ao identificar corretamente a população de origem de 97% das operárias analisadas, contribuiu para corroborar a estruturação estatisticamente significativa apontada pelo valor do Fst.

Valor significativo do Fst estimado a partir da análise de locos microssatélites heterólogos também foi reportado para populações de *P. helleri* amostradas em cinco cidades do Estado de Minas Gerais, indicando que estas populações eram geneticamente estruturadas (BORGES, 2007).

A diferença entre os valores de Fst estimados pelos genes mitocondriais estudados (*cyt b* e *COI*) e pelo DNA nuclear (microssatélites), ou seja, o grau de estruturação verificado entre os sítios de estudo foi maior para o DNA mitocondrial que para os locos microssatélites. Este resultado pode ser justificado se postularmos que ocorre dispersão sexo assimétrica na espécie, na qual as fêmeas são colonizadoras e os machos constituem o sexo dispensor. No entanto, os valores do Fst mitocondrial x Fst nuclear não são diretamente comparáveis. Como resultado dos diferentes modos de herança do DNA mitocondrial (haplóide e

uniparental) e do DNA microssatélite (diplóide e biparental), um nível quatro vezes maior de estruturação genética é esperado para o DNA mitocondrial (PALUMBI *et al.*, 2001; ver HUDSON & TURELLI, 2003 para uma posição contrária). Segundo esta regra, a razão da divergência do DNA mitocondrial para o DNA nuclear deve ser aproximadamente quatro, permanecendo iguais todas as demais condições. Portanto, comparando os valores do *Fst* estimado a partir dos genes *cit b* e *COI* (*Fst* = 31,8%; *Fst* = 36,7%, respectivamente) e dos locos microssatélites (11,9%), verifica-se que eles são similares se a regra acima for considerada. Esta similaridade nos permite concluir que não há indícios de dispersão sexo-assimétrica, isto é, os machos de *Partamona helleri* não são dotados de uma capacidade de dispersão muito maior que as fêmeas.

Esta conclusão vai ao encontro de dados da literatura que estabelecem que os machos de várias espécies de meliponídeos têm um raio de vôo limitado. Por exemplo, Kerr *et al.* (1962) demonstraram que os machos de *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 apresentaram um raio de vôo de pouco mais de 600 metros. Resultado semelhante foi reportado por Carvalho-Zilse e Kerr (2004); estes autores verificaram que a maioria dos machos marcados de *Melipona scutellaris* apresentou vôo limitado a 800 metros.

A reprodução (divisão) da colônia eusocial das espécies de meliponídeos se dá pela enxameação. Neste processo, o vínculo entre a colônia-filha e a colônia-mãe permanece por certo tempo, uma vez que a colônia-mãe provê recursos (cera e alimentos) que serão transportados para o novo sítio de nidificação (NOGUEIRA-NETO, 1954; KERR, 1987b). Desta forma, as fêmeas

reprodutivas não se dispersam muito durante a formação de novas colônias (ENGELS & IMPERATRIZ-FONSECA, 1990).

Por seu turno, os machos formam agrupamentos próximos a colônias órfãs na tentativa de copular com alguma rainha virgem presente no local (KERR *et al.*, 1996). A existência destes aglomerados de machos próximos às colônias órfãs faz com que as rainhas sejam fecundadas, na maioria das vezes, logo após saírem da colônia. Desta forma, a dispersão das colônias fica limitada pelo pequeno raio de vôo dos machos, em busca das rainhas virgens, e do raio de ocupação de um novo sítio de nidificação por ocasião dos eventos de enxameação. A subestruturação populacional, portanto, é a resultante esperada para todas as espécies de meliponídeos submetidas a tais condições. Como a reprodução das colônias de meliponídeos se dá pela enxameação, um panorama distinto do aqui delineado só será possível em espécies em que os machos apresentem elevada capacidade de dispersão. Nesta situação, esperar-se-á forte estruturação para os genes mitocondriais, mas baixa estruturação para os genes nucleares, caracterizando a condição de dispersão sexo-assimétrica já referida.

As abelhas são insetos de porte geralmente pequeno e vôo rápido; portanto, são insetos difíceis de marcar e monitorar diretamente. Neste caso, análises da genética populacional são importante ferramenta (às vezes, única – por exemplo, em espécies raras) para investigar a conectividade e dispersão populacionais e para a identificação apropriada das unidades de manejo como auxílio à conservação (FRANKHAM *et al.*, 2002; WAPLES & GAGGIOTTI, 2006; PALSBOLL *et al.*, 2007). Portanto análises similares devem ser estendidas a

outras espécies de meliponídeos e grupos de abelhas para que se possa estimar indiretamente o poder dispersor dos machos destas espécies.

As análises realizadas neste trabalho devem ser estendidas a amostras de *P. helleri* de outras áreas da distribuição da espécie para confirmar os dados aqui descritos, já que os achados, se confirmados, têm sérias implicações para os esforços de conservação e utilização sustentável da espécie, como veremos em Considerações Finais.

### 4.3. Genética Familiar

No estudo familiar, foram considerados os dados obtidos de 59 ninhos em que 10 ou mais operárias foram analisadas para os locos Mbi232 e Mbi254. Todas as operárias das colônias analisadas apresentaram um alelo comum herdado do macho parental, como esperado para a hipótese de monandria. Dessa forma, os resultados referentes à segregação alélica intranidal demonstraram que em *Partamona helleri* apenas um macho fecunda a rainha (Tabela 9). Corroborando esse resultado, nos locos espécie-específicos as duas fêmeas adultas analisadas apresentaram no máximo três alelos diferentes.

Em dois ninhos (UFSCar 12 e USP-RP 10) de *P. helleri* foi verificada uma operária com combinação de alelos diferente dos demais indivíduos analisados nas respectivas colônias. Provavelmente, estas fêmeas se encontravam fora do ninho original (“worker drifting”, um evento não incomum em meliponídeos). Esta interpretação está de acordo com achados em ninhos da UFSCar, nos quais os genótipos “inesperados” apresentados por operárias foram detectados em colônias adjacentes. Este fato pode ter ocorrido igualmente nos os ninhos dos Campi USP-SP e USP-RP.

Em alguns ninhos estudados uma segregação fenotípica diferente de 1:1 foi observada para um ou mais locos analisados. Este resultado, provavelmente, pode ser devido à recente substituição de rainha, evento facilmente demonstrável se uma nova coleta é realizada em seguida (o que não foi feito aqui). Segundo Velthuis *et al.* (2006), enquanto as rainhas de diversas espécies de abelhas sem ferrão vivem, aproximadamente, de um a três anos, suas colônias podem sobreviver por décadas. Os períodos de transição, caracterizados pela presença

**Tabela 9.** Exemplo de segregação alélica de operárias provenientes de alguns ninhos de *P. helleri* coletados nos Campi da UFSCar, USP-RP e USP-SP considerando os locos Mbi232 e Mbi254.

Ninhos	Locos			
	Mbi232		Mbi254	
UFSCar 13	151/172 8	151/139 10	217/217 11	214/217 7
UFSCar 31	163/136 6	136/139 5	232/217 5	323/214 6
UFSCar 29	151/160 11		211/217 5	211/214 6
UFSCar 19	136/136 9	163/136 8	226/214 7	226/211 11
UFSCar 15	166/163 6	163/163 9	232/211 7	232/238 8
USP-RP 15	163/169 15		226/217 15	
USP-RP 24	151/169 15		217/232 7	217/226 8
USP-SP 3	136/184 15		229/235 8	229/232 7

de duas rainhas ovipositando em um ninho têm sido encontrados em alguns meliponídeos e ocorrem devido à perda da rainha por idade ou doença, ou seja, durante o processo de substituição da mesma. Dessa forma, a poliginia é somente um processo temporário nestas abelhas, ao contrário da espécie *Melipona bicolor* que apresenta poliginia facultativa, ou seja, algumas colônias possuem condições



de poliginia duradoura e natural e outras não determinadas pela sua dinâmica populacional (APONTE, 2003).

Brito (2005) verificou a ocorrência de monoandria e poliandria ao estudar 47 colônias de *Partamona helleri* provenientes das regiões Nordeste, Sudeste e Sul, incluindo amostras do Campus da USP-SP. A análise de seis sistemas aloenzimáticos revelou que dois destes apresentavam variação (Idh e Mdh) para as abelhas da espécie *P. helleri* (FALCÃO & CONTEL, 1981). Em outro estudo utilizando as aloenzimas Idh e Mdh em amostras *P. helleri* coletadas em Ribeirão Preto (SP), foi sugerido que as colônias desta espécie eram ou poligínicas ou poliândricas (CONTEL *et al.*, 1992). Contrariando estes achados, os nossos resultados têm robustez para se poder afirmar que as progênes analisadas podem ser atribuídas a uma rainha que se acasala com um único macho, isto é, a estrutura familiar destas colônias é monogínica-monândrica.

O comportamento de acasalamento ainda é uma questão em aberto para muitos meliponídeos. Segundo Paxton (2005), existem poucas informações referentes à análise genética da mãe e sua descendência para várias espécies de abelhas. Entre as questões que requerem uma resposta consistente podem ser mencionadas: como, quando, onde e quantas vezes as fêmeas se acasalam? Além disso, é preciso avaliar se a manutenção de colônias em meliponários não interfere no comportamento reprodutivo destas espécies. Esta suposição poderá ser investigada analisando progênes de colônias naturais, isto é, amostras retiradas diretamente de colônias da natureza, e de colônias mantidas em meliponários.

É importante verificar a presença de acasalamento múltiplo ou simples entre as diversas espécies de abelhas, pois esta informação está relacionada ao processo evolutivo da socialidade em abelhas - as relações de parentesco entre rainhas e operárias que interferem na maternidade dos machos da colônia e nas adaptações pertinentes ao forrageamento (STRASSMANN, 2001). De acordo com Hughes *et al.* (2008) a monandria está associada à totipotência reprodutiva das operárias e foi o estado ancestral quando a eusocialidade se originou em formigas, vespas e abelhas. Além disso, comparada à situação de poliandria da fêmea, a monandria impõe um custo adicional a estas espécies – a menor variação genética intra-colonial.

## 5. Considerações Finais

Ao fazer as nossas considerações finais, é preciso primeiramente ressaltar que os dados produzidos corroboraram a “hipótese de trabalho” inicialmente estabelecida de que as áreas de estudo (UFSCar, USP-RP e USP-SP) foram colonizadas por um número reduzido de linhagens maternas (fêmeas fundadoras) de *P. helleri*. O seqüenciamento de parte de dois genes mitocondriais (*cyt b* e *COI*) permitiu verificar a presença de um baixo número de haplótipos dos dois genes nas três áreas de estudo. Portanto, os poucos haplótipos identificados com distribuição exclusiva em um ou outro sítio resultou em forte estruturação populacional para os genes mitocondriais.

Em segundo lugar, a análise de variância molecular (AMOVA) utilizando os dados de microssatélites estabeleceu que as três populações, embora geograficamente próximas, são geneticamente diferenciadas a ponto do teste de assignment identificar corretamente a população de origem de 97% das operárias analisadas.

Ao comparar os valores do  $F_{st}$  para o DNA mitocondrial e para o DNA nuclear, já devidamente corrigidos, foram verificados níveis de diferenciação populacional similares para os dois tipos de marcadores. Portanto, os dados sugerem que, se as fêmeas fundadoras se dispersam pouco em razão de comportamento filopátrico (a nidificação ocorre muito próximo ao ninho natal), os machos não são altamente dispersores, visto que populações relativamente próximas são significativamente diferenciadas.

Quanto à genética familiar, as segregações alélicas para onze locos microssatélites, quatro heteroespecíficos e sete espécie-específicos, revelaram

que as progênies de *P. helleri* podem ser explicadas pelo acasalamento da rainha com um único macho (a fêmea é monândrica).

Quais as implicações dos fatos estabelecidos? A primeira dificuldade que os dados levantam é relativa à baixa dispersão dos machos. Se considerarmos o mecanismo de determinação complementar do sexo, o acasalamento nestas espécies exige um elevado grau de panmixia para diminuir as chances de homozigidade no loco sexual e a conseqüente geração de machos diplóides. Em locais onde a densidade de colônias é alta, este problema pode ser contornado pela formação de aglomerações de machos provenientes de um grande número de colônias próximas. Mas, considerando que boa parte destas espécies de abelhas ocorre em baixas densidades mesmo em condições naturais, como tornar o acasalamento panmítico? A resposta adequada a esta questão exige boas estimativas da densidade de ninhos de uma espécie em áreas naturais bem definidas e a determinação do número de colônias que contribuem para as agregações de machos.

Uma segunda dificuldade que os nossos achados suscitam diz respeito a questões conservacionistas e do uso sustentável das espécies de abelhas polinizadoras. A ocorrência de estruturação populacional em áreas geográficas relativamente próximas dificulta o delineamento de estratégias que visam a conservação da espécie. Se populações muito próximas geograficamente apresentam alta diferenciação genética, fica difícil estabelecer uma ou poucas unidades como alvo de atitudes conservacionistas. Estas populações podem ser geneticamente diferenciadas para marcadores possivelmente neutros, os quais não estariam associados a genes adaptativos próprios de cada população. Neste

caso, no intuito de preservar a variação da espécie, um grande número de populações precisa ser objeto deste esforço, trazendo maiores obstáculos para o cumprimento deste objetivo. Se estas adaptações estão presentes, as dificuldades aumentam, pois estas foram delineadas pelas pressões seletivas próprias de cada sítio.

Os resultados aqui relatados, em especial, o fato de que a colonização de uma área parece ser realizada por um número reduzido de fêmeas fundadoras e que o crescimento se dá essencialmente pela enxameagem e não pela entrada de novos enxames exigem, como consequência, um novo olhar para as exigências da criação racional das abelhas sem ferrão. Estudos similares em outras espécies poderão contribuir para o delineamento de estratégias que garantam o melhor manejo das espécies de meliponídeos, contribuindo para sua preservação e uso sustentável.

## 6. Referências Bibliográficas

- AGOSTINI K; SAZIMA M. Plantas ornamentais e seus recursos para abelhas no Campus da Universidade Estadual de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil. *Bragantia* 62 (3): 335-343. 2003.
- AHRNÉ K; BENGTSSON J; ELMQVIST T. Bumble bees (*Bombus* spp) along a gradient of increasing urbanization. *PLoS ONE* 4 (5): e5574. Doi:101371/journal.pone.0005574. 2009.
- ALBUQUERQUE PMC; CAMARGO JMF. Espécies novas de *Trigonisca* Moure (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Revista Brasileira de Entomologia* 51 (2): 160-175. 2007.
- ALMEIDA-MURADIAN LB; MATSUDA AH; BASTOS DHM. Physiocochemical parameters of Amazon *Melipona* honey. *Química Nova* 30 (3): 707-708. 2007.
- ALVES DA; IMPERATRIZ-FONSECA VL; FRANCOY TM; SANTOS-FILHO PS; BILLEN J; WENSELEERS T. Successful maintenance of a stingless bee population despite a severe genetic bottleneck. *Conservation Genetics*, Doi: 10.1007/s10592-010-0171-z. 2010.
- ALVES JH; FREITAS BM. Comportamento de pastejo e eficiência de polinização de cinco espécies de abelhas em flores de goiabeira (*Psidium guajava* L.). *Revista Ciência Agrônoma* 37 (2): 216-220. 2006.
- APONTE OIC. *Poliginia e monoginia em Melipona bicolor (Apidae, Meliponini): do coletivo para o individual*. Tese de Doutorado, USP, São Paulo. 237 pp. 2003.
- ASSIS AF. *Estudo populacional e molecular de Nannotrigona testaceicornis Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) através do DNA mitocondrial*. Dissertação de Mestrado, USP, Ribeirão Preto. 66 pp. 2010.
- ARCHIE JW. Statistical analysis of heterozygosity data: independent sample comparisons. *Evolution* 39:623-637. 1985.

- AZEVEDO GG. Atividade de vôo e determinação do número de ínstares larvais em *Partamona helleri* (Friese): (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa. 64 pp. 1997.
- AZEVEDO GG; ZUCCHI R. Relações etológicas entre *Partamona* Schwarz e *Parapartamona* Schwarz (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Anais do IV Encontro sobre abelhas*, Ribeirao Preto, SP: 258-264. 2000.
- AZEVEDO RL; CARVALHO CAL; PEREIRA LL; NASCIMENTO AS. Abelhas (Hymenoptera: Apoidea) visitantes das flores do feijão guandu no Recôncavo Baiano, Brasil. *Ciência Rural* 35 (5): 1453-1457. 2007.
- BANKOVA V; POPOVA M. Propolis of stingless bees: a promising source of biologically active compounds. *Pharmacognosy Reviews* 1 (1): 88-92. 2007.
- BARRETO LS; CASTRO MS. Ecologia de nidificação do gênero *Partamona* (Hymenoptera: Apidae) na caatinga, Milagres, Bahia. *Biota Neotropica* 7 (1): 87-92. 2007.
- BATALHA-FILHO H; MELO GAR; WALDSCHMIDT AM; CAMPOS LAO; FERNANDES-SALOMÃO TM. Geographic distribution and spatial differentiation in the color pattern of abdominal stripes of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae). *Zoologia* 26 (2): 213-219. 2009.
- BATALHA-FILHO H; WALDSCHMIDT AM; CAMPOS LAO; TAVARES MG; FERNANDES- SALOMÃO TM. Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie* 41: 534-547. 2010.
- BATISTA MA; RAMALHO M; SOARES AEE. Nesting sites and abundance of Meliponini (Hymenoptera: Apidae) in heterogeneous habitats of the Atlantic Rain Forest, Bahia, Brazil. *Lundiana* 4 (1): 19-23. 2003.
- BEYE M; HASSELMANN M; FONDRIK M K; PAGE R E; OMHOLT S W. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* 114: 419-429. 2003.

- BIESMEIJER JCB; SLAA EJ. Review article: The structure of eusocial bee assemblages in Brazil. *Apidologie* 37: 240-258. 2006.
- BIESMEIJER JC, GIURFA M; KOEDAM D; POTTS SG; JOEL DM; DAFNI A. Convergent evolution: floral guides, stingless bee nest entrances, and insectivorous pitchers. *Naturwissenschaften* 92: 444-450. 2005.
- BILLOTTE N; LAGODA PJR; RISTERUCCI AM; BAURENS FC. Microsatellite-enriched libraries: Applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277-288. 1999.
- BORGES AA. *Variabilidade genética de Partamona helleri Friese, 1900 (Hymenoptera, Apidae)*. Dissertação de Mestrado, UFV, Viçosa. 58 pp. 2007.
- BRITO RM. *Análise molecular e populacional de Partamona mulata (Moure in Camargo, 1980) e Partamona helleri (Friese, 1990) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)*. Tese de Doutorado, USP, São Paulo. 189 pp. 2005.
- BRITO RM; ARIAS MC. Mitochondrial DNA characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by PCR + RFLP and sequencing. *Apidologie* 36: 431-437. 2008.
- BRITO RM; ARIAS MC. Genetic structure of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) from Neotropical Atlantic rainforest. *Insectes Sociaux* 57: 413-419. 2010.
- BROSI BJ; ARMSWORTH PR; DAILY GC. Optimal design of agricultural landscapes for pollination services. *Conservation Letters* 1: 27-36. 2008.
- BROSI BJ. The complex responses of social stingless bees (Apidae: Meliponini) to tropical deforestation. *Forest Ecological Manage*. Doi: 10.1016/j.foreco.2009.02.025. 2009.
- BROUAT C; CHEVALLIER H; MEUSNIER S; NOBLECOURT T; RASPLUS JY. Specialization and habitat: spatial and environmental effects on abundance and genetic diversity of forest generalist and specialist *Carabus* species. *Molecular Ecology* 13: 1815-1826. 2004.
- CAMERON S; MARDULYN P. The major opsin gene is useful for inferring higher level phylogenetic relationships of the corbiculate bees. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28:610-613. 2003.



- CAMERON SA; WILLIAMS PH. Phylogeny of bumble bees in the New World subgenus *Fervidobombus* (Hymenoptera: Apidae): congruence of molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 321-331. 2003.
- CAMERON EC; FRANCK P; OLDROYD BP. Genetic structure of nest aggregations and drone congregations of the southeast Asian stingless bee *Trigona collina*. *Molecular Ecology* 13 (8): 2357–2364. 2004.
- CAIRNS CE; VILLANUEVA-GUTIÉRREZ R; KOPTUR S, BRAY D. Bee populations, forest disturbance, and Africanization in Mexico. *Biotropica* 37 (4): 686-692. 2005.
- CANE JH. Habitat fragmentation and native bees: a premature verdict? *Conservation Ecology* 5:1-9. 2001.
- CANE JH; TEPEDINO VJ. Causes and extent of declines among native north america invertebrate pollinators: detection, evidence and consequences. *Conservation Ecology* 5: 1-10. 2001.
- CANE JH; MINCKLEY RL; KERVIN LJ; ROULSTON TH; WILLIAMS NM. Complex responses within a desert bee guild (Hymenoptera: Apiformes) to urban habitat fragmentation. *Ecological Applications* 16 (2): 632-644. 2005.
- CARVALHO CAL; MARCHINI LC; ROS PB. Fontes de pólen utilizadas por *Apis mellifera* L. e algumas espécies de Trigonini (Apidae) em Piracicaba (SP). *Bragantia* 58 (1): 49-56. 1999.
- CARVALHO PER. Cafezeiro do mato. *Circular Técnica EMBRAPA* 138: 1-16. 2007.
- CARVALHO-ZILSE GA; KERR WE. Substituição natural de rainhas fisogástricas e distância de vôo dos machos de tiúba (*Melipona compressipes fasciculata* Smith, 1854) e urucu (*Melipona scutellaris* Latreille, 1811) (Apidae, Meliponini). *Acta Amazonica* 34: 649-652. 2004.
- CASTRO MS. Bee fauna of some tropical and exotic fruits: potencial pollinators and their conservation. In Kevan P & Imperatriz-Fonseca VL (eds) – *Pollinating Bees – The Conservation Link between Agriculture and Nature* – Ministry of Environment Brasilia: 275-288. 2002.

- CHAPMAN RE; WANG J; BOURKE AFG. Genetic analysis of spatial foraging patterns and resource sharing in bumble bee pollinators. *Molecular Ecology* 12 (10): 2801-2808. 2003.
- CLEMENT M; POSADA D; CRANDALL KA. TCS: a computer program to estimate gene genealogies (version 1.21). *Molecular Ecology* 9: 1657-1659. 2000.
- CONTEL EPB; MACHADO MFG; FALCÃO TMMA; SANTOS JRC; CASTANHEIRA EB; MESTRINER MA; BEIRA EMSB; CAMARGO JMF. Variabilidade genética em meliponídeos estimada através de alozimas. *Naturalia*: 51-55. 1992.
- COSTA MA; POMPOLO SG; CAMPOS LAO. Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética* 15: 801-806. 1992.
- COSTA MA; DEL LAMA MA; MELO GAR; SHEPPARD WS. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S r DNA sequences. *Apidologie* 34: 73-84. 2003.
- COUVILLON MJ; WENSELEERS T; IMPERATRIZ-FONSECA VL; NOGUEIRA-NETO P. Comparative study in stingless bees (Meliponini) demonstrates that nest entrance size predicts traffic and defensivity. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 194-201. 2008.
- CROZIER RH; CROZIER YC. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera* – complete sequence and genome organization. *Genetics* 133: 97-117. 1993.
- CRUZ DO; JORGE DMM; PEREIRA JOP; TORRES DC; SOARES CEA; FREITAS BM; GRANGEIRO TB. 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. 2006.
- DANFORTH BN; NEFF JL; BARRETO-KO P. Nestmate relatedness in a communal bee, *Perdita texana* (Hymenoptera: Andrenidae), based on DNA fingerprinting. *Evolution* 50: 276-284. 1996.
- DANFORTH B. Bees. *Current Biology* 17 (5): 156-161. 2007.

- DARVILL B; KNIGHT ME; GOULSON D. Use of genetic markers to quantify bumblebee foraging range and nest density. *Oikos* 107 (3): 471-478. 2004.
- DEL LAMA MA; FIGUEIREDO RA; SOARES AEE; DEL LAMA SN. Hexokinase polymorphism in *Apis mellifera* and its use for Africanized honeybee identification. *Revista Brasileira de Genética* 11: 287-297. 1988.
- DEL LAMA MA; LOBO JA; SOARES AEE; DEL LAMA SN. Genetic differentiation estimated by isozymic analysis of Africanized honeybee populations from Brazil and from Central America. *Apidologie* 21: 2761-280. 1990.
- DICK CW; ROUBIK DW; GRUBER KF; BERMINGHAM E. 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. 2004.
- DINIZ NM; SOARES AEE; SHEPPARD WS; DEL LAMA MA. Genetic structure of honeybee populations from southern Brazil and Uruguay. *Genetics and Molecular Biology* 26 (1): 47-52. 2003.
- DUARTE OMP; MARTINS CCC; WALDSCHMIDT AM; COSTA MA. Occurrence of multiple nucleolus organizer regions and intraspecific karyotype variation in *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Meliponini). *Genetics and Molecular Research* 8 (3): 831-839. 2009.
- DUTRA RP; NOGUEIRA AMC; MARQUES RRO; COSTA CP; RIBEIRO MNS. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18 (4): 557-562. 2008.
- EXCOFFIER L; LAVAL G; SCHNEIDER S. Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* (1): 47-50. 2005.
- FAETH SH; WARREN PS; SHOCHAT E; MARUSSICH W. Trophic dynamics in urban communities. *BioScience* 55 (5): 399-407. 2005.
- FALCÃO TMMA; CONTEL EPB. Genetic variability in natural populations of Brazilian bees: II Electrophoretic data for PMG and MDH give evidence for

- multiple fertilizations in stingless bees. *Brazilian Journal of Genetics* 14: 47–59. 1991.
- FERREIRA KM; SILVA OL; ARIAS MC; DEL LAMA MA. Cytochrome-*b* variation in *Apis mellifera* samples and its association with COI-COII patterns. *Genetica* 135: 149-155. 2009.
- FETRIDGE E; ASCHER JS; LANGELLOTO G. The bee fauna of residential gardens in a suburb of New York City (Hymenoptera: Apoidea). *Annals of the Entomological Society of America* 101 (6): 1067-1077. 2008.
- FRANCISCO FO. *Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão Plebeia remota: análise do DNA mitocondrial e microssatélites*. Dissertação de Mestrado, USP São Paulo. 140 pp. 2002.
- FRANCISCO FO; SILVESTRE D; ARIAS MC. Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponinae): RFLP, restriction maps and phylogenetic inferences. *Apidologie* 32: 323-332. 2001.
- FRANCK P; CAMERON E; GOOD G; RASPLUS JY; OLDROYD BP. Nest architecture and genetic differentiation in a species complex of Australian stingless bees. *Molecular Ecology* 13 (8): 2317–2331. 2004.
- FRANKHAM R; BALLOU JD; BRISCOE DA. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press. 2002.
- FRAZÃO RF; SILVEIRA OTL. 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. 2003.
- FREITAS MF; MARINHO IV; GUILHERME RF; CALDASO AL. Preservação de abelhas sem ferrão no semi-árido através da criação racional. *Anais do Encontro Paraibano de Educação Ambiental*, João Pessoa, Paraíba. 2000.
- GASTON KJ; SMITH RM; THOMPSON K; WARREN PH. Urban domestic gardens (II): experimental tests of methods for increasing biodiversity. *Biodiversity and Conservation* 14: 395-413. 2005.

- GONÇALVES PHP. *Análise da variabilidade genética de uma pequena população de Frieseomelitta varia (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas*. Dissertação de Mestrado, USP, São Paulo. 140 pp. 2010.
- GONZÁLEZ-ACERETO JÁ; QUEZADA-EUÁN JGG; MEDINA-MEDINA LA. New perspectives for stingless beekeeping in the Yucatán: results of an integral program to rescue and promote the activity. *Journal of Apicultural Research* 45 (3): 234-239. 2006.
- GREEN CL; FRANCK P; OLDROYD BP. Characterization of microsatellite loci for *Trigona carbonaria*, a stingless bee endemic to Australia. *Molecular Ecology Notes*: 89-92. 2001.
- GRESSLER E; PIZO MA; MORELALTO LPC. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 29 (4): 509-530. 2006.
- HALL HG; SMITH DR. Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy Science USA* 88: 4548-4552. 1991.
- HAMILTON WD. The genetic evolution of social behavior. *Journal Theoretical Biology* 7: 17-18. 1964.
- HARRIS H; HOPKINSON DA. *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. Amsterdam: North-Holland Publisher. 630 pp. 1976.
- HASSELMANN M; GEMPE T; SCHIOTT M; NUNES-SILVA CG; OTTE M; BEYE M. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature* 454: 519-523. 2008.
- HEARD TM. The role of stingless bees in crop pollination. *Annual Review of Entomology* 44: 183-206. 1999.
- HILÁRIO SD; IMPERATRIZ-FONSECA VL; KLEINERT AMP. Responses to climatic factors by foragers of *Plebeia pugnax* Moure (*in litt.*) (Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Biologia* 61 (2): 191-196. 2001.

- HUDSON RR; TURELLI R. Stochasticity overrules the `three-times rule`: genetic drift, genetic draft, and coalescence times for nuclear loci versus mitochondrial DNA. *Evolution* 57: 182-190. 2003.
- HUGHES WHO; OLDROYD BP; BEEKMAN M; RATNIEKS FLW. Ancestral monogamy shows kin selection is key to the evolution of eusociality. *Science* 320: 1213-1216. 2008.
- JHA S; VANDERMEER JH. Contrasting foraging patterns for Africanized honeybees, natives bees and native wasps in a tropical agroforestry landscape. *Journal of Tropical Ecology* 25: 13-22. 2009.
- JULIER HE; ROULSTON AH. Wild bee abundance and pollination service in cultivated Pumpkins: farm management, nesting behavior and landscape effects. *Journal Economical Entomology* 102 (2): 563-573. 2009.
- KALLIMANIS AS; PETANIDOU T; TZANOPOULOS J; PANTIS JD; SGARDELIS SP. Do plant-pollinator interaction networks result from stochastic processes? *Ecological Modelling* 220: 684-693. 2009.
- KASINA JM; MBURU J; KRAEMER M; MULLER H. Economic benefit of crop pollination by bees: A case of Kakamega small-holder farming in Western Kenya. *Journal of Economic Entomology* 102 (2): 467-473. 2009.
- KEARNS CA; INTUYE DW; WASER NM. Endangered mutualism: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 83-112. 1998.
- KERR WE. Número máximo e mínimo de colônias de Meliponídeos que devem ser colocados em um local. *Boletim Capel* 40: 7-8. 1985.
- KERR WE. Abelhas indígenas brasileiras (Meliponíneos) na polinização, na produção de mel, geoprópolis e cera. *Informe Agropecuário* 13: 15-22. 1987a.
- KERR WE. Determinação do sexo nas abelhas. XVI. Informações adicionais sobre os genes XO, XA e XB. *Revista Brasileira de Biologia* 47(1/2): 111-113. 1987b.
- KERR WE. Biologia e manejo da Tiúba: a abelha do Maranhão. Ed. EDUFMA. São Luís – MA. 156pp. 1996.

- KERR WE. Extinção de espécies: A grande crise biológica do momento e como afeta os meliponínios. *Anais do V Encontro sobre abelhas*, Ribeirão Preto, SP: 4-9. 2002.
- KERR WE; VENCOSKI R. Melhoramento genético em abelhas. I. Efeito do número de colônias sobre o melhoramento. *Revista Brasileira de Genética* 2: 279-285. 1982.
- KERR WE; CARVALHO GA; NASCIMENTO VA. *Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação* – Belo Horizonte: Acangaú, 144 pp. 1996.
- KERR WE; ZUCCHI R; NAKADAIRA JT; BUTOLO JE. Reproduction in the social bees (Hymenoptera, Apidae). *Journal of the New York Entomological Society* 70: 265-276. 1962.
- KERR WE; CARVALHO GA; COLETTI-SILVA A; ASSIS MGP. Aspectos pouco mencionados da Amazônia. *Parcerias Estratégicas* 12: 20-41. 2001.
- KLEIN AM; VAISSIÈRE BE; CANE JH; STEFFAN-DEWENTER I; CUNNINGHAM SA; KREMEN C; TSCHARNTKE T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 274: 303-313. 2007.
- KEVAN PG; PHILLIPS TP. 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/>. 2001.
- KNIGHT ME; MARTIN AP; BISHOP S; OSBORNE JL; HALE RJ; SANDERSON RA; GOULSON D. An interspecific comparison of foraging range and nest density of four bumblebee (*Bombus*) species. *Molecular Ecology* 14 (6): 1811–1820. 2005.
- KRAUSS J; STEFFAN-DEWENTER J; TSCHARNTKE I. Landscape occupancy and local population size depends on host plant distribution in the butterfly *Cupido minimus*. *Conservation Biology* 120: 359–365. 2004.
- KREMEN C; WILLIAMS NM; AIZEN MA; GEMMIL-HERREN B; LeBUHN G; MINCKLEY R; PACKER L; POTES SG; ROULSTON T; STEFFAN-DEWENTER I; VÁZQUEZ DP; WINFREE R; ADAMS L; CRONE EE; GREENLEAF SS; KEITT TH; KLEIN AM; REGETZ J; RICKETTS TH.

- Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecology Letters* 10: 299-314. 2007.
- LOPES M; FERREIRA JB; SANTOS G. Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. *Agriculturas 2 (4)*: 7-9. 2005.
- LORENZON MCA; CONDE MMS; BARBOSA CG. Eusocial Apidae in Tropical Insular Region. *Brazilian Archives of Biology and Tecnology* 49 (5): 733-738. 2006.
- LONSDORF E; KREMEN C; RICKETTS T; WINFREE R; WILLIAMS N; GREENLEAF S. Modelling pollination services across agricultural landscapes. *Annals of Botany* 103 (9): 1589-1600. 2009.
- MACHADO CS; CARVALHO CAL. Bees (Hymenoptera: Apoidea) on sunflower flowers in Recôncavo Baiano region, Brazil. *Ciência Rural* 36 (5): 1404-1409. 2006.
- MANRIQUE AJ; SANTANA WC. 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. 2008.
- MARINHO V; FREITAS MF; ZANELLA FCV; CALDAS AL. Espécies vegetais da caatinga utilizadas pelas abelhas indígenas sem ferrão como fonte de recursos e local de nidificação. URL: <http://www.prac.ufpb.br/anais/meioambiente/ferrao.pdf>. 2005.
- MARTHE JB; TAVARES MG; CAMPOS LAO. Genetic variability in *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae) populations with and without B chromosomes. *Journal Bioscience* 23 (1): 52-57. 2007.
- MARTINS CCC; DUARTE MP; WALDSCHMIDT AM; ALVES RMO; COSTA MA. 2009. New occurrence of B chromosomes in *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Meliponini). *Genetics and Molecular Biology*. 32 (4): 782-785. 2009.



- MATTESON KC; ASCHER JS; LANGELLOTTO GA. Bee richness and abundance in New York City urban gardens. *Annals of the Entomological Society of America* 101 (1): 140-150. 2008.
- MAUÉS AA; COUTURIER G. Biologia floral e fenologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H. B. K.) McVaugh, Myrtaceae) no Estado do Pará, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 25 (4): 441-448. 2002.
- McFREDERICK QS; LeBUHN G. Are urban parks refuges for bumble bees *Bombus* spp. (Hymenoptera: Apidae)? *Biological Conservation* 129: 372-382. 2005.
- McINTYRE N. Ecology of urban arthropods: A review and a call action. *Annals of the Entomological Society of America* 93 (4): 825-835. 2000.
- MEIXNER MD; ARIAS MC; SHEPPARD WS. Mitochondrial DNA polymorphisms in honey bee subspecies from Kenya. *Apidologie* 31: 181-190. 2000.
- MICHEL-SALZAT A; CAMERON AS; OLIVEIRA ML. Phylogeny of the orchid bees (Hymenoptera: Apinae:Euglossini): DNA and morphology yield equivalent patterns. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 309–323. 2004.
- MICHENER CD. *The Bees of the World*. The John Hopkins University Press, Baltimore. 2000.
- MODERCIN IF; CASTRO MS; BANDEIRA FPSF. Manejo sustentável de abelhas sem ferrão no Território Indígena Pankararé, Raso da Catarina, Bahia. *Revista Brasileira de Agroecologia* 2 (2): 1277-1281. 2007.
- NATES-PARRA G. Biodiversidad y meliponicultura en el piedemonte llanero, Meta, Colombia. *IV Seminario y Taller Mesoamericano sobre abejas sin aguijón*. El Salvador. 2005.
- NIEH JC; KRUIZINGA K; BARRETO LS; CONTRERAS FAL; IMPERATRIZ-FONSECA VL. Effect of group size on the aggression strategy of one extirpating stingless bee, *Trigona spinipes*. *Insectes Sociaux* 52: 147-154. 2005.
- NIEMELÄ J. Is there a need for a theory of urban ecology? *Urban Ecosystems* 3: 57-65. 2000.

- NIEMELÄ J; KOTZE J; ASHWOETH A; BRANDMAYR P; DESENDER K; NEW T; PENEV L; SAMWAYS M; SPENCE J. The search for common anthropogenic impacts on biodiversity: a global network. *Journal of Insects Conservation* 4: 3-9. 2000.
- NOGUEIRA-FERREIRA FH; AUGUSTO SC. Amplitude de nicho e similaridade no uso de recursos florais por abelhas eussociais em uma área de cerrado. *Journal of Bioscience* 23 (1): 45-51. 2007.
- NOGUEIRA-NETO P. Notas bionômicas sobre Meliponíneos. III. Sobre a enxameagem. *Arquivo do Museu Nacional do Rio de Janeiro (Brasil)* 42: 419-451. 1954.
- NOGUEIRA-NETO P. *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. São Paulo, Nogueirapis. 445 pp. 1997.
- ODDO LP; HEARD TA; RODRIGUEZ-MALAVER A; PÉREZ RA; FERNÁNDEZ-MUIÑO M; SANCHO MT; SESTA G; LUSCO L; VIT P. Composition and antioxidant activity of *Trigona carbonaria* honey from Australia. *Journal of Medicinal Food* 11 (4): 789-794. 2008.
- OLIVEIRA RC; NUNES FMF; CAMPOS APS; VASCONCELOS SM; ROUBIK D; GOULART LR; KERR WE. Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 27 (2): 181-186. 2004.
- OLIVEIRA ML; CUNHA JA. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? *Acta Amazonica* 35 (3): 389-394. 2005.
- PAESE A. Caracterização e análise ambiental do Campus da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP. Dissertação de Mestrado, UFSCar, São Carlos. 83 pp. 1997.
- PAIVA GA. Levantamento florístico quali-quantitativo da Praça do Relógio da Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" – USP/SP. Dissertação de Mestrado, USP, São Paulo. 116 pp. 2006.
- PAINI DR. Impact of the introduced honey bee (*Apis mellifera*) (Hymenoptera: Apidae) on native bees: A review. *Austral Ecology* 29: 399-407. 2004.

- PALSBOLL PJ; BERUBE M; ALLENDORF FW. Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution* 22 (1):11-16. 2007.
- PALUMBI SR; CIPRIANO F; HARE MP. Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data: the three-times rule. *Evolution* 55: 859-868. 2001.
- PAXTON RJ. Genetic structure of colonies and a male aggregation in the stingless bee *Scaptotrigona postica*, as revealed by microsatellite analysis. *Insectes Sociaux* 47: 63-69. 2000.
- PAXTON RJ. Male mating behaviour and mating systems of bees: an overview. *Apidologie* 36: 145-156. 2005.
- PAXTON RJ; WEIBSCHUN N; QUEZADA-EUÁN JJG. Characterization of dinucleotide microsatellite loci for stingless bees. *Molecular Ecology Notes* 8: 690-692. 1999.
- PEAKALL R; SMOUSE PE. GenAlex6: genetic analysis in Excell. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295. 2006.
- PEDRO SEM; CAMARGO JMF. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 47: 1-117. 2003.
- PEREIRA JOP. *Diversidade genética da abelha sem ferrão Melipona quinquefasciata baseada no seqüenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará. 142 pp. 2006.
- PETERS JM; QUELLER DC; IMPERATRIZ-FONSECA VL; STRASSMANN JE. Microsatellite loci for stingless bees. *Molecular Ecology* 7: 784-787. 1998.
- POMPEU MS. *Aspectos bionômicos de Melipona rufiventris (Hymenoptera, Meliponina) e sugestões para sua conservação*. Dissertação de Mestrado, UFV, Minas Gerais. 119 pp. 2003.
- RAMALHO M. Stingless bees and mass flowering trees in the canopy of Atlantic Forest: a tight relationship. *Acta Botanica Brasilica* 18 (1): 37-47. 2004.

- RASMUSSEN C. A stingless bee nesting with a paper wasp (Hymenoptera: Apidae, Vespidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 77 (4): 593-601. 2004.
- RASMUSSEN C; CAMERON; S.A. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society* 99: 206-232. 2010.
- RAVEN PH; EVERT RF; EICHHORN S. *Biologia vegetal*. 6<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 906pp. 2001.
- RESENDE HC; BARROS F; CAMPOS LAO; FERNANDES-SALOMÃO TM. 2008. Visitação de orquídea por *Melipona capixaba* Moure & Camargo (Hymenoptera: Apidae), abelha ameaçada de extinção. *Neotropical Entomology* 37 (5): 609-611. 2008.
- ROUBIK DW. *Ecology and natural history of tropical bees*. New Cork, Cambridge University Press. 1989.
- ROUBIK DW. Ups and downs in pollinator populations. When is there a decline? *Conservation Ecology* 5(1): 2. URL: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art2/>. 2001.
- ROUBIK DW. Stingless bee nesting biology. *Apidologie* (37): 124-143. 2006.
- SAMEJIMA H; MARZUKI M; NAGAMITSU T; NAKASIZUKA T. The effects of human disturbance on a stingless bee community in a tropical rainforest. *Biological Conservation* 120: 577-587. 2004.
- SFORCIN JM. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 113: 1-14. 2007.
- SHEPPARD WS, McPHERON BA. Ribosomal DNA diversity in Apidae, In "Diversity in the genus *Apis*", Smith DR (ed.), Westview, Boulder (CO), pp. 89-102. 1991.
- SHEPPARD WS, RINDERER TE; MAZZOLI J; STELZER JA; SHIMANUKI H. Gene flow between African- and European-derived honey bee populations in Argentina. *Nature* 349: 782-784. 1991.

- SHOCHAT E; WARREN PS; FAETH SH; McINTYRE NE. From patterns to emerging processes in mechanistic urban ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 21 (4): 186-191. 2006.
- SILBERBAUER-GOTTSBERGER I; GOTTSBERGER G. A polinização de plantas de cerrado. *Revista Brasileira de Biologia* 48: 651-663. 1988.
- SILVA RB. *Variabilidade genética de Melipona quadrifasciata (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) no Estado de Minas Gerais – Brasil*. Dissertação de Mestrado, UFV, Viçosa. 53 pp. 2007.
- SILVEIRA FA; MELO GAR; ALMEIDA EAB. *Abelhas Brasileiras: sistemática e identificação*. Belo Horizonte, 253pp. 2002.
- SILVESTRE D; DOWTON M; ARIAS MC. The mitochondrial genome of the stingless bee *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): sequence, gene organization and a unique tRNA translocation event conserved across the tribe Meliponini. *Genetics and Molecular Biology* 31 (2): 451-460. 2008.
- SLAA EJ; SÁNCHEZ-CHAVES LA; MALAGOBI-BRAGA KS; HOFSTEDE FE. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie* 37: 293-315. 2006.
- SMITHIES O. On electrophoresis in gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. *Biochemical Journal* 61: 620-641. 1955.
- SOFIA SH; PAULA FM; SANTOS AM; ALMEIDA FS; SODRÉ LMK. Genetic structure analysis of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae) populations from southern Brazilian Atlantic Forest remnants. *Genetics and Molecular Biology* 28: 479-484. 2005.
- SOUZA DL; EVANGELISTA-RODRIGUES A; PINTO MSC. As abelhas como agentes polinizadores. *Revista Eletrônica de Veterinária* 8 (3): 1-7. 2007.
- SOUZA LA; PEREIRA TO; PREZOTO F; FARIA-MUCCI GM. Diversificação e diversidade de *Meliponini* (Hymenoptera, Apidae) em uma área urbana do Município de Juiz de Fora, MG, Brasil. *Journal Bioscience* 18 (2): 59-65. 2002.

- SOUZA SGX; TEIXEIRA AFR; NEVES EL; MELO AMC. As abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponini) residentes no Campus Federação/Ondina da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil. *Candombá* 1 (1): 57-69. 2005.
- SOUZA RO; MORETTO G; ARIAS MC; DEL LAMA MA. Differentiation of *Melipona quadrifasciata* L. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) subspecies using cytochrome b PCR-RFLP patterns. *Genetics and Molecular Biology* 30 (2): 445-450. 2008.
- STRASSMANN J. The rarity of multiple mating females in the social Hymenoptera. *Insectes Sociaux* 48: 01-13. 2001.
- SUKOPP H. On the early history of urban ecology in Europe. *Preslia, Praha* 74: 373-393. 2002.
- TAURA HM; LAROCA S. A associação de abelhas silvestres de um biótopo urbano de Curitiba (Brasil), com comparações espaço-temporais: abundância relativa, fenologia, diversidade e exploração de recursos (Hymenoptera, Apoidea). *Acta Biologica Paranaense* 30 (1/2/3/4): 35-137. 2001.
- TAURA HM, LAROCA S. Biologia da polinização: interações entre as abelhas (Hym., Apoidea) e as flores de *Vassobia breviflora* (Solanaceae). *Acta Biologica Paranaense* 33 (1, 2, 3, 4): 143-162. 2004.
- TAMURA K; NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526. 1993.
- TAVARES MG; DIAS LAS; BORGES AA; LOPES DM; BUSSE AHP; COSTA RG, FERNANDES-SALOMÃO TM; CAMPOS LAO. 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. 2007.

- TEIXEIRA LV; CAMPOS FNM. Início da atividade de vôo em abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae): influência do tamanho da abelha e da temperatura ambiente. *Revista Brasileira de Zoociências* 7 (2): 195-2002. 2005.
- TORRES RR; ARIAS MC; MORETTO G. Mitochondrial DNA polymorphism among populations of *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* Lepeletier (Apidae: Meliponini) from Southern Brazil. *Neotropical Entomology* 38(2): 208-211. 2009.
- TOSTA VC; FERNANDES-SALOMÃO TM; TAVARES MG; POMPOLO SG; BARROS EG; CAMPOS LAO. A RAPD marker associated with B chromosomes in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). *Cytogenetics and Genome Research* 106: 279-283. 2004.
- TOSTA VC; TAVARES MG; FERNANDES-SALOMÃO TM; BARROS EG; CAMPOS LAO; CAMACHO JPM. Development of a SCAR marker for the analysis of B chromosome presence in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). *Cytogenetics and Genome Research* 116: 127-129. 2007.
- TÓTH E; STRASSMANN JE; NOGUEIRA-NETO P; IMPERATRIZ-FONSECA VL; QUELLER DC. Male production in stingless bees: variable outcomes of Queen Dwork conflict. *Molecular Ecology* 11: 2661-2667. 2002.
- VARANDA EM; OLIVEIRA C; BARBOSELA JR. Restauração de processos ecológicos no Projeto Floresta da USP-RP: um projeto coletivo. *Anais do VII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu, MG*. 2005.
- VEDDELER D; OLSCHESKI R; TSCHAMTKE T; KLEIN AM. The contribution of non-managed social bees to coffee production: new economic insights based on farm-scale yield data. *Agroforestry Systems* 73: 109-114. 2008.
- VIARD F; FRANCK P; DUBOIS MP; ESTOUP A; JANE P. Variation of microsatellite size homoplasy across electromorphs, loci, and populations in three invertebrate species. *Journal of Molecular Evolution* 47: 42-51. 1998.
- WALDSCHMIDT AM; BARROS EG; CAMPOS LAO. A molecular marker distinguishes the subspecies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Genetics and Molecular Biology* 23 (3): 609-611. 2000.

- WALSH PS; METZGER DA; HIGUCHI R. Chelex 100 as a médium for simple extraction of DNA of PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10 (4): 506-513. 1991.
- WAPLES RS; GAGGIOTTI O. 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 (6):1419-1439. 2006.
- WEINLICH R; FRANCISCO FO; ARIAS MC. Mitochondrial DNA restriction and genomic maps of seven species of *Melipona* (Apidae: Meliponini). *Apidologie* 35: 365-370. 2004.
- WASER NM; CHITTKA L; PRICE MV; WILLIAMS NM; OLLERTON J. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology* 77: 1043-1060. 1996.
- WERNECK MV. *Uso de marcadores microssatélites para análise genética de populações de Melipona mandacaia Smith, 1863 (Hymenoptera, Apoidea) no Estado da Bahia*. Dissertação de Mestrado, UFV, Viçosa. 33 pp. 2008.
- WIDMER A; SCHMID-HEMPEL P. The population genetic structure of a large temperate pollinator species, *Bombus pascuorum* (Scopoli), (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology* 8: 387-398. 1999.
- WINFREE R; GRISWOLD T; KREMEN C. Effect of human disturbance on Bee communities in a forested ecosystem. *Conservation Biology* 21 (1): 213-223. 2007.
- WOJCIK VA; FRANKIE GW; THORP RW; HERNANDEZ JL. Seasonality in bees and their floral resource plants at a constructed urban bee habitat in Berkeley, California. *Journal of the Kansas Entomological Society* 81 (1): 15-28. 2008.
- ZANETTE LRS; SOARES LA; PIMENTA HR; GONÇALVES A; MARTINS RP. Nesting biology and sex ratios of *Auplopus militaris* (Lynch-Arribalzaga 1873) (Hymenopetera Pompilidae). *Tropical Zoology* (17): 145-154. 2004.
- ZANETTE LRS; MARTINS RP; RIBEIRO SP. Effects of urbanization on Neotropical wasp and bee assemblages in a Brazilian metropolis. *Landscape and Urban Planning* 71: 105-121. 2005.



ZIMMERMANN Y; ROUBIK DW; QUEZADA-EUÁN JJG; PAXTON RJ; ELTZ E.  
Single mating in orchid bees (*Euglossa*, Apinae): implications for mate  
choice and social evolution. *Insectes Sociaux* 56: 241-249. 2009.

## Anexos

**Anexo 1:** Relação dos ninhos de *P. helleri* coletados e número total de fêmeas analisadas para cada ninho (N) considerando os Campi da UFSCar, USP de São Paulo (USP-SP) e de Ribeirão Preto (USP-RP).

Ninhos	N	Localização
UFSCar 1	17	UFSCar – Área Sul
UFSCar 2	7	UFSCar – Área Sul
UFSCar 3	12	UFSCar – Área Sul
UFSCar 4	06	UFSCar – Área Sul
UFSCar 5	15	UFSCar – Área Sul
UFSCar 6	16	UFSCar – Área Sul
UFSCar 7	19	UFSCar – Área Sul
UFSCar 8	18	UFSCar – Área Sul
UFSCar 9	12	UFSCar – Área Sul
UFSCar 10	10	UFSCar – Área Sul
UFSCar 11	20	UFSCar – Área Sul
UFSCar 12	06	UFSCar – Área Sul
UFSCar 13	12	UFSCar – Área Sul
UFSCar 14	12	UFSCar – Área Sul
UFSCar 15	17	UFSCar – Área Sul
UFSCar 16	13	UFSCar – Área Sul
UFSCar 17	16	UFSCar – Área Sul
UFSCar 18	12	UFSCar – Área Sul
UFSCar 19	19	UFSCar – Área Sul
UFSCar 20	15	UFSCar – Área Sul
UFSCar 21	23	UFSCar – Área Norte
UFSCar 22	12	UFSCar – Área Norte
UFSCar 23	12	UFSCar – Área Norte
UFSCar 24	15	UFSCar – Área Norte
UFSCar 25	05	UFSCar – Área Norte
UFSCar 26	10	UFSCar – Área Norte
UFSCar 27	11	UFSCar – Área Norte
UFSCar 28	13	UFSCar – Área Norte
UFSCar 29	18	UFSCar – Área Norte
UFSCar 30	05	UFSCar – Área Norte
UFSCar 31	13	UFSCar – Área Norte
UFSCar 32	09	UFSCar – Área Norte
UFSCar 33	06	UFSCar – Área Norte
UFSCar 34	14	UFSCar – Área Norte

**Anexo 1:** Continuação.

Ninhos	N	Localização
USP-RP 1	15	USP-RP – 869PHR
USP-RP 2	2	USP-RP – 1280
USP-RP 3	2	USP-RP – 1281
USP-RP 4	15	USP-RP – 1021PHR
USP-RP 5	15	USP-RP – 757
USP-RP 6	15	USP-RP – N870PHLR
USP-RP 7	2	USP-RP – 1285
USP-RP 8	2	USP-RP – 1287
USP-RP 9	15	USP-RP – 971
USP-RP 10	15	USP-RP – NN AAJ
USP-RP 11	15	USP-RP – 587
USP-RP 12	15	USP-RP – 764PH
USP-RP 13	15	USP-RP – 765PHR
USP-RP 14	15	USP-RP – 1236
USP-RP 15	15	USP-RP – 973
USP-RP 16	2	USP-RP – 1153
USP-RP 17	2	USP-RP – 1284
USP-RP 18	2	USP-RP – 1154
USP-RP 19	2	USP-RP – 1283
USP-RP 20	2	USP-RP – 1296
USP-RP 21	2	USP-RP – 1286
USP-RP 22	15	USP-RP – 308
USP-RP 23	15	USP-RP – 960PHR
USP-RP 24	15	USP-RP – N1227
USP-RP 25	15	USP-RP – 1022PHR
USP-SP 1	15	USP-SP – Bromélia/Arco
USP-SP 2	15	USP-SP – Bromélia/Chão
USP-SP 3	15	USP-SP – Palmeira
USP-SP 4	15	USP-SP – Estufa
USP-SP 5	15	USP-SP – 5
USP-SP 6	15	USP-SP – 6
USP-SP 7	15	USP-SP – 7
USP-SP 8	15	USP-SP – 8
USP-SP 9	15	USP-SP – 9
USP-SP 10	10	USP-SP – FAE
USP-SP 11	15	USP-SP – DGBE
USP-SP 12	15	USP-SP – DGUPE
USP-SP 13	12	USP-SP – FAD
USP-SP 14	09	USP-SP – PM

**Anexo 2.** Frequências alélicas obtidas para onze locos microssatélites analisados em operárias adultas de *P. helleri* coletadas nos Campi da UFSCar, USP-RP e USP-SP.

Locos	Alelos	UFSCar	USP-SP	USP-RP
Mbi 232	136	0,288	0,268	0,120
	139	0,068	0,000	0,000
	142	0,000	0,089	0,020
	145	0,000	0,143	0,000
	148	0,091	0,018	0,000
	151	0,061	0,071	0,100
	154	0,008	0,143	0,030
	157	0,000	0,036	0,000
	160	0,015	0,000	0,000
	163	0,371	0,036	0,180
	166	0,023	0,000	0,000
	169	0,053	0,018	0,210
	172	0,015	0,000	0,340
	175	0,008	0,089	0,000
	184	0,000	0,089	0,000
Mbi 254	211	0,083	0,000	0,000
	214	0,250	0,161	0,000
	217	0,280	0,107	0,310
	226	0,068	0,000	0,260
	229	0,098	0,411	0,000
	232	0,106	0,196	0,300
	235	0,053	0,107	0,000
	238	0,061	0,018	0,130
Mbi 215	88	0,273	0,375	0,020
	95	0,727	0,625	0,980
Mbi278	102	0,477	0,429	0,520
	104	0,523	0,571	0,480
Phel-1	220	0,000	0,018	0,000
	222	0,000	0,036	0,000
	228	0,785	0,625	1,000
	230	0,146	0,250	0,000
	232	0,069	0,036	0,000
	234	0,000	0,036	0,000

**Anexo 2.** Continuação.

Locos	Alelos	UFSCar	USP-SP	USP-RP
Phel-2	265	0,348	0,214	0,051
	273	0,000	0,000	0,133
	275	0,038	0,036	0,000
	277	0,000	0,018	0,000
	281	0,417	0,250	0,418
	283	0,167	0,286	0,133
	285	0,000	0,036	0,265
	287	0,000	0,125	0,000
	289	0,000	0,036	0,000
	297	0,030	0,000	0,000
Phel-3	91	0,000	0,000	0,026
	97	0,915	0,889	0,974
	99	0,061	0,111	0,000
	101	0,024	0,000	0,000
Phel-4	242	0,000	0,036	0,061
	246	0,015	0,125	0,000
	248	0,947	0,768	0,735
	250	0,038	0,036	0,010
	252	0,000	0,036	0,194
Phel-5	100	0,242	0,365	0,150
	106	0,000	0,038	0,000
	108	0,669	0,596	0,840
	112	0,081	0,000	0,010
	114	0,008	0,000	0,000
Phel-6	172	0,023	0,036	0,000
	176	0,015	0,071	0,030
	178	0,962	0,857	0,970
	182	0,000	0,036	0,000
Phel-7	282	0,204	0,111	0,000
	290	0,370	0,667	0,076
	292	0,426	0,111	0,303
	294	0,000	0,111	0,621