



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E
CONSERVAÇÃO

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA E MOLECULAR DE ABELHAS
MANDAÇAIAS (*Melipona* spp.) DA REGIÃO DA FOZ DO RIO SÃO
FRANCISCO**

Higor César Menezes Calasans

Mestrado Acadêmico

São Cristóvão
Sergipe - Brasil
2012

HIGOR CÉSAR MENEZES CALASANS

**AVALIAÇÃO MOLECULAR E MORFOMÉTRICA DE ABELHAS
MANDAÇAIAS (*Melipona* spp.) DA REGIÃO DA FOZ DO RIO SÃO
FRANCISCO**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Ecologia e conservação, Universidade Federal de Sergipe, como exigência parcial para obtenção do Título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Genésio T. Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Edilson D. de Araújo

São Cristóvão
Sergipe - Brasil
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

C143a Calasans, Higor César Menezes

Avaliação molecular e morfométrica de abelhas mandacaias (*Melípona spp.*) da região da foz do rio São Francisco / Higor César Menezes Calasans ; orientador Genésio T. Ribeiro. – São Cristóvão, 2012.

52 f. ; il.

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação)-
Universidade Federal Sergipe, 2012.

1. *Melípona quadrifasciata*. 2. Morfometria animal. 3. Apicultura. 4. Distribuição espacial. I. Ribeiro, Genésio T., orient. II. Título.

CDU: 638.12

TERMO DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA E MOLECULAR DE ABELHAS MANDAÇAIA
(*Melipona spp.*) DA REGIÃO DA FOZ DO RIO SÃO FRANCISCO**

por

HIGOR CÉSAR MENEZES CALASÃNS

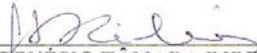
Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Sergipe, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Aprovada pela banca externa composta por

DR. BRUNO DE ALMEIDA SOUZA (EMBRAPA MEIO-NORTE)

DR^a LORENA ANDRADE NUNES (ESALQ/USP)

e apresentada e aprovada pela banca examinadora presencial composta por

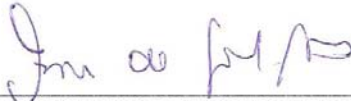


DR. GENÉSIO TÂMARA RIBEIRO

Núcleo de pós-graduação em Ecologia e Conservação da
Universidade Federal de Sergipe



DR^a SONA ARUN JAIN (UFS)



DR. FREDERICO DE SIQUEIRA NEVES (UFMG)

São Cristovão/SE, 02 de março de 2012

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter me guiado e dado força para iniciar e concluir mais um sonho.

Aos meus pais, Rasiel e Maria Bethânia, que sempre me apoiaram nas decisões que tomei e encorajado nos momentos difíceis. Por confiarem em mim e estarem sempre ao meu lado.

Aos meus irmãos, João Paulo e Thaís Regina, que também sempre estão ao meu lado me ajudando e dando força.

A minha noiva e amiga Katiana que em todos os momentos, sejam alegres ou tristes, fáceis ou difíceis, está por perto compartilhando o seu carinho, amor, me encorajando, me dando forças para concluir mais este sonho.

A toda a minha família, tios, avós, primos, que acreditaram e acreditam em mim.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular (Sona, Jonatas, Rosane, Sophia, Valdson, Ronaldo, Carina) pelo aprendizado e os bons momentos que tivemos juntos.

Ao meu orientador, Genésio, que confiou em mim para execução deste trabalho.

A um grande Amigo e co-orientador Edilson, com quem iniciei os trabalhos de pesquisa, agradeço pelos ensinamentos e conselhos dedicados durante todo este trabalho.

A ABECA (Associação Brejograndense de Criadores de Abelhas e Artesãos) pela ajuda nos trabalhos de campo.

A todos os colegas de Mestrado da turma 2010.1 e 2010.2, agradeço por todos os bons momentos que vivemos.

**A UFS e ao núcleo de Pós-graduação em Ecologia e Conservação,
pela oportunidade de cursar o mestrado.**

**A FAPITEC pelo financiamento de projetos que subsidiaram este
trabalho.**

À CAPES pela bolsa concedida.

**A todos que direta ou indiretamente ajudaram na execução deste
trabalho.**

RESUMO

No gênero *Melipona*, a abelha *Melipona quadrifasciata* é uma das espécies mais conhecida e está dividida em duas subespécies *M. q. quadrifasciata* e *M. q. anthidioides*. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a identidade das abelhas mandaçaia do litoral norte do Estado de Sergipe por meio de técnicas moleculares e morfométrica, e verificar a possível barreira geográfica representada pelo Rio São Francisco. A pesquisa foi realizada em uma área total 30ha subdividida em três fragmentos nos municípios de Piaçabuçu – AL, Brejo Grande –SE e Ilha da Criminosa – SE. Foram registradas 14 colônias de mandaçaia em Brejo Grande e coletados 10 espécimes de cada colônia. Nenhum ninho foi localizado na Ilha da Criminosa e em Piaçabuçu, o que reforça a hipótese de que o Rio São Francisco poderia está representando uma barreira geográfica para a dispersão das colônias. A distribuição espacial de ninhos em uma escala de 10ha, pode ser considerada como aleatória. Na morfometria foram utilizadas as asas dos espécimes coletados e de 3 outras amostras identificadas de *M. q. quadrifasciata*, *M. q. anthidioides* e *M. mandacaia*. Os dados foram submetidos a Análises de Agrupamento, Análise de Componentes Principais, Análise de Variáveis Canônicas, Análise de Variância de Procrustes e teste de correlação de matrizes. As análises dos dados morfométricos são congruentes e apontaram a *M. q. quadrifascita* como a identidade da espécie coletada. A análise de validação cruzada e a correlação de matrizes não apresentou significância, denotando grande similaridade intrapopulacional. O DNA total de cada amostra foi submetido a análise de PCR/RFLP (enzimas: Taq I, Vsp I e Mbo II), identificando um único padrão de haplótipos para a população de abelhas da foz, evidenciando a grande similaridade genética. É importante ressaltar que todos os ninhos estavam localizados em coqueiros que seriam condenados pela baixa produção ocasionada pelos danos decorrente de pragas, além da baixíssima oferta de outros locais para nidificação, o que configura altíssimo risco de extinção populacional.

Palavras-chave: *Melipona quadrifasciata*, Morfometria, Distribuição espacial, PCR/RFLP.

ABSTRACT

In the genus *Melipona*, a bee *Melipona quadrifasciata* is one of the best known species and is divided into two subspecies *M. q. quadrifasciata* and *M. q. anthidioides*. This study aimed to evaluate the identity of bees mandaçaia the northern coast of Sergipe through morphometric and molecular techniques, and verify the possible geographic barrier represented by the Rio São Francisco. The survey was conducted in a total area of 30ha subdivided into three fragments in the municipalities of Piaçabuçu - AL, Brejo Grande – SE, Ilha da Criminosa - SE. Were recorded in 14 colonies mandaçaia Brejo Grande and collected 10 specimens of each colony. No nest was located on the Ilha da Criminosa and Piaçabuçu, which reinforces the hypothesis that the Rio São Francisco could're representing a geographical barrier to the spread of the colonies. The spatial distribution of nests on a scale of 10ha, can be considered as random. Morphometry were used in the wings of the specimens collected and identified three other specimens of *M. q. quadrifasciata*, *M. q. anthidioides* and *M. mandacaia*. The data were subjected to cluster analyzes, principal component analysis, canonical variate analysis, Procrustes analysis of variance test and correlation matrices. Analyses of morphometric data are congruent and identified the *M. q. quadrifascita* as the identity of the species collected. The analysis of cross-validation and correlation matrices showed no significance, showing great similarity intrapopulation. Total DNA from each sample was subjected to analysis of PCR / RFLP (enzymes: Taq I, Vsp I and Mbo II), identifying a unique pattern of haplotypes for the bee population of the mouth, showing the high genetic similarity. All nests were located in palm trees that would be condemned by the low production due to damage caused by pests, besides the very low supply of other sites for nesting, which sets very high risk of population extinction.

Keywords: *Melipona quadrifasciata*, Geometric morphometry, Spatial distribution, PCR / RFLP.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
1 - INTRODUÇÃO	9
1.1 - Sobre <i>Melipona</i> spp.	9
1.2 - Técnicas Moleculares	15
1.3 – A morfometria Geométrica.....	16
1.4 – A região da foz do Rio São Francisco	19
2 – OBJETIVOS	21
2.1 - Geral	21
2.2 - Específico	21
3 – MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 – Área de Estudo	22
3.2 – Coleta de material	23
3.3 – Análises moleculares	23
3.3.1 - Extração de DNA.....	23
3.3.2 - Identificação Genética das espécies pelo método PCR/RFLP	25
3.4 – Análise morfométrica	26
3.5 – Padrão de distribuição espacial dos ninhos	28
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 – Identidade e estrutura populacional.....	30
4.2 – Distribuição espacial dos ninhos	40
5 – CONCLUSÃO	44
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Sobre o gênero *Melipona*.

As abelhas da tribo Meliponini estão entre as mais diversificadas em sua morfologia e comportamento biológico dentre as abelhas eussociais, sendo denominadas popularmente como abelhas sem ferrão, por possuírem ferrão atrofiado. Essas abelhas são altamente diversificadas na região neotropical, com aproximadamente 55 gêneros e cerca de 350 espécies (MICHENER, 2000). São abelhas que vão de minúsculas a médias, em geral robustas, que de maneira geral desempenham importantes funções ecológicas, especialmente como polinizadoras. Todas as espécies do gênero *Melipona* Illiger (1806), são eussociais, embora algumas delas apresentem comportamento de pilhagem de colônias de outras espécies (SILVEIRA *et al.*, 2002). A *Melipona quadrifasciata* é uma das espécies mais conhecida deste gênero e é denominada popularmente por Mandaçaia, nome que tem origem indígena que significa vigia bonito (manda: vigia; çai: bonito), derivado do comportamento dessa espécie em manter uma abelha presente na entrada do ninho vigiando a colmeia. A Mandaçaia está dividida em duas subespécies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* (Lepeletier) e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Lepeletier) (MOURE e KERR, 1950).

A identificação morfológica da *M. q. quadrifasciata* e da *M. q. anthidioides* é feita pelo padrão de bandas terciais amarelas e contínuas (três a cinco bandas) do 3º ao 6º segmento em operárias e machos de *M. q. quadrifasciata*, e bandas interrompidas (de duas a cinco bandas), em *M. q. anthidioides* (SCHWARZ, 1948), (observar Figura 1).

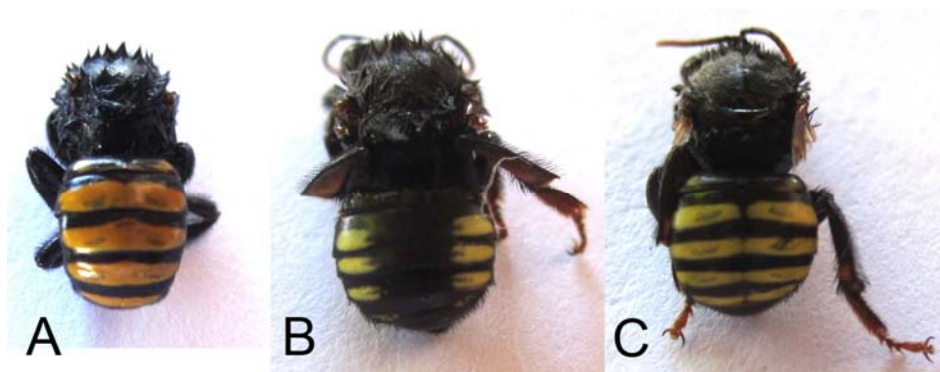


Figura 1: Padrão de bandas terciais de abelhas Mandaçaia. A *Melipona mandacaia*; B – *Melipona quadrifasciata anthidioides*; C – *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*.

Os Meliponíneos ocupam grande parte da região tropical do planeta, mas ocorrem também em regiões de clima temperado subtropical (NOGUEIRA-NETO, 1997). Cerca de 40 espécies de melíponas estão distribuídas do México até a Argentina (CAMARGO, 1979; MICHENER, 2000). A *M. quadrifasciata* segundo Camargo e Pedro (2008) está distribuída na região neotropical, Argentina, Paraguai e Brasil nos Estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Sergipe e São Paulo. Tratando-se das duas subespécies de *M. quadrifasciata*, Waldschmidt *et al.*, (2000) e Batalha-Filho *et al.*, (2009) relataram a ocorrência da subespécie *M. q. quadrifasciata* no Estado de Sergipe, informação conflitante com Camargo e Pedro (2008) que citam a ocorrência da *M. q. anthidioides* em Sergipe e a ausência de *M. q. quadrifasciata*.

Regiões com a ocorrência das duas subespécies de *M. quadrifasciata* são encontradas entre os Estados de São Paulo e Minas Gerais caracterizadas pela formação de indivíduos com fenótipos intermediários para o padrão de bandas terciais, fato amplamente divulgado na literatura científica (MOURE e KERR, 1950; MOURE, 1975; MELO; CAMPOS, 1987; SOUZA *et al.*, 2008). Batalha-Filho *et al.* (2009) também relatou que na região central do Estado de São Paulo observou padrões de listas terciais com formas híbridas entre *M. q. anthidioides* e *M. q. quadrifasciata*.

A fim de diferenciar as subespécies de *M. quadrifasciata*, Waldschmidt *et al.*, (2000) utilizaram padrões moleculares de RAPD para as espécies de *M. q. quadrifasciata* e *M. q. anthidioides* que apresentavam padrões divergentes. Porém indivíduos fenotipicamente parecidos com *M. q. quadrifasciata* do norte do Estado de Minas Gerais não apresentavam esse mesmo padrão, indicando um possível local de hibridização (WALDSCHMIDT *et al.*, 2002).

Apesar da ocorrência de espécies de mandaçaia no Estado de Sergipe, poucos estudos foram desenvolvidos com essas abelhas nessa região. Souza *et al.* (2006) relataram a ocorrência de *M. q. quadrifasciata* em Brejo Grande, município sergipano localizado na região da foz do rio São Francisco, na qual predominam áreas de coqueirais distribuídas em regiões de restinga. Esses autores encontraram ninhos localizados em troncos de coqueiro (*Cocos nucifera*), provavelmente pela inexistência de outros locais para nidificação (Souza *et al.*, 2006).

A biogeografia das espécies também pode ser modificada por ações antrópicas em função do grande potencial do homem em causar impactos nas comunidades locais de abelhas, em função da eliminação de fontes de alimento, destruição de substratos de nidificação, especialmente na medida em que esta ocupação se estende por grandes regiões (SILVEIRA, 2002).

Algumas espécies de *Melipona* e de outros meliponíneos constroem seus ninhos somente em ocos de árvores vivas e são bem sensíveis ao desmatamento (ZANELLA *et al.*, 2003). O processo de escolha de um novo local de nidificação inicia-se quando a colônia está bem desenvolvida e em condições para a formação de um novo ninho. Assim começa a atividade de enxameagem a procura de um novo local de nidificação. Neste período é possível perceber um grupo de operárias à procura de local para estabelecer uma nova colônia (KERR *et al.*, 1996). Oco de árvores, paredes ou pedras são os principais locais para nidificação. Para a sua criação é comum o uso de cortiços e/ou caixas racionais (CARVALHO *et al.*, 2003). Nas mandaçaiais a entrada do ninho é construída com geoprópolis (mistura de barro com resina de plantas), apresentando um orifício com diâmetro suficiente para a

passagem de uma única abelha por vez, e geralmente ornamentado com sulcos radiais (NUNES *et al.*, 2007).

Nas espécies generalistas, como os Meliponini, os indivíduos têm habilidade física, fisiológica e comportamental para visitar vários tipos de flores, sendo numericamente dominantes entre os insetos visitantes florais (RAMALHO, 2004). As abelhas sem ferrão coletam o pólen e néctar saindo à procura de flores poliníferas e nectaríferas, deixando uma pequena trilha de cheiro na fonte de alimento encontrada. As campeiras chegam a colônia e distribuem alimentos para as outras operárias emitindo sons que indicam a distância da fonte, nesta a operária marca a flor com uma secreção glandular identificando a fonte de alimento (KERR *et al.*, 1996).

A atividade de forrageio das melíponas sofre influência de diversos fatores abióticos, que isolados ou em conjunto, afetam a atividade de voo, tais como a temperatura, umidade relativa, a intensidade luminosa e a velocidade do vento (KLEINERT *et al.*, 2009). Para os meliponíneos, há duas premissas para o forrageio: o deslocamento com ponto central, isto é, a colônia, e a necessidade de voltar a essa, o que torna crítico o equacionamento do custo de forrageio associado à distância da fonte floral. Para esses forrageadores tão pequenos, com consumo elevado de energia durante o voo, a distância de forrageamento depende da capacidade de estoque de néctar no papo (KLEINERT *et al.*, 2009).

O surgimento de um novo ninho de *M. quadrifasciata* é gradativo e a colônia “filha” fica dependente da colônia mãe por algum tempo, até que o novo ninho fique estruturado e independente para a sobrevivência. Dessa forma a proximidade entre a colônia mãe e filha é fundamental, pois quando o ninho estiver pronto para receber a nova rainha ela migra da colônia mãe para o novo local onde se desenvolverá a colônia filha; com ela partem mais operárias e, finalmente, a colônia se estabelece independentemente da colônia mãe (AIDAR, 1996).

Um comportamento importante nas colmeias de *Melipona* é que a rainha

fisogástrica possui o abdome muito desenvolvido, o que a torna muito pesada para voar. Esse aspecto gera restrições diretas no padrão de dispersão das populações (GILLOTT, 1980). Ainda que a distância máxima de voo dessas espécies esteja na faixa de dois quilômetros de raio ao redor da colônia, a fundação de novos ninhos é limitada a poucas centenas de metros ao redor da colônia mãe, diferente do processo de nidificação no gênero *Apis*, por exemplo, onde a enxameagem é realizada por um grande número de operárias juntamente com a rainha antiga e pode se deslocar por muitos quilômetros (ARAÚJO, 1997).

Diversos autores consideram *M. quadrifasciata* uma espécie generalista. Antonini *et al.* (2006), em pesquisa realizada em uma área preservada no Estado de Minas Gerais, verificaram a coleta de pólen por *M. quadrifasciata* em 19 espécies de planta, dados que concordam com Absy *et al.* (1984) que analisaram o pólen coletado em diversos ninhos de *Melipona*, tendo constatado a utilização de mais de 10 espécies de plantas.

Os meliponíneos por serem espécies generalistas exercem bastante influencia no sucesso reprodutível das árvores da Mata Atlântica, desempenhando um papel relevante na regeneração natural da floresta (RAMALHO, 2004). Segundo Kerr (1994), de 40 a 90% das árvores das florestas tropicais são polinizadas por meliponíneos. Essas espécies desempenham um importante papel como agentes polinizadores em diversos ecossistemas brasileiros (KERR, 1987; NOGUEIRA-NETO, 1997; TAVARES *et al.*, 1999; SILVEIRA *et al.*, 2002).

Em função da grande fragmentação florestal, algumas populações de meliponíneos estão isoladas devido a grande distância entre estes fragmentos, comprometendo a diversidade gênica das abelhas e reduzindo a disponibilidade dos recursos tróficos, o que pode levar à perda de colônias naturais (CARVALHO *et al.*, 2003). Segundo Araujo *et al.* (2004) algumas espécies de *Melipona* encontram-se ameaçadas de extinção, especialmente pela perda de pequenas populações locais por efeito de deriva genética, quase sempre relacionada a pressões antrópicas.

Ao longo de várias gerações as frequências alélicas populacionais flutuam de uma geração para outra por efeito de deriva genética, um efeito estocástico relacionado diretamente ao tamanho efetivo das populações, ocasionando nos demes a perda da diversidade genética e fixação de alelos dentro da população e, conseqüentemente, redução do potencial evolutivo. Além da deriva genética, a endogamia – cruzamento de indivíduos aparentados – também é um fator que contribui para a diminuição da variabilidade genética em pequenas populações locais, o que provoca o aumento de similaridade dos indivíduos de uma população, elevando a homoziguidade (FRANKHAM *et al.*, 2008).

Efeitos da seleção natural sobre populações locais também devem ser considerados em estudos que avaliam a estrutura genética populacional. Em populações fechadas as frequências alélicas mudam predominantemente através da seleção e deriva genética. Em populações pequenas a deriva genética é a força dominante que causa mudanças na frequência alélica, mesmo sujeitos à seleção natural (FRANKHAM *et al.*, 2008).

Na estrutura genética dos meliponíneos, assim como nos demais himenópteros, os machos são geralmente haplóides e as fêmeas diplóides, fenômeno denominado haplodiploidia, em que os machos são originados partenogeneticamente pela fêmea (partenogênese arrenótoca) (KERR, 1950). No entanto, uma exceção a essa regra é determinada por conta de um *locus* denominado *Xo* que, quando em homozigose (xo^1xo^1 , por exemplo), induz ao desenvolvimento de machos diplóides. Então se uma rainha de *Melipona* com alelos sexuais xo^1xo^2 acasalar com um macho xo^1 ou xo^2 , terá 50% de sua prole diplóide composta por machos (KERR, 1987; NASCIMENTO, 1996). De tal modo que estes machos inviáveis para a colônia são eliminados pelas operárias e, em alguns casos com grande produção de machos diplóides, as rainhas também são sacrificadas (Kerr *et al.*, 1996).

Em Meliponini, a deriva genética é um fator importante na perda de populações locais, uma vez que as populações de *Melipona* são sensíveis à deriva

genética especificamente pela homozigose no *locus* Xo de determinação sexual (CARVALHO *et al.*, 1995; ARAÚJO, 2002; 2004). A perda de alelos e extinção de populações locais foi documentada por Kerr e Vencovsky (1982), que concluíram que uma população de *Melipona* deveria conter no mínimo 44 colônias para reverter o risco de uma rápida extinção.

A avaliação da variabilidade genética da espécie é um importante parâmetro para a definição de programas de manejo e conservação de espécies, principalmente para aquelas sob forte pressão antrópica. Além disso, a baixa diversidade genética geralmente leva ao aumento dos níveis de endogamia, o que pode reduzir a aptidão de indivíduos e populações. Uma avaliação da diversidade genética é, portanto, central para a genética de populações e tem muito importantes aplicações em biologia da conservação (FREELAND, 2005).

1.2 – Técnicas Moleculares

Os grandes avanços na biologia molecular nas últimas décadas permitiram o desenvolvimento de uma variedade de métodos que auxiliam as pesquisas em genética da conservação. Dentre as técnicas moleculares com base na reação de cadeia de polimerase (PCR), a técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) atualmente vem sendo empregada em estudos genéticos pela detecção de polimorfismo de tamanho de fragmentos utilizando enzimas de restrição. De acordo com Ferreira e Grattapaglia (1998) os marcadores obtidos com base em RFLP possuem expressão co-dominante, ou seja, em cada loco estudado é possível identificar genótipos heterozigóticos e homozigóticos.

A técnica PCR consiste, fundamentalmente, na amplificação de fragmentos de DNA. Para este procedimento, utiliza-se um equipamento conhecido como termociclador, que submete a amostra e reagente a ciclos subsequentes de temperatura variáveis, que permitem a desnaturação da molécula de DNA, o anelamento dos *primers* e a extensão da síntese de uma nova fita catalisada por

uma enzima DNA Polimerase termoresistente (TORRES *et al.*, 2004).

Francisco *et al* (2001) utilizaram 17 enzimas de restrição para caracterizar, cinco espécies de *Plebeia*, utilizando marcadores PCR/RFLP, sendo identificados 30 sítios específicos de restrição, demonstrando alta variabilidade genética entre as espécies analisadas. Souza *et al* (2008) utilizaram o método de PCR/RFLP com cinco enzimas de restrição (Bgl II, Dra I, Mbo I, Taq I and Vsp I) para identificar um marcador genético para subespécies e detecção de colônias híbridas de *Melipona quadrifasciata*. Estes autores concluíram que apenas a enzima Vsp I apresentou padrão de restrição capaz de diferenciar *M. q. quadrifasciata* de *M. q. anthidioides*. No entanto, Morreto e Arias (2005) conseguiram identificar padrões de restrição diferentes entre as duas subespécies com a enzima Bgl II.

1.3 – A morfometria Geométrica

A análise morfométrica é utilizada para avaliar os padrões de variação geográfica e diferenciação intraespecífica em abelhas (RUTTNER, 1988). A definição da forma de uma estrutura biológica é regida por processos que operam em diferentes escalas e níveis organizacionais de complexidade. O aspecto fenotípico macroscópico de uma estrutura biológica é, portanto, o resultado das interações entre regras morfogenéticas e os mecanismos extrínsecos relacionados aos fenômenos ecológicos e às forças evolutivas estocásticas e/ou determinísticas (LEVIN, 1992).

Os ecólogos discutem que a forma e o tamanho de um organismo, devem caracterizar os aspectos como alimentação, microhabitat, pressão seletiva, competição e predação, visto que a forma e o tamanho de um organismo é o resultado de sua evolução. Os geneticistas estimam a hereditariedade de caracteres morfométricos, pois podem quantificar e separar as influências genotípicas das ambientais sob o fenótipo de uma população (PERES *et al.*, 1995).

Estimativas de herdabilidade para caracteres morfológicos, utilizando diversas metodologias, têm se mostrado elevados, especialmente para os caracteres de tamanho ($h^2 > 0,6$) o que demonstra que tais caracteres são bons indicadores de processos evolutivos atuando nas populações de abelhas (DINIZ-FILHO e BINI, 1994), e que possuem elevado componente genético para avaliar as estruturas populacionais (DINIZ-FILHO e PIGINATA, 1994). As asas dos insetos são estruturas laminares ótimas para análise morfométrica bidimensional, uma vez que são planas, possibilitando a obtenção de grande parte das informações (NUNES *et al.*, 2007). Outro fator bastante positivo, do ponto de vista analítico, é a presença de diversos marcos anatômicos presentes, principalmente, nas interseções entre as nervuras. Pouco se sabe, no entanto, sobre as implicações funcionais da variação morfológica das asas nos insetos (GRODNITSKY, 2000).

Nos meliponíneos a maior parte da variação morfológica ocorre de forma independente, já que em abelhas sociais o tamanho do corpo das operárias é explicado pela adaptação relacionada a atividade de forrageio e exploração de recursos florais (BAUMGARTNER e ROUBIK, 1989).

Durante o rápido desenvolvimento da morfometria geométrica, nas três últimas décadas, tornou-se mais consistente teórica e tecnicamente. Questões como “qual seria o melhor método para a remoção do efeito do tamanho generalizado” passaram a ser problemas do passado, uma vez que as técnicas de morfometria geométrica removem instantaneamente os efeitos de tamanho. Inicialmente um dos problemas em se utilizar estas novas técnicas eram as dificuldades matemáticas e computacionais subjacentes (ROHLF e BOOKSTEIN, 1987). No entanto, nos últimos anos, diversos programas para microcomputadores foram desenvolvidos e são disponibilizados gratuitamente. Além disso, o volume de informações bibliográficas sobre morfometria geométrica vem aumentando gradativamente, expondo de forma adequada a teoria, métodos e aplicações em investigações biológicas (MONTEIRO e REIS, 1999).

Entre os métodos diretos utilizados, se destaca a utilização de marcos

anatômicos para representar as formas de uma maneira compreensiva por meio dados numéricos médios. Os dados podem ser obtidos através de coordenadas médias de marcos distribuídos perifericamente, ou dentro das estruturas analisadas, ou ainda por meio das distâncias entre marcos anatômicos escolhidos diretamente para cada espécie (DI MARÉ e CORSEUIL, 2004). Estas coordenadas possibilitam a utilização de várias ferramentas estatísticas, como análise de componentes principais, de variáveis canônicas, ANOVA (analysis of variance – análise de variância), MANOVA dentre outros, e a escolha vai depender dos objetivos do estudo.

Para detectar padrões entre indivíduos ou conjunto de variáveis a ACP (análise de componentes principais) transforma o conjunto de variáveis originais em um novo conjunto de dados, os quais são deduzidos em ordem decrescente de importância, sendo que o primeiro componente contém o máximo possível de variação dos dados originais (MONTEIRO e REIS, 1999). No caso da análise de variáveis canônicas (AVC) os dados são trabalhados com a delimitação de grupos. Dessa forma segundo Monteiro e Reis (1999) a AVC constrói uma matriz que quantifica a variação dentro do grupo e entre os grupos, objetivando maximizar a variação entre os grupos relativa à variação dentro dos grupos.

Em análises realizadas por Silva (2006) para o gênero *Plebeia*, estudando seis espécies diferentes, foi observada uma grande divergência dentro dos grupos, sendo possível a diferenciação de 93,4% dos indivíduos corretamente nos testes de validação cruzada. A técnica morfométrica também demonstrou ser eficiente na discriminação de indivíduos de diferentes populações de *Nannotrigona testaceicornis* (MENDES *et al.*, 2007).

Nunes *et al.* (2008), por meio de análise morfométrica, estudaram populações de *Melipona quadrifasciata* da região semiárida da Bahia, identificando três grupos distintos de acordo com a distribuição geográfica. Os autores ainda concluíram que não existia divergência genética significativa entre estas populações.

O crescente interesse de pesquisadores na utilização de técnicas moleculares tem provocado uma redução no número de pesquisadores na área de morfometria. No entanto, a morfometria geométrica exige menor investimento laboratorial, baixo custo de análise, especialmente pelo desenvolvimento de vários softwares gratuitos, usados na identificação de espécimes, em estudos de variação populacional, biogeografia, evolução, assimetria flutuante, além do crescente número de estudos associando dados moleculares com morfometria geométrica (ARAÚJO, 2010).

1.4 – A região da foz do Rio São Francisco

A região da foz do Rio São Francisco corresponde à região dos municípios de Brejo Grande e Pacatuba no Estado de Sergipe e Piaçabuçu no Estado de Alagoas. O litoral norte do Estado de Sergipe é caracterizado por ecossistemas de dunas, restingas, manguezais, ilhas e lagoas; além de possuir remanescentes de Mata Atlântica, especialmente na APA (área de proteção ambiental) Litoral Norte, área de conservação que faz sobreposição com a área da Rebio (Reserva Biológica Santa Isabel) e compreende um trecho de 10Km de largura delimitados pelos Rios Japarutuba e São Francisco (SILVA e SOUZA, 2010).

No município de Brejo Grande a vegetação está representada por espécies pertencentes às formações pioneiras, apresentando recursos florísticos com espécies típicas, características dos ambientes de Áreas de Influência Marinha (Restinga), de Influência Fluviomarinha (Mangue) e de Influência Fluvial (ALVES *et al.*, 2007). A predominância de monocultura de coco e pecuária, além do grande cultivo de arroz, vem alterando a paisagem da região. Projetos em tecnologias sociais estão possibilitando na região de Brejo Grande a inserção de trabalhos com meliponíneos (meliponicultura), visto que membros da comunidade local já possuem conhecimentos de apicultura, com a produção de mel e pólen apícola.

Piaçabuçu, município alagoano também pertencente à região da foz do Rio São Francisco, e Brejo Grande –SE, possuem áreas fitoecológicas similares,

com uma floresta estacional decidual. Sua área de cobertura encontra-se bastante descaracterizada em sua originalidade, seja no total desmatamento para o cultivo de coqueirais, fazendas e currais privativos do gado bovino. Caracteriza-se também por uma sucessão de interflúvios alinhados pelo Nordeste/Sudeste, e ligeiramente em forma de “S”, mantendo-se a 3m acima do nível do mar, com decaimento no sentido interior/litoral. Tanto esse suave declínio quanto a sucessão de interflúvios (cordões), indicam o recuo paulatino do nível do mar, na sua última fase regressiva ocorrida no quaternário (SOUZA, 2000). Em Piaçabuçu encontra-se a APA de Piaçabuçu, área de conservação ambiental de importante relevância para a Região.

O fato de todos os ninhos de mandaçaia encontrados na região da foz do rio São Francisco por Souza *et al* (2006) estarem localizados em troncos de coqueiro gera grande preocupação em termos de conservação, em função dos seguintes aspectos: 1 – coqueiros antigos são geralmente substituídos por novos, visando o aumento da produtividade mediante o controle da broca do coqueiro e doenças por eles transmitida, reduzindo dessa forma os locais de nidificação das abelhas mandaçaia; 2 – a existência de número populacional expressivo de abelhas mandaçaia na região evidenciada pela detecção de 13 ninhos em 90 coqueiros investigados; 3 – apesar dessas abelhas terem sido identificadas como *M. q. quadrifasciata*, o padrão de bandas terciais não coincide totalmente com o padrão esperado para essa subespécie; 4 – em se tratando de uma região delimitada por um rio de grande porte e por nenhum estudo ter sido realizado com abelhas mandaçaia na região da foz do rio São Francisco em sua margem pertencente ao Estado de Alagoas, não se sabe se o rio representaria uma barreira geográfica para essa espécie; 5 – ações de conservação e uso racional para essas abelhas ainda não foram empreendidos na região e só poderiam ser realizados de forma sustentável com o conhecimento das populações de abelhas e das demais variáveis relacionadas a sua conservação, incluindo as populações humanas e uso do solo da região.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Geral

Avaliar a identidade das populações de abelhas mandaçaia (*Melipona* spp.) do litoral norte do Estado de Sergipe por meio de técnicas moleculares e morfométricas, e verificar a possível barreira geográfica representada pelo Rio São Francisco; como subsidio para a conservação e ampliação do conhecimento sobre o grupo no Estado de Sergipe.

2.2– Específicos

- i - Avaliar a identidade das abelhas, com base em critérios morfológicos (morfometria geométrica) e moleculares(PCR/RFLP);
- ii - Avaliar a ocorrência e a distribuição espacial dos ninhos de *Melipona* spp. em uma área de 30 hectares;
- iii - Verificar, a possível barreira geográfica representada pelo Rio São Francisco para as espécies desse gênero;

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Área de Estudo

O primeiro local de estudo está localizado no povoado Cabeço, no município Brejo Grande (Latitude: S 10°28'471", Longitude: O 36°26'212"), localizado à margem do Rio São Francisco em Sergipe, numa região típica de restinga e coqueirais (*Cocos nucifera* L.).



Figura 2: Região da Foz do Rio São Francisco evidenciando os três pontos de coleta: Brejo Grande - SE, Ilha da Criminosa - SE e Piaçabuçu - AL.

O segundo ponto de coleta está localizado no município de Piaçabuçu - AL (Latitude: S 10°26'960", Longitude: O 36°24'806"), e um ponto intermediário formado pela Ilha da Criminosa (Latitude: S 10°28'470", Longitude: O 36°24'687") localizada entre Brejo Grande e Piaçabuçu, ainda no território de Sergipe. Os pontos localizados na ilha apresentam fisionomia distinta da região de Brejo Grande e Piaçabuçu, sendo formados principalmente por terrenos alagados caracterizados como várzeas, utilizadas pelos moradores locais atualmente para o plantio de coqueiros (nas regiões elevadas) e cobertas por aningas (*Montrichardia arborescens* L.) nas regiões mais baixas, sendo também historicamente utilizadas para o plantio de arroz com técnicas de represamento.

3.2 – Coleta de material

A busca por ninhos foi feita em uma área total de aproximadamente 30 hectares distribuídos nas três localidades mencionadas. O procedimento de rastreamento foi percorrendo os troncos de coqueiro e outros potenciais locais de nidificação ao longo da área delimitada previamente, utilizando o mesmo esforço amostral (03 rastreadores). Cada colônia foi georreferenciada e 10 espécimes foram coletadas com o auxílio de rede entomológica e registrado as características de atividade, morfologia e altura dos ninhos.

Foram capturadas 10 operárias de cada ninho. As abelhas capturadas foram colocadas em recipientes numerados, para representar cada colônia, contendo álcool 70% para a conservação do material. No retorno ao laboratório todos os recipientes foram refrigerados a -20°C em freezer e mantidos assim até a extração de DNA.

3.3 - Análises moleculares

3.3.1 - Extração de DNA

Para as análises moleculares da população da foz do Rio São Francisco foram utilizados 10 indivíduos de cada colônia. Para efeito de comparação foram obtidos 10 espécimes de *M. mandacaia*, *M. q. quadrifasciata* e *M. quadrifasciata anthidioides*, junto a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em Cruz das Almas - BA.

Com base no protocolo de Waldschmidt *et al* (1997) para procedimento de extração de DNA utilizou-se uma operária adulta conservada em microtubo com 1,5 mL em álcool 70% e acondicionada em freezer -20°C, posteriormente foi extraído o abdome e asas, em seguida o material foi macerado com pistilos e homogeneizado com tampão de extração (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, contendo 2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA e 100 µg/ml proteinase K). As amostras foram desproteinizadas

duas vezes com fenol-clorofórmio (proporção 1:1). Após a desproteinização as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos. O ácido nucléico foi precipitado pela adição de um volume de isopropanol frio (proporção 1:1) e incubado a -20°C por 30 minutos. Em seguida centrifugou-se a 12.000 rpm por 30 minutos, formando o *pelet* no fundo do tubo, o qual foi lavado com álcool 70% e ressuspensão em 25 μL de TE (10 nM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA PH-8); e armazenado a -20°C .

Para verificar da integridade do DNA extraído (Figura 3) foi utilizado 1 μL da solução de DNA, 9 μL de água ultra pura e 2 μL de corante BlueOrange para cada amostra, submetidos a eletroforese com TBE 1X (89mM Tris-base, 89mM ácido bórico e 2mM EDTA dissódico) em gel de Agarose (0,8%) juntamente com o padrão de peso molecular LowRanger 100bp (Norgen®).

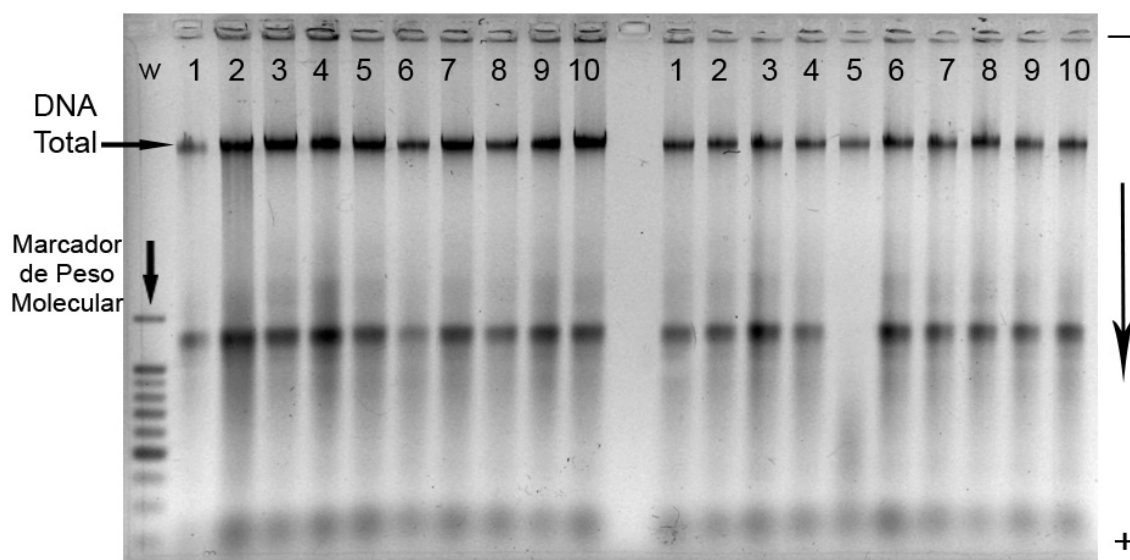


Figura 3: Ilustração do gel de agarose (0,8%) para verificação da integridade de DNA com Marcador de peso molecular e sentido da corrente elétrica.

A quantificação do DNA foi feita por meio de método colorimétrico usando o nanocolorímetro Qubit (Invitrogen ®) utilizando 1 μL de solução com DNA extraído diluída em 199 μL de mix preparado com Buffers BrodRanger que acompanham o kit do Qubit. Após quantificação a solução de DNA de cada amostra foi padronizada a

concentração de aproximadamente 35 ng/ μ L.

3.3.2 - Identificação Genética das espécies pelo método PCR/RFLP

A partir do DNA purificado e quantificado foi realizada uma reação de amplificação por PCR específica para a região mitocondrial do gene citocromo b usando os primers 5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3' (*forward*) e 5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3' (*reverse*) descritos por Crozier *et al.* (1991). As reações foram desenvolvidas em um volume final de 30 μ L contendo 1,5 μ L de cada primer (concentração 5 μ M), 15 μ L de Taq Master Mix RED com 1,5mM MgCl₂ (Amplicon ®), 10,5 μ L de água ultra pura e 1,5 μ L de DNA extraído a concentração de 35ng/ μ L. Os ciclos de amplificação foram repetidos 45 vezes seguindo o protocolo básico de 15 segundos a 94°C para desnaturação, 30 segundos a 37°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C para extensão, precedido de um estágio de dois minutos a 94°C e finalizado a um estágio de 5 minutos a 72°C. A digestão dos produtos de amplificação do mtDNA do gene citocromo b foi realizada utilizando 20 μ L para o volume total da reação, utilizando 4 μ L do produto de PCR e 6 unidades das enzimas de restrição em tampão apropriado. A digestão enzimática ocorreu durante 2 horas a 37°C com duas enzimas de restrição (Mbo II, e Vsp I) e 2 horas a 65°C com a enzima Taq I. Os fragmentos foram submetidos a eletroforese em Tampão TBE (Tris-borato 89mM, EDTA 2mM, pH 8,0) e em gel de agarose a 2%, a 100V . Em seguida, o gel foi corado em solução de TBE 1X com brometo de etídio e revelados em transluminador (sob luz UV) e fotografados por sistema de foto-documentação.

A seleção das bandas e identificação do peso molecular foi realizada no software GelAnalyzer versão 2010 (LAZAR, 2010).

3.4 - Análises morfométricas

Para as análises morfométricas também foram utilizados 10 indivíduos de cada colônia; foi isolada a asa esquerda anterior de cada espécime (Figura 4), utilizando tesoura e pinças entomológicas. Sob estereomicroscópio essas asas foram montadas em lâminas identificadas com os dados referentes às amostras. As fotomicrografias digitais das asas anteriores foram organizadas no software TpsUtil e mensuradas utilizando o programa TpsDig2 versão 2.10 (ROHLF, 2006). A escolha das estruturas anatômicas para esta análise foi realizada levando-se em conta a forma geométrica da estrutura que pudesse ser bem apresentada num plano bidimensional (Figura 5).



Figura 4: Asa anterior esquerda de *Melipona* coletada em Brejo Grande - SE

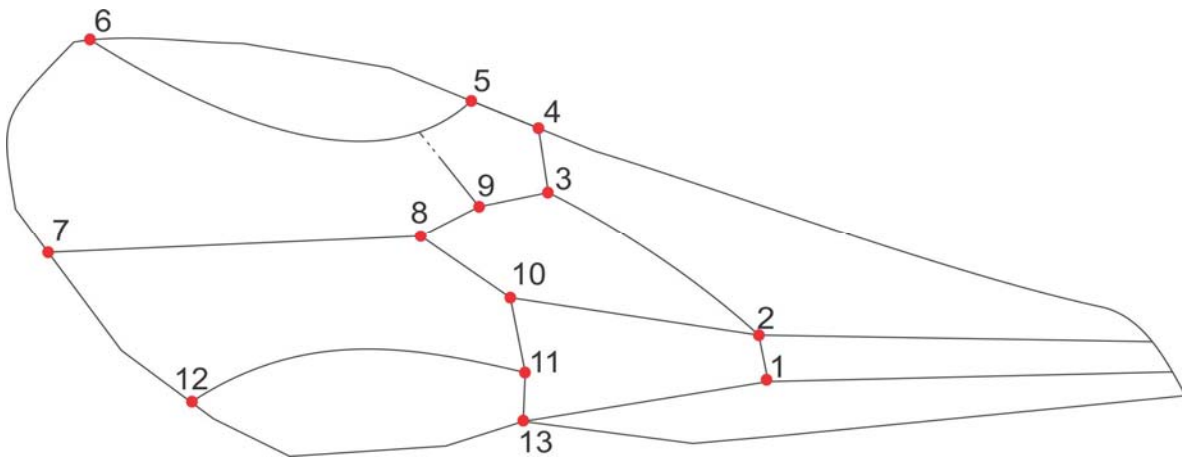


Figura 5 - Morfologia da asa esquerda anterior com os marcos anatômicos utilizados nas análises morfométricas.

Os marcos anatômicos foram transformados em coordenadas cartesianas e analisados pelo método de superposição ortogonal pelos quadrados mínimos. As coordenadas cartesianas dos marcos anatômicos de cada conjunto amostral foram adquiridas e salvas, usando-se o programa TpsDig2 (ROHLF, 2006).

Estas coordenadas foram reajustadas por superposição ortogonal por meio de configurações de critério dos quadrados mínimos utilizando o programa MorphoJ (KLINGENBERG, 2008). A técnica utilizada para superposição minimiza a soma do quadrado das distâncias entre os marcos anatômicos homólogos, por parâmetros que rotacionam, transladam e proporcionalizam as configurações. A partir das coordenadas resultantes foram obtidas as formas médias para cada unidade amostral.

Após os ajustes de tamanho, posição e orientação realizados, e geração de uma matriz de Covariância foi realizada a análise de Componentes Principais e uma Análise de Variáveis Canônicas para identificação de grupos com base na utilização de dez espécimes de *M. mandacaia*, *M. q. quadrifasciata* e *M. quadrifasciata anthidioides*, fornecidas pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em Cruz das Almas – BA comparadas às melíponas da região da foz do Rio São Francisco. Além da constituição de grupos, o grau de diversidade populacional foi observado pela Análise de variáveis canônicas. Para identificar a existência de diferença entre os grupos, para o tamanho e forma dos indivíduos, foram realizadas análises de variância (ANOVA) de Procrustes.

Uma análise de validação cruzada entre os scores de Componentes principais e Variáveis canônicas, foi realizada com software Estatística R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008) possibilitando verificar a correlação de indivíduos com seus respectivos ninhos.

Utilizando o programa NTSYSpc (ROHLF, 2000), foi aplicado o teste de Mantel para correlação, utilizando-se as matrizes de distâncias de forma de Procrustes, e as distâncias geográficas entre as colônias. As matrizes de distâncias

de Procrustes entre as colônias foram também analisadas pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), que resultou em arranjos a partir das distâncias de forma das asas entre as colônias, e foi considerado nas análises desde que atinja coeficiente de correlação cofenética igual ou superior a 0,7.

3.5 - Padrão de distribuição espacial dos ninhos

Após o completo rastreamento de cada área e marcação dos ninhos, foram tomadas as distâncias entre ninhos e criada uma matriz triangular das distâncias. A qual foi utilizada para análise de correlação de Mantel.

O padrão de agregação dos ninhos de mandaçaia foi determinado calculando-se o índice de agregação (R) por meio do método do vizinho mais próximo para testar a variação do Índice de Agregação (R) de Clark e Evans (1954), que mede o desvio entre o afastamento real dos pontos com relação à expectativa $r(E)$ de distribuição aleatória, dada por

$$r(E) = \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{\sqrt{p}}$$

O cálculo da distância entre os pontos na distribuição observada a partir dos dados de distância dos vizinhos mais próximos resulta na média $r(A)$, em que

$$r(A) = \frac{\sum ri}{n}$$

onde n é o número de ninhos observados. O padrão de distribuição então é dado por

$$R = \frac{r(A)}{r(E)}$$

sendo a sua variação $0 \leq R \leq 2,149$.

Portanto, quando $R= 0$, existe uma situação extrema de agregação; quando $R= 2,149$ a distribuição é completamente uniforme (reticulado hexagonal) e quando $R= 1$, o padrão de distribuição é aleatório. Além de serem analisadas as distâncias mínimas entre ninhos, também foram medidas a distância entre o local em que o ninho estava alojado e o coqueiro mais próximo, independente desse ter ou não ninho; para que possa ser realizada a comparação entre o padrão de agregação dos ninhos e o padrão de agregação dos coqueiros.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Identidade e estrutura populacional

A análise morfométrica foi realizada utilizando as abelhas mandaçaia coletadas na foz do rio São Francisco (representada nesse trabalho pela sigla FOZ). Estas foram comparadas com espécimes identificadas de *M. q. anthidioides* (ANTHIDIOIDES), *M. q. quadrifasciata* (QUADRIFASCIATA) e *M. mandacaia* (MANDACAIA).

A análise de componentes principais (Figura 6) reduziu os dados em duas variáveis mais representativas a partir da eliminação de sobreposição, gerando novos componentes, em que o primeiro componente explica a maior variação existente, o segundo a segunda maior variação, e assim sucessivamente. Assim observamos a formação de dois grupos bem definidos. O primeiro em pontos vermelhos composto pelos espécimes de *M. mandacaia* e um segundo grupo composto por *M. q. quadrifasciata* (pontos azuis), *M. q. anthidioides* (pontos verdes) e os espécimes coletados na Foz do Rio São Francisco (pontos pretos). Dessa forma, esta análise exploratória separa claramente a *Melipona mandacaia* das demais.

A Análise de Componentes Principais (ACP) não requer um agrupamento *a priori*, pois é uma técnica de ordenação exploratória, possibilitando verificar a presença de grupos distintos em um conjunto de dados (CAVALCANTE e LOPES, 1998).

A análise de variável canônica (AVC) foi utilizada para distinguir as variações dentro do grupo, que é semelhante a Análise dos Componentes Principais, exceto pela delimitação dos dados por grupo; permitindo, assim, identificar a variação entre e dentro dos grupos e formar agrupamento *a priori* (CAVALCANTE e LOPES, 1998). O resultado da análise de variáveis canônicas permitiu definir nitidamente o grupo a que pertence as melíponas coletadas. Na figura 7 pode-se verificar a separação entre os três grupos utilizados como

parâmetro, com o grupo das abelhas da FOZ sobreposto ao formado pelas abelhas *M. q. quadrifasciata*.

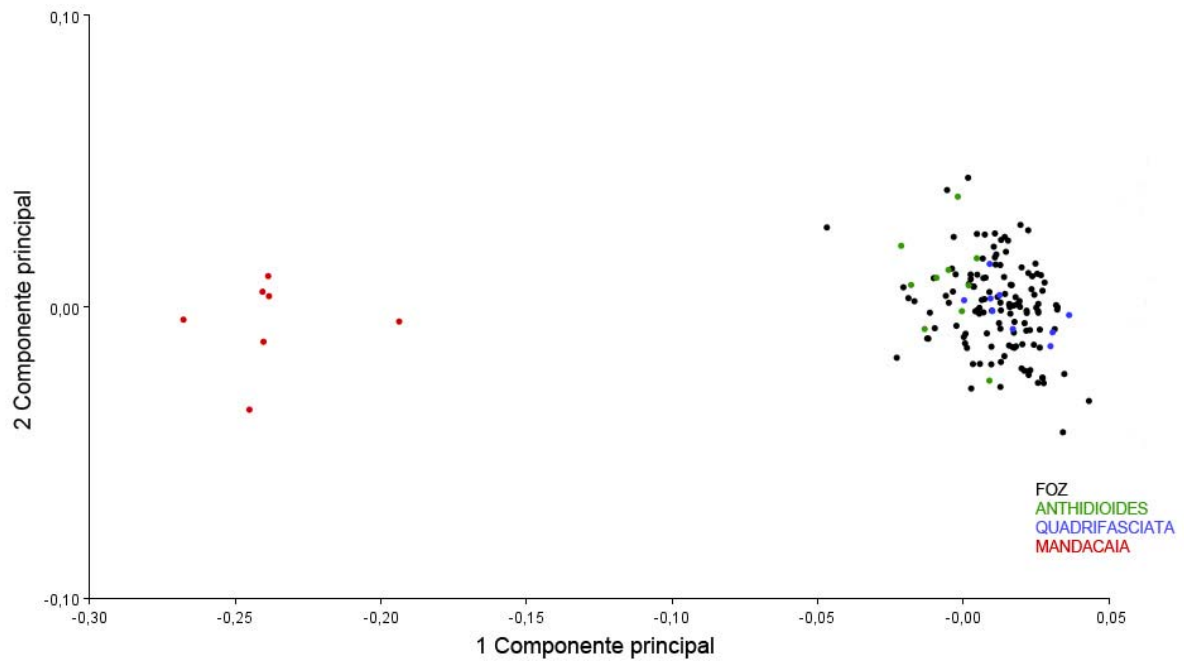


Figura 6: Análise de Componentes Principais comparando as colônias da Foz do São Francisco (em preto), *M. q. anthidioides*(Verde), *M. q. quadrifasciata* (Azul) e *M. mandacaia*(Vermelho).

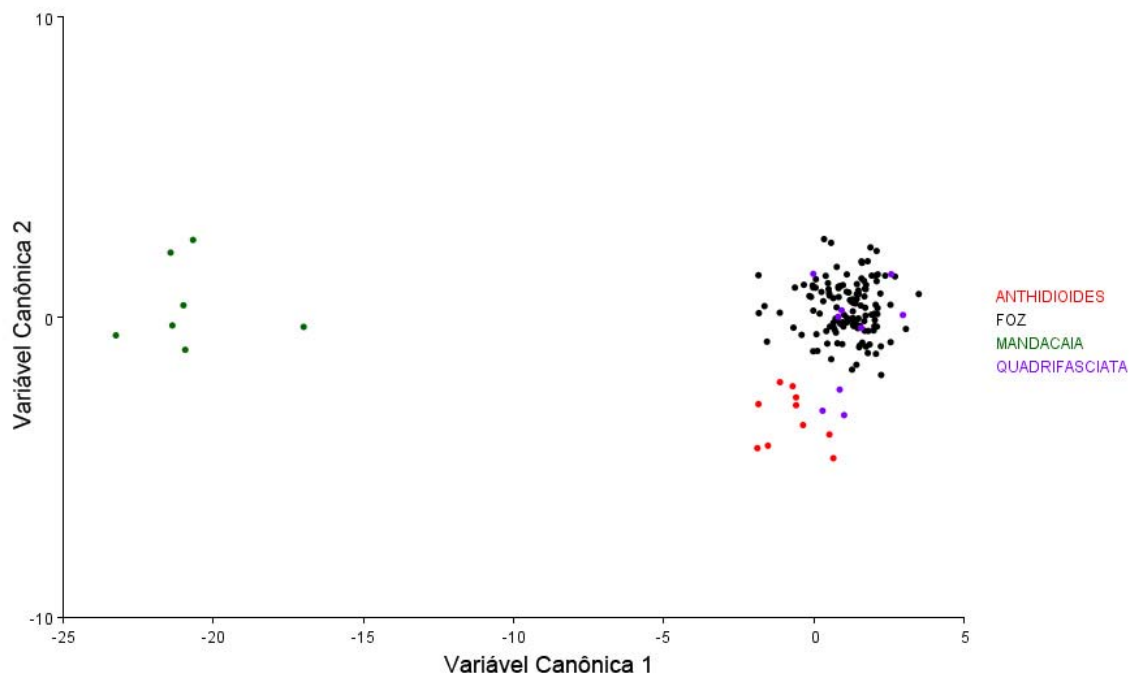


Figura 7: Análise das Variáveis Canônicas comparando os grupos de abelhas, Foz do São Francisco, *M. q. anthidioides*, *M. q. quadrifasciata* e *M. mandacaia*.

O dendograma gerado pela análise de agrupamento UPGMA mostra as relações multidimensionais para o conjunto de observações. A análise resultou na confirmação de que a população de melíponas da foz do Rio São Francisco é *M. q. quadrifasciata*, obtendo um índice de correlação cofenética de 0,99 (figura 8).

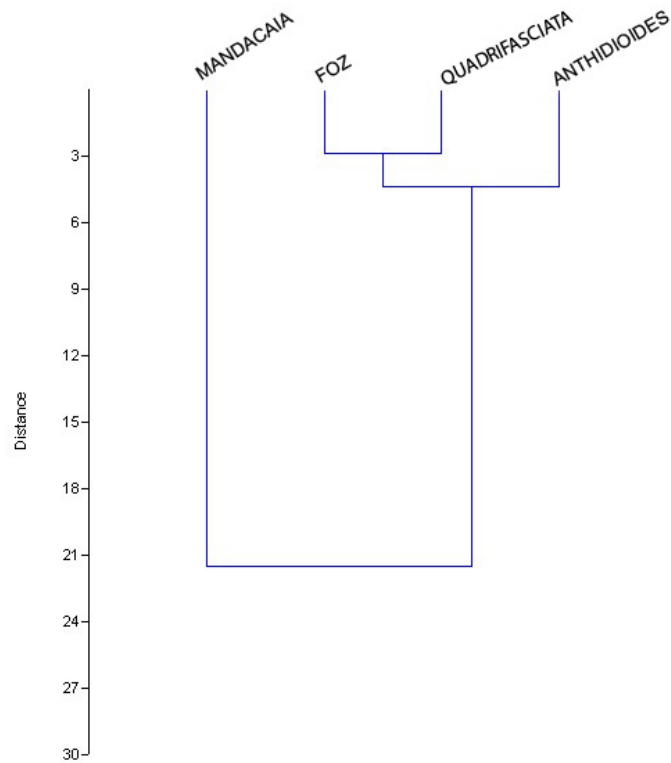


Figura 8: Dendrograma dos grupos de abelhas com índice de correlação cofenética 0,99, identificando o grupo em que as abelhas da FOZ estão inseridas.

A definição de subespécies entre *M. q. quadrifasciata* e *M. q. anthidioides* com base nos caracteres morfológicos está no padrão de bandas tergais, em que são contínuas em *M. q. quadrifasciata* e interrompidas em *M. q. anthidioides*. Porém, Moure (1975) identificou abelhas com padrões fenotípicos intermediários, caracterizando indivíduos híbridos. Este fato gerou dúvida quanto a identidade da mandaçaia encontrada na foz do Rio São Francisco (SOUSA *et al.*, 2006), pois as primeiras listras tergais aparentavam ser interrompidas (Figura 9). No entanto Batalha-Filho *et al.* (2009) relatou a ocorrência de *M. q. quadrifasciata* no estado de Sergipe. O que corrobora com a confirmação da identidade da abelha Mandaçaia da foz, como *M. q. quadrifasciata*, evidenciada na análise UPGMA e análise de variáveis canônicas.



Figura 9: Padrão de bandas terciais da abelha Mandaçaia encontra na foz do Rio São Francisco

A análise multivariada de um conjunto de caracteres fenotípicos pode ser considerada como um conjunto de métodos apropriados para esclarecer relações morfológicas de diferentes populações de diferentes espécies e para detectar semelhanças intraespecíficas, apesar do uso de caracteres morfológicos em estudos taxonômicos possa apresentar algumas desvantagens devido a sua herança poligênica e a considerável influência do ambiente (THORPE, 1976, 1987).

A análise de superposição ortogonal pelos quadrados mínimos (ANOVA Procrustes) demonstrou que comparação é significativa a diferença entre os grupos de abelhas quanto ao tamanho do centroide ($p=0,0008$) e quanto a forma ($p<0,0001$).

Tabela 1: ANOVA de Procrustes para o tamanho das asas entre os grupos analisados.

Efeito	SS	MS	df	F	P
Individual	2073669,39	691223,1299	3	5,9	0,0008
Residual	17588213,56	117254,7571	150		

Tabela 2: ANOVA de Procrustes para a forma das asas entre os grupos analisados.

Efeito	SS	MS	df	F	P
Individual	0,42547639	0,006446612	66	140,22	<0.0001
Residual	0,15171554	4,59744E-05	3300		

Para avaliar a identidade dos ninhos das *M. q. quadrifasciata* coletadas na foz foi realizada a análise de validação cruzada entre os scores de Componentes Principais e Variáveis Canônicas da população de *M. q. quadrifasciata*. A análise correlacionou os indivíduos com seus respectivos ninhos, identificando corretamente apenas 7% das abelhas às suas respectivas colônias. Esse resultado indica uma alta similaridade entre as abelhas dos diferentes ninhos, não existindo, portanto, variação morfométrica significativa entre as abelhas dos diferentes ninhos. O estudo realizado por Franco *et al.* (2008), com abelhas africanizadas conseguiu identificar, aproximadamente 98%, os grupos de abelhas entre 394 colônias utilizando a análise de validação cruzada, evidenciando a acurácia desta análise. Em estudos realizados com o gênero *Schwarziana* por Silva (2010), testes por indivíduos de validação cruzada identificaram de forma correta 70% das amostras de um total de 10 localidades,

Considerando que os caracteres morfológicos possuem alta herdabilidade e elevado componente genético (DINIZ-FILHO e PIGNATA, 1994), os indivíduos da população de *Melipona*, com base nas análises morfométricas, possuem um alto grau de parentesco e baixa variabilidade genética, o que poderia explicar a difícil ligação entre as abelhas e seus respectivos ninhos pela análise de validação cruzada..

A endogamia é o primeiro fato a ser observado em uma população pequena e com alto índice de similaridade. Em estudo feito Campos (1998) em pequenas populações locais de *Melipona rufiventris* e *Melipona modury* verificou que a redução populacional poderia estar levando a uma diminuição na variabilidade genética por endogamia e deriva genética.

A análise de PCR/RFLP foi realizada com 17 indivíduos, sendo 14 abelhas da região da foz do Rio São Francisco, um espécime de *M. q. anthidioides*, *M. q. quadrifasciata* e *M. mandacaia*. Após amplificação do DNA (Figura 10), foram selecionadas as amplificações com melhor definição de bandas, assim, onze indivíduos (indivíduos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12 e 13) foram escolhidos, sendo um de

cada colônia. O peso molecular das bandas visualizadas corresponde ao intervalo de 485 a 510 pares de base o que confirma a amplificação do gene citocromo b por Souza *et al.* (2008).

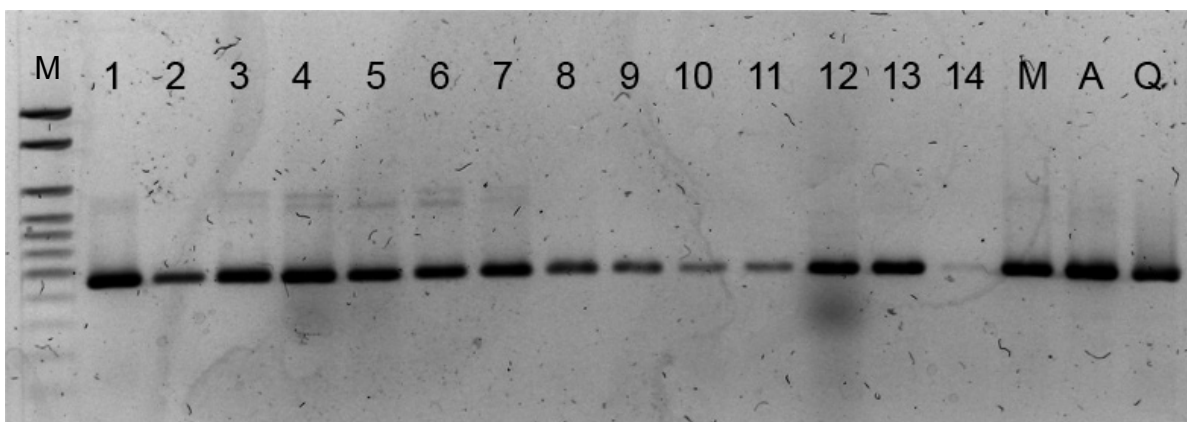


Figura 10: Gel em agarose (0,8%) da amplificação de DNA , visualizando as bandas de DNA de cada colônia (1 até 14) e as abelhas utilizadas como parâmetro (M – *Melipona mandacaia*, A – *Melipona quadrifasciata anthidioides* e Q – *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*).

Os fragmentos amplificados digeridos pela enzima de restrição Vsp I (Figura 11) gerou um padrão de haplótipos comum entre as abelhas da Foz do Rio São Francisco, sendo perceptível o corte do DNA em um único ponto, gerando assim dois fragmentos (350bp e 145bp) compatível com um dos haplótipos identificados por Souza *et al.*, (2008) para *M. q. quadrifasciata*.

Observando o padrão de restrição encontrado em *M. mandacaia* foi possível detectar que, apesar de ter ocorrido um único corte com a enzima Vsp I, assim como ocorreu as amostras de *M. quadrifasciata* de Brejo Grande, foram geradas três bandas nítidas (410bp, 305bp e 145bp), chamando atenção para a banda de maior peso molecular, que representa fragmentos não cortados pela enzima e que devem ser desconsiderados na análise. Em *M. q. anthidioides* o corte também foi definido em um único ponto, porém formando fragmento com pesos moleculares de 305bp e 163bp, enquanto em *M. q. quadrifasciata* a enzima Vsp I cortou em dois pontos gerando 3 bandas com pesos de 190bp, 175 bp e 130bp.

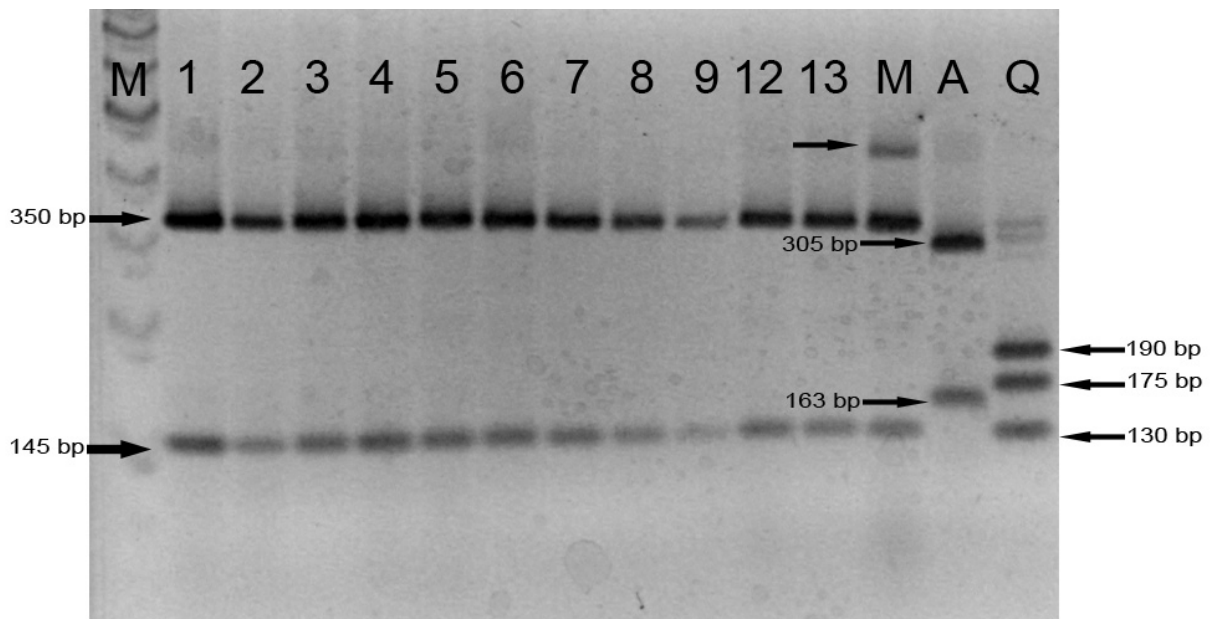


Figura 11: PCR-RFLP com enzima de restrição VSP I, visualizado em agarose (2%), observando as bandas de DNA de cada colônia (1 até 13) e as abelhas utilizadas como parâmetro (M – *Melipona mandacaia*, A – *Melipona quadrifasciata anthidioides* e Q – *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*).

O experimento com a enzima Mbo II (Figura 12) não gerou cortes no fragmento de DNA em todas as amostras de *Melipona* da região da foz do Rio São Francisco, assim as bandas mantiveram o peso molecular equivalente ao produto amplificado (485bp a 510bp). Situação diferente dos resultados obtidos por Souza *et al* (2008), que identificou dois haplótipos, um com bandas de 122 bp, 143 bp e 220 bp e outro com bandas 31 bp, 91 bp, 143 bp and 220 bp. Entretanto, o fragmento de DNA de *Melipona mandacaia* foi dividido em duas partes uma com peso molecular de 260bp e outra de 242bp; enquanto *M. q. anthidioides* e *M. q. quadrifasciata* também obtiveram um único corte dividindo em bandas de 320bp e 260bp.

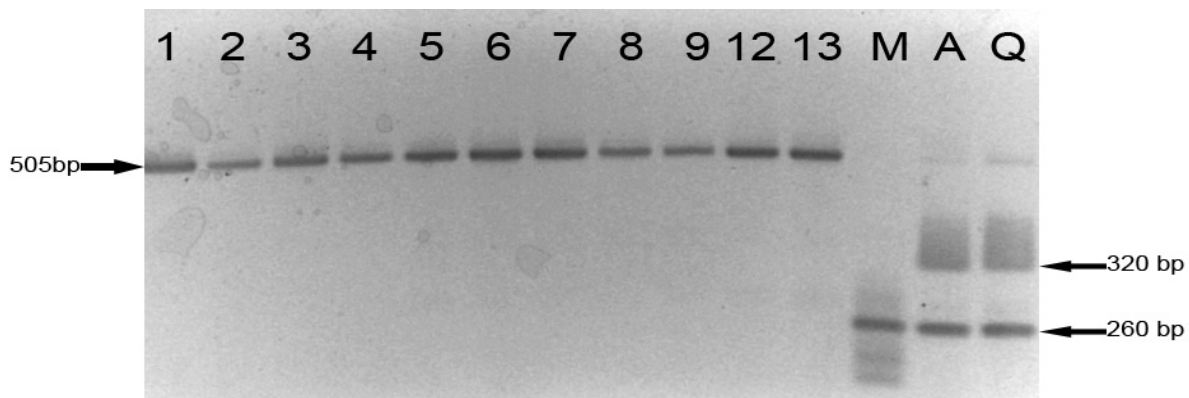


Figura 12: PCR-RFLP com enzima de restrição Mbo II, visualizado em agarose (2%), sendo observadas as bandas de DNA de cada colônia (1 até 13) e as abelhas utilizadas como parâmetro (M – *M. mandacaia*, A – *M. q. anthidioides* e Q – *M. q. quadrifasciata*).

A reação com a enzima de restrição Taq I não apresentou cortes em nenhum dos produtos de amplificação.

O fato de serem observadas divergências entre os haplótipos das *M. quadrifasciata* da foz e os espécimes padrão utilizados para comparação pode ser analisado sob dois aspectos, o primeiro é que *M. q. quadrifasciata* apresenta mais de dois haplótipos para esse marcador molecular, uma vez que o haplótipo de *M. q. quadrifasciata* utilizado para comparação é diferente dos apresentados pelos espécimes encontrados na região da foz do Rio São Francisco, porém similar a um dos haplótipos de *M. q. quadrifasciata* encontrados por Souza *et al.* (2008). Outro aspecto importante é o que todos os espécimes da região da foz do Rio São Francisco apresentam perfil de restrição idêntico para todas as enzimas utilizadas, o que confirma a grande similaridade genética também encontrada nas análises morfométricas, perfil que pode estar relacionado à ação da perda e/ou fixação de alelos ao longo das gerações por efeitos de seleção, deriva ou efeito fundador nessa população.

A deriva genética faz com que alelos passem de uma geração para outra em maior ou menor frequência, que são perdidos ou fixados ao acaso. Diferente da seleção natural a deriva genética atua sobre os alelos não interferindo

necessariamente na sobrevivência ou reprodução, sendo geralmente neutros quanto ao valor adaptativo. De acordo com Araújo *et al* (2000) a fixação de um alelo por deriva depende de sua frequência inicial na população, e esse processo ocorre em toda população finita, mas é tanto mais rápido quanto menor for a população. Logo, tratando-se de uma população isolada de melíponas e o fluxo gênico está ocorrendo somente entre as colônias que se encontram naquela região, enfatizando a necessidade de ações de conservação para esta espécie na região da Foz do Rio São Francisco.

Esses resultados dão margem a três possíveis hipóteses para as características encontradas nessa população, umas delas é de que colônias podem ter sido trazidas por meliponicultores e posteriormente expandido em número ao longo do tempo, o que explicaria a presença de um único perfil genético e grande similaridade morfológica entre as colônias encontradas. Outra explicação seria um evento natural de efeito fundador em que as colônias originais teriam sido originadas de populações de mandaçaia que ocorrem em regiões de Caatinga encontradas atualmente nos estados da Bahia e Sergipe que migraram para essa região, porém, o perfil genético encontrado na amostra de *M. q. quadrifasciata* proveniente de Cruz das Almas – BA, não corrobora essa hipótese, mas o baixo número amostral também não permite sua exclusão. A terceira possibilidade seria a de que a população dessa região é um remanescente de populações que ocorriam naturalmente em região de Mata Atlântica e que foram afetadas por efeitos de perda do habitat natural e em função da fragmentação, tendo restado apenas uma população altamente homogênea remanescente.

A compreensão da estrutura da população desta espécie, nesta região, é extremamente importante para a construção de programas de manejo e conservação. A espécie sendo geneticamente homogênea dentro de uma pequena área a estratégia de conservação pode se concentrar na recolonização de outras áreas por estes indivíduos e no manejo de outros ninhos para a região homogênea (Lopes, 2004). Segundo Kerr e Vencovsky (1982) são necessárias ao menos 44 colônias de *Melipona* para que o efeito de deriva genética não seja prejudicial à

conservação dessa população. Provavelmente o número de colônias encontradas nessa região seja muitíssimo maior, uma vez que as 14 colônias encontradas ocupavam uma área de apenas 10 hectares. No entanto, é importante ressaltar que o número de colônias indicado por Kerr e Vencovsky (1982) diz respeito ao número necessário de diferentes linhagens genéticas e que na região da foz do Rio São Francisco foi encontrada apenas uma linhagem genética, o que indicaria altíssimo risco de extinção.

4.2 – Distribuição espacial dos ninhos.

A busca por ninhos resultou na marcação de 14 colônias na área delimitada no município de Brejo Grande – SE, observando aproximadamente 200 coqueiros, todos estes possuíam cavidades decorrente, possivelmente, da broca do tronco do coqueiro (*Rhinostomus barbirostris*). Na Ilha da Criminosa – SE e Piaçabuçu – AL não foi registrado nenhum ninho de mandaçaia, apesar da intensificação do esforço amostral, sendo analisados 280 coqueiros em cada região.

A ausência de ninhos, na Ilha da Criminosa e na região de Piaçabuçu, enfatiza a hipótese da possível barreira geográfica representada pelo Rio São Francisco. No entanto, apesar de ARAUJO *et al.* (2004), afirmar que grandes abelhas sem ferrão – como a *Melipona quadrifasciata* – só estariam efetivamente isoladas de outra população a uma distância maior que 2 quilômetros, é necessário considerar que a distância de voo é utilizada nesse caso principalmente para tratar de questões associadas ao forrageamento, no entanto a formação de novos ninhos não pode ocorrer numa distância tão grande do ninho materno, uma vez que existe uma grande dependência do novo ninho em relação ao ninho materno durante a fase de estabelecimento inicial, o que inviabiliza que os dois possam estar muito distantes um do outro. Aspecto que de acordo com Gillote (1980) gera restrições diretas na dispersão das populações. É importante ressaltar também que ambas as áreas analisadas possuem território de várzea com áreas alagadas. Dessa forma, apesar de Antonini *et al.* (2006) ter caracterizado a *Melipona quadrifasciata* como

generalista, a região da Ilha da Criminosa possui provavelmente uma quantidade insuficiente de recursos alimentares como pólen e néctar para o estabelecimento de colônias naquela área.

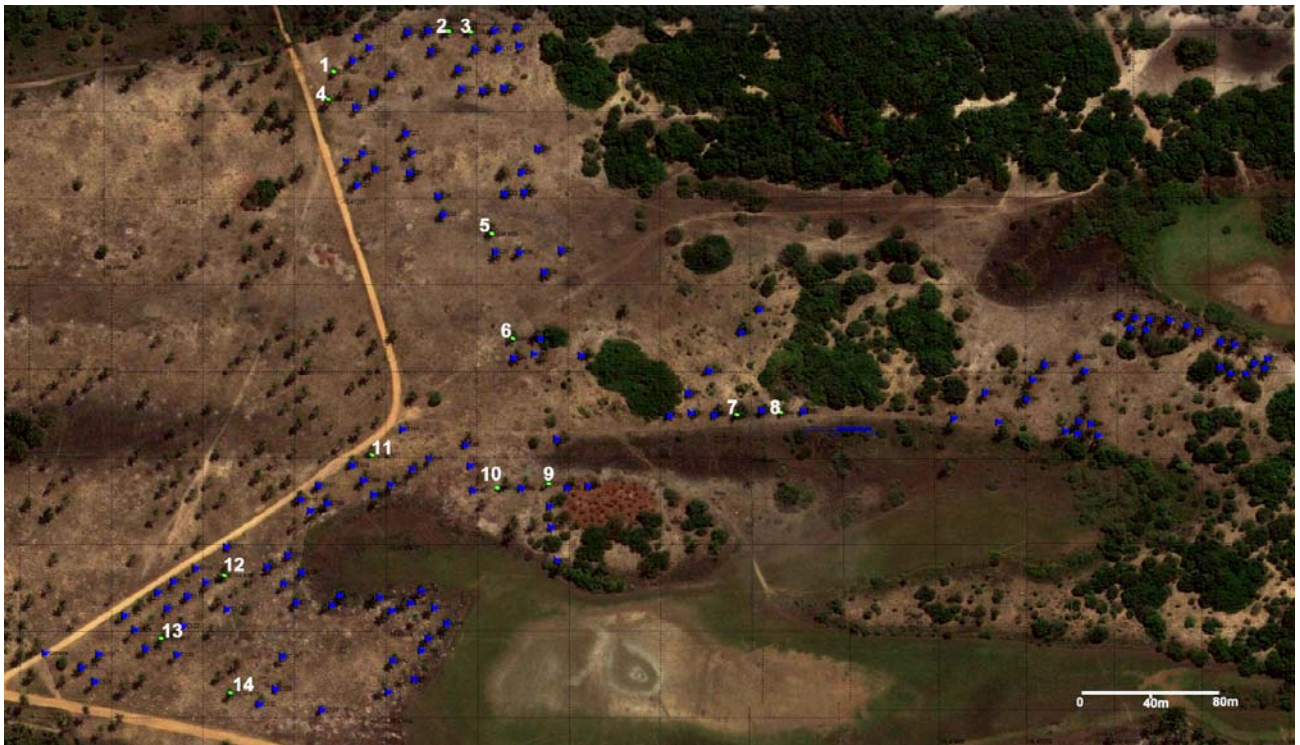


Figura 13: Região de Brejo Grande – SE. Marcação dos ninhos encontrados, identificados de 1 a 14; e marcação de todos os coqueiros visitados (pontos em azul).

A distribuição espacial dos ninhos, calculada pelo método do vizinho mais próximo, resultou em um $R=0,9$ definindo a distribuição dos ninhos como aleatória, levando em consideração a área de 10 hectares. Essa aleatoriedade dos ninhos de Brejo Grande não acompanha a distribuição dos coqueiros, os quais que, por trata-se de um plantio, possui distribuição uniforme.



Figura 14: Esquema de visualização do resultado da distribuição espacial dos ninhos. $R=0,9$ considerado aleatório.

Segundo Serra *et al* (2009), em pesquisa realizada no Estado do Maranhão sobre a distribuição espacial de meliponíneos, duas das três regiões visitadas, a distribuição foi identificada como aleatória ($R=0,81$ e $R=0,89$), sendo 41,9 e 29,6 hectares as áreas das regiões. O padrão de distribuição espacial em meliponíneos é pouco conhecido. Ainda segundo esses autores a organização dos ninhos está relacionada a distribuição e densidade de substratos adequados à construção destes, além dos aspectos ecológicos de ocupação das cavidades onde serão estabelecidas as colônias, e também está diretamente relacionado aos aspectos intrínsecos de cada espécie.

Em Brejo Grande, pode-se afirmar que a distribuição dos ninhos não sofre influência da atividade de enxameação, pois a *M. quadrifasciata*, segundo Araujo *et al.* (2004), possui um voo máximo de 2 quilômetros, assim existindo a possibilidade de nidificação em qualquer ponto da área delimitada no município de Brejo Grande. Apesar de todos os coqueiros possuírem, aparentemente, orifícios em seus troncos, possivelmente nem todas as cavidades sejam adequadas a nidificação.

Sendo assim, a dispersão aleatória dos ninhos deve estar relacionada a uma boa disponibilidade de recursos, visto que a área está próxima a um pequeno fragmento florestal e uma lagoa. E também pode estar sendo influenciada pela dispersão da Broca do tronco do Coqueiro (*R. barbirostris*), que cria as cavidades na estirpe do coqueiro.

O fato da ocorrência de ninhos está restrita a coqueiros na região da foz do Rio São Francisco, justifica a grande necessidade de intensificar os esforços de conservação desta espécie. Visto que os únicos locais propícios à nidificação são os coqueiros brocados. E, segundo a Embrapa (2007), o controle padrão utilizado para esta “praga” é a erradicação das plantas quebradas pela ação do vento, e queima ou enterramento dos coqueiros erradicados (partes infestadas), visando redução dos focos de multiplicação da broca. Ou seja, o produtor que seguir efetivamente essa recomendação exterminaria, junto com a praga, os ninhos de *M. quadrifasciata*.

A análise da possível associação entre as distâncias geográficas entre os

ninhos e os dados morfométricos foi realizado pela correlação entre matrizes, utilizando-se a estatística de Mantel, utilizando 5000 permutações aleatórias. O índice de correlação não foi significativo ($p=0,97$), esse resultado corrobora as análises anteriores que apontaram similaridade genética e morfométrica entre os ninhos, ou seja, uma vez que as abelhas são muito parecidas entre si não existe uma relação direta entre a distância dos ninhos e a diferenças morfométricas entre as abelhas, especialmente considerando que a escala utilizada, de 10ha seria, de fato muito pequena para a existência de algum padrão espacial.

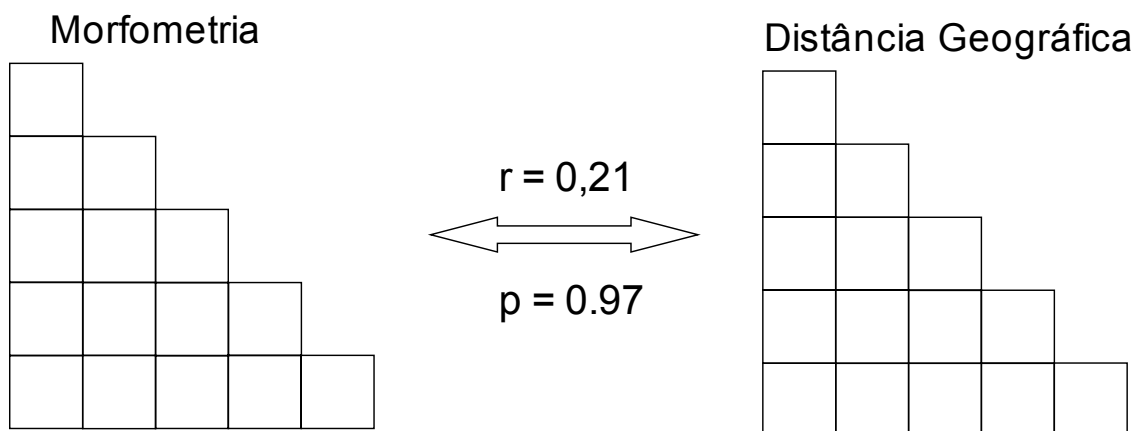


Figura 15: Representação da correlação de matrizes triangulares, entre distância morfométrica e distância geográfica dos ninhos; evidenciando a baixa significância ($r=0,21$ $p=0,97$).

Estudo similar realizado por Diniz-Filho *et al.* (1998), verificou que em populações de *Tetragonisca angustula angustula* também não apresentou uma estruturação geográfica. Nunes *et al* (2008), também identificou que a forma das asas em *Melipona quadrifasciata* tem pouca correlação com distribuição geográfica. No entanto a falta de correlação destas matrizes está sendo influenciada pelo alto grau de semelhança dos caracteres morfológicos, visto que não houve a distinção de grupos entre as colônias com base nos caracteres morfológicos.

5 – CONCLUSÃO

Todos os ninhos identificados foram registrados na região do município de Brejo Grande – SE, apesar do maior esforço de coleta, nenhum ninho foi encontrado na Ilha da Criminosa ou no município de Piaçabuçu - AL, o que reforça a hipótese de que o Rio São Francisco nessa região representa uma barreira geográfica efetiva para a dispersão das colônias dessa espécie.

A identificação da abelha mandaçaia encontrada na foz do Rio São Francisco foi definida com *M. q. quadrifasciata* com base nas análises morfométricas. No entanto o padrão molecular encontrado é diferente de todos os espécimes de *M. q. quadrifasciata*, *M. q. anthidioides* e *M. mandacaia*, utilizadas para comparação, mas compatível com um padrão de *M. q. quadrifasciata* encontrado na literatura.

Uma análise de validação cruzada intrapopulacional para verificar a associação entre indivíduo e colônias demonstrou que não existe associação significativa, denotando grande similaridade intrapopulacional,

A *M. q. quadrifasciata* da Foz do Rio São Francisco apresenta um alto nível de homogeneidade, possivelmente decorrente do isolamento populacional e do fluxo gênico dentro desta população. Estando de acordo com a análise de correlação de matrizes realizada pelo teste de Mantel que demonstrou não existir associação entre as distâncias geográficas dos ninhos e os dados morfométricos. Assim evidenciando a necessidade de intensificação dos esforços para conservação desta espécie nesta região.

A distribuição espacial dos ninhos foi identificada como aleatória, não existindo correlação com a estruturação morfológica da população. Decorrente da grande similaridade morfológica (forma e tamanho) das asas das abelhas e a micro escala também pode está influenciando na aleatoriedade, além da distribuição espacial da broca do tronco do coqueiro.

Seja qual for a explicação para as características populacionais encontradas para as abelhas dessa região, é importante ressaltar que todos os ninhos encontrados estavam localizados em coqueiros que seriam condenados pela baixa produção ocasionada pela broca-do-tronco-do-coqueiro e pela baixíssima oferta de locais de nidificação para abelhas nessa região, o que configura altíssimo risco de extinção populacional.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDAR, D.S. **A mandaçaia**: Biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Série Monografias 4, Braz, Journ. Genetics. p.104. 1996.
- ALVES, R.M.O.; SOUZA, B.A.; CARVALHO, C.A.L. Notas sobre a binômia de *Melipona mandacaia* (Apidae: Meliponina). **Magistra**, v.19, n.3, p.204-212, 2007.
- ALVES, N. M. S.; SILVA, D. B.; FONTES, A. L.; ALMEIDA, J. A. P. **Dinâmica Geoambiental, Processos Morfodinâmicos e Uso das Terras em Brejo Grande - Baixo São Francisco - Sergipe**. Revista Brasileira de Geomorfologia, v. 2, p. 11-21, 2007.
- ANTONINI, Y.; COSTA, R.G.; MARTINS, R.P. **Floral preferences of a neotropical stingless bee, *Melipona quadrifasciata* Lepageletier (Apidae: Meliponina) in a urban forest fragment**. Braz. J. Biol. 66: 463-471. 2006.
- ARAÚJO, E. D. **Análise morfogeométrica de caracteres de abelhas eussociais (Hymenoptera: Apidae)**. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Júlio de Mesquita, Rio Claro, 2002.
- ARAÚJO, E. D., COSTA, M.; CHAUD-NETTO, J.; FOWLER, H. G. Body size and flight distance in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): Interference of flight range and possible ecological implications. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, p. 563-368, 2004.
- ARAÚJO, E. D. Aplicações da morfometria geométrica em estudos populacionais e evolutivos de abelhas eussociais. **Anais do IX Encontro sobre Abelhas**. Ribeirão Preto – SP. p. 230-237. 2010.
- BATALHA-FILHO H., Melo G.A.R., WALDSCHMIDT A.M., CAMPOS L.A.O., FERNANDES-SALOMÃO T.M. Geographic distribution and spatial differentiation in the color pattern of abdominal stripes of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). **Zoologia** 26, 213–219. 2009.
- BAUMGARTNER, D.; ROUBIK, D. W. Ecology of necrophillous and filth-gathering stingless bees (Apidae, Meliponinae) of Peru J. Kansas. **Entomol. Soc.**, v62, 1989.
- BRITO R, M.; ARIAS M. C. Mitochondrial DNA characterization of two Partamona species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by PCR-RFLP and sequencing. **Apidologie**. v 36, n 4. 2005
- CAMARGO, C.A. Sex determination in bees, Production of diploid males and sex determination in *Melipona quadrifasciata*. **J. Apicola**. Res., v.18, p.77-84, 1979.
- CAMARGO J. M. F.; PEDRO S. R. M. **Meliponini Lepageletier, 1836**. In **Moure, J. S.**,

Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. 2008. Versão online. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acessado em janeiro de 2012.

CAMPOS, L. A. O. *Melipona rufiventris* Lepelletier, 1836. In: **Livro Vermelho das espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais (Machado, A.B.M.; Fonseca, G. A. B.; Machado, R. B.; Aguiar, L. M. S.; Lins, L. V. ed.)**. Belo Horizonte, Biodiversitas. 1998.

CARVALHO, C. A. L. *et al.* Criação de abelhas sem ferrão: aspectos práticos. **Série Meliponicultura**, n. 1, p. 42, 2003.

CARVALHO, G. A., KERR, W. E. & NASCIMENTO, V. A. Sex determination in bees. XXXVII. Decrease of Xoheteroalleles in a finite population of *Melipona scutellaris*. (Apidae, Meliponini). **Brasil. J. Genet.**, 18: 13-16., 1995.

CAVALCANTE, M.I.; LOPES, P.R.D. Variação geográfica de caracteres quantitativo *Ogcocephalus vespertilio* (Linnaeus) (Teleostei, Lophiiformes, Ogcocephalidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.15, n.1, p. 125-134, 1998.

CLARK, P. J.; EVANS, F. C. Distance to nearest neighbours as a measure of spatial relationships populations. **Ecology**, v.55, p.445-453, 1954.

CROZIER, Y.C.; KOULIANOS, S.; CROZIER, R.H. An improved test for Africanized honeybee mitochondrial DNA. **Experientia**, v.47, p.968-969, 1991.

DI MARE, R.A.; CORSEUIL, E. Morfometria de Papilioninae (Lepidoptera, Papilionidae) ocorrentes em quatro localidades do Rio Grande do Sul, Brasil. III. Análise da forma das asas através de marcos anatômicos. **Revista Brasileira de Zoologia** v. 21, n.4, p.847-855, 2004.

DINIZ-FILHO, J. A. F.; BINI, L. M. Space-free correlation between morphometric and climatic data: a multivariate analysis of Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) in Brazil. **Global Ecol. And Biogeography**. Letters, v. 4, p. 195-202. 1994.

DINIZ-FILHO, J. A. F.; PIGNATA, M. I. B.; Quantitative genetics of multivariate morphometric variation in the neotropical stingless bee, *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: meliponinae). Brazil. **J. Genet.**, v17, 1994.

DINIZ-FILHO, J. A. F. *et al.* Geographic variation of *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Hymenoptera, Meliponinae) in central and southeastern Brazil. **Naturalia** v.23, p 193-203, 1998.

EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS. **Sistemas de Produção**, 1. Versão Eletrônica. 2007. <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Coco> Acessado em: 15/01/2012

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ªed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220p. 1998.

FRANCISCO, F. O.; SILVESTRE, D.; ARIAS, M. C. Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction maps. **Apidologie**. 32: 323-332, 2001.

FREELAND J.R. **Molecular Ecology**. Wiley. 402p. 2005.

FRANKHAM, R., BALLOU, J. D., BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Sociedade Brasileira de Genética: Editora SBG, 262 p. 2008.

FRANCOY, T. M.; FONSECA, V. L. I. A morfometria geométrica de asas e a identificação automática de espécies de abelhas. **Oecologia Australis**. V. 14. P 317-321. 2010.

FRANCOY, T. M.; WITTMANN, D.; DRAUSCHKE, M.; MULLER, S.; STEINHAGE, V. BEZERRA-LAURE, M. A. F.; DE JONG, D.; GONCALVES, L. S. Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient producers. **Apidologie** (Celle), v. 39, p. 488-494, 2008.

GILLOTT, Cedric. **Entomology**. New York: Plenum Press, 1980. 299-317 p.

GOMES, S. M. da S. **Avaliação de sistemas de captura de *Metamasius hemipterus* e *Rhynchophorus palmarum* (Curculionidae) em plantios de punha (*Bactris gasipaes*) e dendê (*Elaeis guineensis*) no sul da Bahia**. Viçosa, MG: Entomologia, Universidade Federal de Viçosa. Dissertação de Mestrado. 2008.

GRODNITSKY, D. L. Form and Function of Insect Wings. The Johns Hopkins University Press, Baltimore., 261p. in **Book Reviews, Systematic Entomology**, 2000.

HUBBELL, S.P.; FOSTER R.B. Commonness and rarity in a neotropical forest: implications for tropical trees conservation. In: SOULÉ, M.E. [Eds.], **Conservation Biology: The science of scarcity and diversity**. Ed. Sinauer, Sunderland, MA. p 205 – 222. 1986

KERR, W. E. **Biologia, manejo e genética de *Melipoa compressipes fasciculata* Smith (Hymenoptera: Apidae)**. Tese. UFM, São Luiz / MA. 1987.

KERR, W.E.; CARVALHO, G.A. & NASCIMENTO, V.M. **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação**. Coleção Manejo da Vida Silvestre, nº2. Belo Horizonte, Acangaú. 1996.

KERR, W.E. **Progresso na genética de abelhas. Anais do X Congresso Brasileiro de Apicultura, Pousada do Rio Quente**. GO, v. 10, p. 264-277, 1994.

- KERR, W. E.; VENCOSKY, R. Melhoramento genético em abelhas I. Efeito do número de colônias sobre o melhoramento. Brazil. **J. Genet.**, 2: 279-285. 1982.
- KLEINERT, A. M. P. ; RAMALHO, M. ; CORTOPASSI-LAURINO, M. ; RIBEIRO, M. F. ; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. . **Social bees (Apini, Bombini, Meliponini). In: A.R. Panizzi.; J.R.P. Parra. (Org.). Bioecology and Insect Nutrition for Integrated Pest Management. Boca Raton. Fl: CRC Press/Taylor and Francis Group, 2009.**
- KLINGENBERG, C.P. MorphoJ. Faculty of Life Sciences, University of Manchester, UK. Version (2008). Disponível em: http://www.flywings.org.uk/MorphoJ_page.htm. Acesso em: 12 ago. 2011.
- LAZAR, I. **GelAnalyzer**. Versão 2010a. 2010. Disponível em www.gelanalizer.com.
- LEVIN, S.A., The problem of scale in ecology. **Ecology**, v. 73, p. 1943-1967, 1992.
- LOPES, D. M. **Diversidade e estrutura genética em populações de *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae) por análise de microssatélites**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Viçosa – MG. 2004.
- LUDWIG, J.A.; REYNOLDS, J.F. **Statistical ecology: a primer on methods and computing**. New York, John Wiley & Sons. 1988.
- MENDES M.F.M., FRANCOY T.M., NUNES-SILVA P., MENEZES C., IMPERATRIZ-FONSECA V.L. **Intra-populational variability of *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier 1836 (Hymenoptera, Meliponini) using relative warp analysis**. Biosci. J., 23, 147 – 152. 2007
- MELO G.; CAMPOS L. **Variações dos padrões de faixas nas populações de *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1936 no Estado de Minas Gerais (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)** In: *XIV Congresso Brasileiro de Zoologia*, Juiz de Fora, 1987. Anais do XIV Congresso Brasileiro de Zoologia. p 76. 1987.
- MICHENER, C.D. **The Bees of the World**. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. p. 952. 2000.
- MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. **Princípios de morfometria geométrica**. Ribeirão Preto: Holos. p. 188. 1999.
- MORETTO G., ARIAS, M. C. Detection of mitochondrial DNA restriction site differences between the subspecies of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Neotrop Entomol.** 34:381-385. 2005
- MOURE, J. S.; KERR, W. E. Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymen.-Apoidea). **Dusenía**, v.1, p.105-129, 1950.

MOURE, J. S. Notas sobre as espécies de *Melipona* descritas por Lepetelier em 1836 (Hymenoptera, Apidae). **Rev Bras Biol**, v.3, p.15-17, 1975.

NAVARRO, *et al.* Aspectos práticos relacionados ao uso do rincoforol, o feromônio de agregação da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) no controle de pragas do coqueiro. Análise de sua eficiência no campo. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.1, p.32-36, 2002.

NASCIMENTO, V. A. **Aspectos biológicos, ecológicos e genéticos da *Melipona (Michmelia) capixaba* – Moure e Camargo, 1994 (Hymenoptera: Apidae).** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia – MG. 1996.

NUNES, L. A. ; COSTA-PINTO, M. F. F. ; CARNEIRO, P. L. S. ; PEREIRA, D. G. ; WALDSCHMIDT, A. M. . Divergência Genética em *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae) com Base em Caracteres Morfológicos. **Bioscience Journal (UFU)**, v. 23, p. 1-9, 2007.

NUNES, L. A., ARAUJO, E. D., CARVALHO, C. A. L, WALDSCHMIDT, A. M. Population divergence of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae) endemic to the semi-arid region of the State of Bahia, Brazil. **Sociobiology**. 2008.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão.** Nogueirapis. São Paulo. SP, 1997.

PERES, P. R. NETO; VALENTIN, J. L.; FERNANDEZ, F. **Tópicos em tratamentos de dados biológicos.** Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1995.

RAMALHO, M. Stingless bees and mass flowering trees in the canopy of Atlantic Forest: a tight relationship. **Acta Bot Bras** 18: 37-47. 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.r-project.org>. 2008.

ROHLF, F. J.; BOOKSTEIN, F. L. **A comment on shearing as method for “size correction”.** Syst. Zool. V. 36, 1987.

ROHLF, F. J; TPS SMALL for Windows version 1.20. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook. On line at: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>, 2003. Acessado em 18/05/2010

ROHLF, F.J. TPSDIG2 for Windows version 2.10. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook. On line at: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>. Acesso em 18/05/2010.

ROHLF, F.J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. 2000. New York: Exeter Software, 2000.

RUTTNER, F. **Biogeography and Taxonomy of Honeybees**. Springer-Verlag, New York. p. 1-284. 1988.

SCHWARZ, H. Stingless bees (Meliponidae) of the Western Hemisphere. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 90, p.1-546, 1948.

SERRA, B. D. V.; DRUMMOND, M. S.; LACERDA, L. de M.; AKATSU, I. P. **Abundância, distribuição espacial de ninhos de abelhas Meliponina (Hymenoptera, Apidae, Apini) e espécies vegetais utilizadas para nidificação em áreas de cerrado do Maranhão**. Iheringia, Sér. Zool. [online]. vol.99, n.1, pp. 12-17. 2009.

SILVA, R. A. O. **A morfometria geométrica e a diferenciação de espécies do gênero Plebeia (Apidae, Meliponini)**. Monografia. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2006.

SILVA, R. A. O. **Ferramentas auxiliares na identificação de abelhas Meliponini, com ênfase no gênero Schwarziana (Lepeletier, 1836)**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2010.

SILVA, M. S. F.; SOUZA, R. M.; **Áreas de proteção ambiental em Sergipe: perspectivas e desafios face ao conflitos territoriais decorrentes do uso de recursos naturais**. Anais XVI Encontro nacional de Geógrafos, Porto Alegre/RS. 2010.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte. 253p. 2002.

SOUZA, R. C. **Área de proteção ambiental de piaçabuçu: diagnóstico, avaliação e zoneamento**. Maceió: Universidade Federal de Alagoas, 2000.

SOUZA, C. B. *et al.* **Nidificação de Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata quadrifasciata*) em Coqueirais da Região da Foz do Rio São Francisco - Sergipe**. In: *XVI Congresso Brasileiro de Apicultura e II Congresso Brasileiro de Meliponicultura*, 2006, Aracaju - Sergipe. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Apicultura, 2006.

SOUZA, R. O., MORRETO, G. ; ARIAS, M. C. ; DEL LAMA, M. A. Differentiation of *Melipona quadrifasciata* L. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) subspecies using cytochrome b PCR-RFLP patterns. **Genetics And Molecular Biology**, São Paulo, p.445-450, 2008.

THORPE, R.S. Geographic variation: a synthesis of cause, data pattern and

congruence in relation to subspecies, multivariate analysis and phylogenies. **Boll. Zool**, 54: 3-11. 1987.

TAVARES, M. G. *et al.* Inheritance Pattern of RAPD Markers in *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Brief Communications**, Viçosa, p.279-282. 1999.

TORRES, R. A.; MATOSO, A. A.; ARTONI, R. F. Genética de Peixes Neotropicais II. **Biologia molecular de peixes neotropicais**. Publ. UEPG. Biol. Saúde, Ponta Grossa, 2(10). p. 27-37, 2004.

WALDSCHMIDT, A. M.; BARROS, E. G.; CAMPOS, L. A. O. A molecular marker distinguishes the subspecies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Genet Mol Biol**, v.23, p.609-611, 2000.

WALDSCHMIDT, A. M.; MARCO JR P. DE; BARROS E.G. e CAMPOS L.A.O. Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology** 62: 923-928. 2002.

WALDSCHMIDT, A. M.; SALOMAO, T. M. F.; BARROS, E. G.; CAMPOS, L. A. O. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Braz. J. Genet.** [online]. 1997, v.20, n.3. 1997.

WARWICK, D. R. N. Principais Características do Anel-Vermelho e Murcha de Fitomonas. Comunicado Técnico. **Embrapa**. V.38. 2005.

ZANELLA, F.C.V., MARTINS, C.F. **Abelhas da Caatinga: biogeografia, ecologia e conservação**. In: I.R. Leal, M. Tabarelli & J.M.C. Silva (eds.). *Ecologia e conservação da Caatinga*. pp. 75-134. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. 2003.