



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA BACHARELADO

GABRIEL GARCÊS SANTOS

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Melipona fasciculata* SMITH
(HYMENOPTERA, APIDAE) ORIUNDAS DOS MUNICÍPIOS DE IMPERATRIZ E
SÃO BENTO: ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL**

SÃO LUÍS
2022

GABRIEL GARCÊS SANTOS

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Melipona fasciculata* SMITH
(HYMENOPTERA, APIDAE) ORIUNDAS DOS MUNICÍPIOS DE IMPERATRIZ E
SÃO BENTO: ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL**

Monografia apresentada ao Curso de Agronomia Bacharelado do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. José de Ribamar Silva Barros

SÃO LUÍS

2022

Santos, Gabriel Garcês.

Diversidade genética de populações de *Melipona fasciculata* Smith (Hymenoptera, Apidae) oriundas dos municípios de Imperatriz e São Bento: análise do DNA mitocondrial / Gabriel Garcês Santos. – São Luís, 2022.

51 f.

Monografia (Graduação) – Curso de Agronomia, Universidade Estadual do Maranhão, 2022.

Orientador: Prof. Dr. José de Ribamar Silva Barros.

1. Abelhas sem ferrão. 2. Conservação. 3. mtDNA. I. Título.

CDU: 638.123(812.1)

Elaborado por Giselle Frazão Tavares - CRB 13/665

GABRIEL GARCÉS SANTOS

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Melipona fasciculata* SMITH
(HYMENOPTERA, APIDAE) ORIUNDAS DOS MUNICÍPIOS DE
IMPERATRIZ E SÃO BENTO: ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL**

Monografia apresentada ao Curso de Agronomia Bacharelado do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Aprovada em: 21/01/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José de Ribamar Silva Barros - Orientador
Departamento de Biologia/CECEN/UEMA

Profa. Dra. Raimunda Nonata Santos de Lemos - Examinador I
Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade/CCA/UEMA

Profa. Ma. Ana Maria Maciel Leite - Examinador II
Departamento de Biologia/CECEN/UEMA

Dedico aos meus pais Claudenira Costa Garcês e Ubiratan de Jesus Santos, por acreditarem em mim sempre! E aos meus Avós Alberty Fernandes Garcês (in memoriam) e Maria da Conceição Ferreira da Costa, os principais responsáveis do meu interesse pela agronomia.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. José de Ribamar Silva Barros, por quem possuo enorme admiração e respeito. Sem a sua ajuda e incentivo eu não teria conseguido conquistar essa etapa da minha vida. Agradeço por tudo que me ensinou, pela paciência, conselhos e, sobretudo, pela amizade construída;

Aos meus pais Claudenira Costa Garcês e Ubiratan de Jesus Santos, pelos ensinamentos, educação e pelo apoio que sempre me deram. Por me guiarem nas horas difíceis e por terem me encorajado em todas as decisões que tomei, amo vocês;

À família LabWick, pelo ótimo convívio, pelos bons momentos que tivemos no laboratório e pela troca de conhecimento fundamental no dia-a-dia da pesquisa;

À Universidade Estadual do Maranhão pela formação acadêmica;

Aos meus amigos da turma de Agronomia 2017.1, pelos momentos alegres e de desespero durante a graduação, desejo todo o sucesso do mundo. Em especial a Victória Kelly, Jossanya Benilsy, Cintya Santos e Karolainy Moraes. E também aos que não eram da turma, mas que fiz disciplinas durante a graduação;

A todos os professores do curso de Agronomia, que durante a graduação contribuíram fazendo seu papel de educador, fundamental para a formação de um profissional capacitado e de qualidade;

À professora Dra. Raimunda Nonata Santos de Lemos, por ter sido minha primeira orientadora de iniciação científica e me mostrado o mundo da pesquisa. E à Dra. Alberyca Stephany de Jesus Costa Ramos, por todos os ensinamentos durante a minha primeira bolsa de iniciação científica;

À banca julgadora, pela disponibilidade em avaliar minha monografia e participar da minha defesa;

À minha família pelo apoio, compreensão e pelo grande incentivo que sempre me deram. Em especial aos meus avós Alberty Fernandes (*in memorian*), Maria da Conceição, Terezinha de Jesus, Marina Ferreira e Gregório Gonçalves (*in memorian*);

Às minhas amigas: Mayara Oliveira, Hyasmin Dutra, Ana Beatriz, Beatriz Melo e Lorena Matos, pelo carinho, amizade (muitos anos) e por todos os momentos de alegria. Apesar de serem raros os encontros, a nossa amizade nunca diminuiu com o tempo e sei que a torcida pelo sucesso é mútua;

Agradeço a todas as pessoas que fizeram parte da minha trajetória, contribuindo de forma direta ou indireta nessa minha jornada.

“Se as abelhas desaparecerem da face da terra, a humanidade terá apenas mais quatro anos de existência. Sem abelhas não há polinização. Não há reprodução da flora, sem flora não há animais, sem animais não haverá raça humana”

(Albert Einstein)

RESUMO

A abelha sem ferrão *Melipona fasciculata* (Smith, 1854), popularmente conhecida como tiúba, é uma espécie que possui distribuição em ambientes bastante diversificados. Essa abelha possui grande importância para os meliponicultores, por produzir uma grande quantidade de mel e de excelente sabor, principalmente no Maranhão. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar os padrões de diversidade genética de populações *M. fasciculata* no Maranhão, utilizando-se o gene mitocondrial COI. Seis espécimes de *M. fasciculata* foram coletados nos municípios de Imperatriz e São Bento, sendo três de cada município. O DNA genômico foi extraído utilizando-se o protocolo baseado em Fenol-Clorofórmio, que logo após passou pelos processos de quantificação, amplificação gênica realizada via PCR, visualização em gel de agarose 1% e posterior sequenciamento. Os dados foram analisados por meio dos softwares MEGA X, ARLEQUIN 3.5.2.2, DNAsp 6 e NETWORK v. 4.6. As análises moleculares identificaram 5 haplótipos, e nenhum haplótipo compartilhado entre as populações, evidenciando o isolamento dessas populações. O município de São Bento possui uma maior variabilidade genética em relação a Imperatriz. Verificou-se um processo de diferenciação genética entre as amostras analisadas, visto que os valores de diferenciação genética foram maiores ao comparar os haplótipos dos diferentes municípios. Diante dos passos mutacionais observados nas sequências, houve modificação na sequência proteica gerada para todos os haplótipos. De acordo com a Análise de Variância Molecular (AMOVA) verificou-se uma alta estruturação genética nas populações de tiúba. O teste de neutralidade F_s de F_u indicou que as populações estudadas podem estar sofrendo expansão populacional. Não houve fluxo gênico entre as populações estudadas, podendo estar relacionada à distância geográfica entre as localidades, indicando a existência de ecótipos localmente adaptados.

Palavras-chaves: Abelhas sem ferrão. Conservação. mtDNA.

ABSTRACT

The stingless bee *Melipona fasciculata* (Smith, 1854), popularly known as tíuba, is a species that has a distribution in very diverse environments. This bee is of great importance to beekeepers, as it produces a large amount of honey with excellent flavor, especially in Maranhão. In this, the objective of this work was to study the patterns of genetic diversity of *M. fasciculata* populations in the Maranhão context, using the mitochondrial gene COI. Six specimens of *M. fasciculata* were collected in the municipalities of Imperatriz and São Bento, three from each municipality. The genomic DNA was extracted using the genomic protocol based on Phenol-Chloromium, which soon after went through the processes of quantification, gene amplification performed via PCR, visualization in 1% agarose gel and subsequent sequencing. Data were analyzed using MEGA X, ARLEQUIN 3.5.2.2, DNASp 6 and NETWORK v. 4.4. Molecular samples identify 5 samples, and no haplotype shared between samples, evidencing the samples of samples. The municipality of São Bento has a greater genetic variability in relation to Imperatriz. The difference between the different differentiation processes studied was verified, since the values of genetic variation were higher in the municipalities of the haplotypes. In view of the mutational steps observed in the sequences, there were changes in the protein sequence designed for all haplotypes. According to the Analysis of Molecular Variance (AMOVA) there is a high genetic structure in the populations of tíuba. Fu's F_s neutrality test indicated that populations may be increasing population expansion. There was no genetic flow between the local populations, which may be related to the location between the locations, indicating the existence of adapted local flows.

Key words: Stingless bees. Conservation. mtDNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição mundial dos Meliponini, com destaque para a região neotropical.....	16
Figura 2	Abelha tiúba (<i>Melipona fasciculata</i> Smith).....	19
Figura 3	Mapa genético mitocondrial da espécie <i>Melipona fasciculata</i>	24
Figura 4	Mapa de identificação das localidades amostradas.....	26
Figura 5	Gel de agarose 1% para confirmação da amplificação da região COI para as 6 amostras estudadas de <i>Melipona fasciculata</i>	31
Figura 6	Rede de haplótipos para o gene COI da espécie <i>Melipona fasciculata</i> . Os números em vermelho entre as esferas representam os sítios polimórficos.....	36
Figura 7	Dendograma de proximidade genética pelo método de <i>Neighbor Joining</i> entre as populações de <i>Melipona fasciculata</i> e as espécies utilizadas como grupo externo.....	37
Figura 8	Alinhamento das sequências de aminoácidos das amostras de <i>M. fasciculata</i> oriundas de São Bento (SB1, SB2 e SB3), de Imperatriz (ITZ1, ITZ2 e ITZ3) com a amostra de <i>Melipona fasciculata</i> de Teresina.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação taxonômica das abelhas sem ferrão.....	15
Tabela 2	Sequências de Primers utilizados para amplificação parcial da região COI em <i>Melipona fasciculata</i>	28
Tabela 3	Identificação molecular das sequências obtidas de <i>Melipona fasciculata</i> através de comparações com sequências disponíveis no GenBank.....	32
Tabela 4	Diversidade genética das populações de <i>Melipona fasciculata</i> para os haplótipos do gene mitocondrial COI.....	33
Tabela 5	Haplótipos e seus respectivos sítios variáveis. Os números verticais correspondem à posição em pb dos sítios polimórficos dentro do fragmento do gene COI de <i>Melipona fasciculata</i>	35
Tabela 6	Estimativa da divergência nucleotídica (%), baseada no modelo K2P, calculada entre os pares de haplótipos e entre esses e as sequências utilizadas como grupo externo.....	39
Tabela 7	Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) baseada nas sequências da região COI de <i>Melipona fasciculata</i>	40
Tabela 8	Testes de neutralidade aplicados às sequências nucleotídicas da região COI em <i>Melipona fasciculata</i>	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Aspectos taxonômicos e biológicos das abelhas sem ferrão	15
2.2 A abelha tíuba (<i>Melipona fasciculata</i> Smith)	18
2.3 Importância das abelhas sem ferrão.....	20
2.4 Influência dos fatores genéticos e ambientais em populações das abelhas sem ferrão	21
2.5 Uso do marcador molecular mitocondrial no estudo de populações das abelhas sem ferrão	22
3 OBJETIVOS	25
3.1 Geral.....	25
3.2 Específicos.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Material biológico e área de coleta	26
4.2 Extração e quantificação de DNA.....	27
4.3 Amplificação dos fragmentos de interesse e sequenciamento	28
4.4 Análises moleculares	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Características das sequências do mtDNA.....	31
5.2 Confirmação da identificação da espécie	32
5.3 Análise do polimorfismo do fragmento	32
5.4 Análises filogenéticas e distância genética.....	34
5.5 Estrutura populacional.....	39
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

I INTRODUÇÃO

A criação de abelhas sem ferrão (meliponíneos) tem se tornado uma importante atividade econômica para os meliponicultores, por meio da comercialização do mel, da polinização de alguns produtos comerciais e da venda de colônias geradas pela criação racional dessas populações. No entanto, o produtor deve manter o foco na conservação, mantendo essas populações em seus habitats naturais como polinizadoras, visto que a grande maioria das espécies da flora nativa brasileira depende da polinização realizada pelas abelhas sem ferrão para sua continuidade (EPAGRI, 2017).

Atualmente, as populações dessas abelhas estão sofrendo declínio, devido principalmente à ação do homem. Com o avanço das áreas desmatadas, seja para a ocupação urbana ou para novas áreas cultivadas, o habitat das abelhas sem ferrão vem diminuindo ao longo dos anos. Mudanças no ambiente natural, juntamente com isolamento geográfico, a destruição de ninhos, redução da floração nativa e redução da capacidade de suporte ambiental, colocam essas espécies em risco de extinção (LIMA-VERDE; FREITAS, 2011; SILVA; PAZ, 2012).

A redução do tamanho populacional está associada à perda da variabilidade genética, pois em populações pequenas a segregação aleatória dos genes e a reprodução desigual entre os indivíduos produzem mudanças nas frequências alélicas (LOPES, 2004). Vários pesquisadores após perceberem o declínio em populações dessas abelhas começaram a realizar diversos estudos, visando salvar as abelhas. Grande parte dos estudos está voltada para as análises dos marcadores moleculares. Entre os genomas mais estudados no gênero *Melipona* está o DNA mitocondrial (mtDNA), tendo sido completamente sequenciado para as abelhas *Melipona bicolor* (SILVESTRE *et al.*, 2008) e *Melipona scutellaris* (PEREIRA *et al.*, 2016).

No Maranhão existe a abelha tíuba (*Melipona fasciculata*), que possui grande importância ambiental e socioeconômica para o estado, principalmente por seu mel possuir características muito distintas em relação ao mel de *Apis mellifera*, por apresentar gosto mais ácido, maior fluidez e menor viscosidade, além de ser um produto de tradição no estado, possuindo preços mais elevados e demanda crescente no mercado (HOLANDA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Segundo Silvestre (2002) *apud* Wilson *et al.* (1985) o DNA mitocondrial facilita os estudos de caracterização de populações, espécies e subespécies além de estudos evolutivos e de filogenias por se constituir de uma molécula de DNA circular e estrutura

gênica simples. Apresenta uma alta taxa de evolução por mutação, cerca de 5 a 10 vezes mais rápida do que a taxa de mutação de um gene nuclear de cópia única. O emprego do mtDNA em estudos populacionais e evolutivos se vale principalmente do fato dele possuir uma alta taxa de substituições de base, apresentar alterações no tamanho total da molécula devido a inserções e deleções, principalmente na região rica em A+T (ARIAS *et al.*, 2003).

O estudo genético da biologia de populações deve estar concentrado no uso de marcadores haplóides e/ou codominantes, pois eles fornecem dados mais robustos para as análises quando comparados a marcadores dominantes, que possuem desvantagens. O mtDNA é um marcador molecular que se enquadra nessas categorias (FRANCISCO, 2002). O sequenciamento de regiões do mtDNA tem sido uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização desse genoma e para a detecção de variabilidade genética entre populações ou espécies (FRANCISCO, 2012).

Devido aos avanços nos campos da biologia molecular, estatística e bioinformática, várias ferramentas avançadas estão sendo desenvolvidas e disponibilizadas no meio científico, o que possibilita uma maior confiabilidade dos estudos baseados na genética, principalmente no que se refere à utilização dos marcadores moleculares (SILVA *et al.*, 2019).

A meliponicultura se mostra uma prática econômica que quando aliada à manutenção de populações de abelhas tem a finalidade de se evitar a extinção local de espécies (CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2006). O conhecimento da genética de colônias mantidas em meliponários é de suma importância para que se desenvolvam estratégias de manejo e conservação eficazes para as espécies de abelhas nativas (CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2011). Entretanto, são poucos os estudos sobre a genética de abelhas em meliponários (CARVALHO-ZILSE *et al.*, 2009).

Diante disso, é necessário o desenvolvimento de pesquisas que visem a conservação das abelhas no meio ambiente, uma vez que um terço da produção mundial de alimentos depende da polinização desses insetos. Logo, esta pesquisa teve como objetivo estudar a diversidade genética de populações da abelha *Melipona fasciculata*, oriundas dos municípios de Imperatriz e São Bento, por meio da análise do mtDNA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos taxonômicos e biológicos das abelhas sem ferrão

Os meliponíneos, popularmente conhecidos como abelhas sem ferrão, assumem um papel importante nos ecossistemas por meio da polinização (MORGADO *et al.*, 2002). Estão agrupados na Classe Insecta, Ordem Hymenoptera, Superfamília Apoidea, Família Apidae, Subfamília Meliponinae, existindo duas tribos: Meliponini e Trigonini. Hoje são conhecidas 397 espécies de abelhas sem ferrão (CAMARGO; PEDRO, 2007), sendo que é difícil estimar o número de meliponíneos existentes, devido à deficiência na revisão do gênero e o grande número de espécies crípticas (MICHENER, 2007).

Tabela 1. Classificação taxonômica das abelhas sem ferrão.

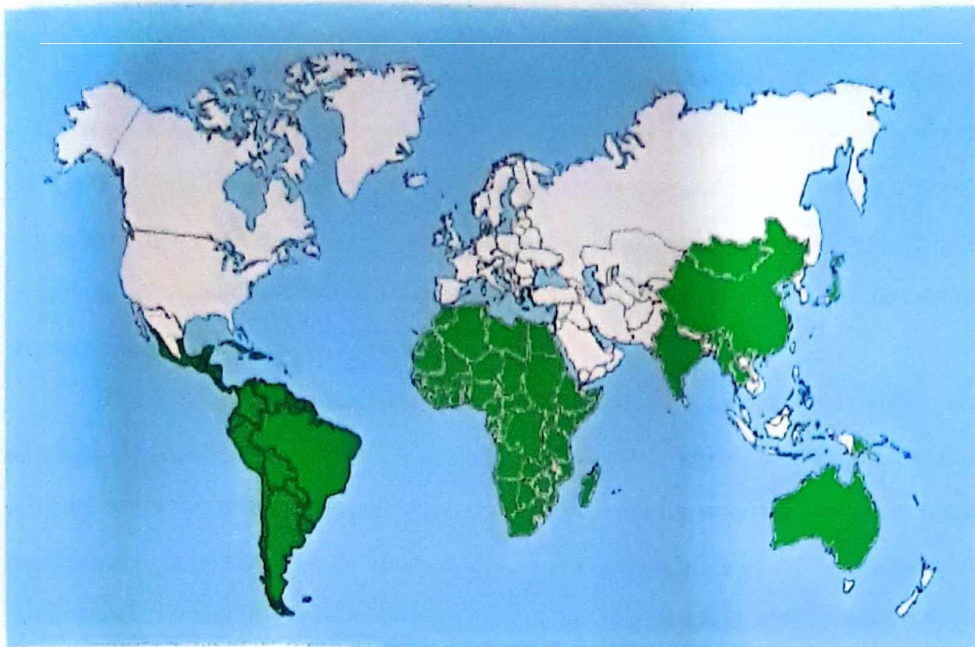
Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Classe	Insecta
Ordem	Hymenoptera
Superfamília	Apoidea
Família	Apidae
Subfamília	Apinae
Tribos	Meliponini e Trigonini

Fonte: Kerr (1998).

Dentro da tribo Meliponini está presente o gênero *Melipona*. As abelhas da tribo Meliponini estão distribuídas em quase todo o globo, principalmente em torno da faixa tropical e subtropical, em países da América Central, América do Sul, África, e em alguns países da Ásia e na Austrália (MICHENER, 2007; SOUZA *et al.*, 2008; KERR, 1998).

No Brasil, as abelhas sem ferrão são encontradas em todos os Estados, contudo, em alguns deles há um pequeno número de espécies ou até mesmo apenas uma. A grande maioria se encontra nos estados da região Amazônica (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Figura 1. Distribuição mundial dos Meliponini, com destaque para a região neotropical.



Fonte: Kerr *et al.* (2001).

Diferente das abelhas do grupo Trigonini, as Meliponini possuem células de cria indiferenciadas, sendo os indivíduos da colmeia (rainhas, operárias e zangões) todos do mesmo tamanho, diferenciando apenas o abdômen no caso das rainhas fisiogástricas (rainhas fecundadas). Elas possuem ninhos em placas concêntricas empilhadas na vertical, com favos com formato circular, com presença de cerume, que fica nas células de cria e nos potes de alimentos da colmeia, esses potes têm na maioria das vezes uma forma ovóide, que armazena separadamente o mel e o pólen. Essas abelhas constroem a sua entrada com geoprópolis (mistura de argila e resinas vegetais), e quase sempre é no centro da colmeia (SILVA *et al.*, 2014).

As abelhas sem ferrão, como o nome já sugere, possuem o ferrão atrofiado, impossibilitando o seu uso defensivo (SILVEIRA *et al.*, 2002), vale ressaltar que o ferrão atrofiado está presente apenas nas fêmeas, logo, os zangões possuem ferrão normal.

Essas abelhas possuem na sua organização social as castas (grupos fechados), igualmente como ocorre em outros membros da classe insecta, como formigas, cupins e vespas. A rainha é responsável por realizar a postura dos ovos e organização da colônia, feita por meio dos feromônios produzidos nas suas glândulas mandibulares. Esses feromônios são passados da abelha rainha para as abelhas operárias, no caso as operárias mensageiras, por meio da troca de alimento, assim como por meio do toque com a antena,

ou até mesmo por captação da substância volátil por células olfativas da antena (CAMARGO *et al.*, 2015).

A rainha jovem, devido suas características, possui uma melhor capacidade de produzir e transmitir os feromônios, sendo muito eficiente na manutenção e coesão da colônia (PEREIRA *et al.*, 2021). Logo após a fecundação, a rainha passa por um processo chamado de fisiogástrica, que é o desenvolvimento do sistema reprodutor, onde surgem os ovários e seu abdome dilata, o que a torna diferente morfológicamente das outras fêmeas (SILVA *et al.*, 2014; VENTURIERI, 2008).

Já os zangões, pouco participam das atividades da colônia, possuindo como principal função realizar a fecundação da rainha virgem, porém, em alguns casos, é possível observar eles realizando algumas tarefas, como a manipulação da cera e a desidratação do néctar para produção de mel. Existem algumas características morfológicas que os diferenciam dos outros indivíduos da colmeia, entre elas a principal é a ausência da estrutura denominada corbícula no terceiro par de pernas (SILVA *et al.*, 2014; VENTURIERI, 2008).

As operárias são responsáveis pela maioria das atividades realizadas na colônia. De acordo com Venturieri (2008), elas realizam: limpeza, produção de cera, alimentação da rainha, enchimento das células com alimento larval, proteção contra inimigos externos, coleta de recursos externos, como néctar, pólen, resina, barro e fibra, e eliminação dos detritos da colônia (SILVA *et al.*, 2014).

Em relação ao desenvolvimento das castas dessas abelhas, há uma variação de tempo desde a fase de ovo até a fase adulta. O tempo de desenvolvimento de uma operária do gênero *Melipona* pode variar de 39 a 45 dias; o de uma rainha, de 36 a 39 dias; e de um zangão, de 39 a 46 dias (VENTURIERI, 2008). A respeito da expectativa de vida, também há variações, sendo o clima e o tipo de atividade realizada as principais influências. De acordo com Silva (2014), as operárias podem alcançar uma expectativa de vida de 90 dias, e as rainhas entre 4 e 5 anos. A menor expectativa de vida das operárias em relação à rainha está relacionada às operárias realizarem atividades mais perigosas, como sair da colmeia para coletar néctar e pólen, podendo morrer no percurso.

O corpo de algumas espécies do gênero *Melipona* pode chegar ao mesmo tamanho, ou um pouco maior, que o da abelha *Apis mellifera* (entre 7 a 15 mm), porém na grande maioria das abelhas do gênero *Melipona* o tamanho é muito inferior (OLIVEIRA *et al.*, 2013). De acordo com Michener (2013), a menor espécie de melípona conhecida mede 1,8 mm de comprimento.

A abelha sem ferrão apresenta a corbícula, com exceções das rainhas, dos zangões e das espécies que são parasitas, denominadas assim por não coletarem alimento nas flores. A corbícula é uma área grande e lisa, frequentemente côncava, contornada por alguns pelos, que fica localizada em cada perna posterior, especificamente na tíbia, ou seja, o último par de pernas. A corbícula ou cesta de pólen é uma estrutura presente no corpo das abelhas que é utilizada pelas operárias para transportar alimentos, como grãos de pólen das flores ou outras substâncias utilizadas na alimentação e/ou na construção de seus ninhos (MICHENER, 2013), como por exemplo própolis e barro.

As colônias das abelhas sem ferrão são formadas por milhares de indivíduos, que constroem os ninhos em sua maioria abrigados em cavidades, como por exemplo em ocos de árvores, rochas, no solo, ninhos abandonados de cupins e formigas, entretanto, há algumas espécies que constroem seus ninhos expostos (PEREIRA, 2006). O ninho dessas abelhas é organizado de forma muito diferente do que ocorre nas abelhas do gênero *Apis*, ao invés de favos horizontais agrupados em lamelas verticais, essas abelhas, geralmente, os constroem na posição vertical, formando discos horizontais ou estruturas helicoidais (VILLAS-BÓAS, 2012).

2.2 A abelha tiúba (*Melipona fasciculata* Smith)

O Brasil é o país que possui a maior diversidade de espécies do gênero *Melipona* do mundo, e dentre os meliponíneos distribuídos no estado do Maranhão, encontra-se predominantemente a *M. fasciculata* (Figura 2), conhecida popularmente como tiúba, porém também chamada de Uruçu-cinzenta. A tiúba, caracteriza-se como uma abelha de hábitos bastante higiênicos, possuindo um mel de excelente qualidade (VENTURIERI *et al.*, 2003) e apresenta alta produtividade de mel, com produção média de 3,5 a 7 litros por ano (VENTURIERI *et al.*, 2015).

Além do mel, um produto que vem despertando bastante interesse devido suas potencialidades, é o geoprópolis, que de acordo com diversas literaturas possui ação antimicrobiana (MULI *et al.*, 2008; LIBERIO *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017), antioxidante (DA SILVA *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013; DUTRA *et al.*, 2014; BATISTA *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2017), anti-inflamatória (LIBERIO *et al.*, 2011; FRANCHIN *et al.*, 2013), antiproliferativo e citotóxico (CUNHA *et al.*, 2013, 2016; CAMPOS *et al.*, 2014), antinociceptivo (SOUZA *et al.*, 2014), imunomodulador (LIBERIO *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2015), antitumoral

(CINEGAGLIA *et al.*, 2013; BARTOLOMEU *et al.*, 2016), gastroprotetor (RIBEIRO-JUNIOR *et al.*, 2015) e antileishmania (DUTRA *et al.*, 2019).

Figura 2. Abelha tíuba (*Melipona fasciculata* Smith).



Fonte: Menezes (2021).

A tíuba tem recebido bastante atenção, principalmente nos estados do Piauí, Maranhão e Pará, tanto pelo alto nível de produção, como pela facilidade de se adaptar em condições adversas (NUNES-SILVA *et al.*, 2013). Além do aspecto de polinização, o caráter medicinal atribuído ao geoprópolis e mel da tíuba, tem trazido grandes expectativas aos criadores dessas abelhas, pela valorização da espécie no mercado brasileiro (DUTRA *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2009; LIBERIO *et al.*, 2011).

O mel da abelha tíuba possui características muito distintas em relação ao mel de *A. mellifera*, por apresentar gosto mais ácido, maior fluidez e menor viscosidade, além de ser um produto de tradição de consumo nas áreas de ocorrência e adquirir preços mais elevados e demanda crescente no mercado (HOLANDA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012; FERNANDES; CONTI-SILVA; ROSA, 2020). Nos mercados locais, o preço do mel de *M. fasciculata* é geralmente o dobro do mel de *Apis* e pode ser ainda maior fora da temporada do mel (FERNANDES; ROSA; CONTI-SILVA, 2020).

Em relação a atividade de forrageamento da abelha tíuba, o aumento dessa atividade ocorre a partir de julho, no bioma Amazônico, quando as chuvas diminuem (VENTURIERI *et al.*, 2015). Quanto ao bioma Cerrado, o forrageamento da *M. fasciculata* ocorre normalmente em todas as estações e períodos do ano, entretanto, esses

fatores podem influenciar o aumento ou diminuição das atividades diárias (FREITAS *et al.*, 2020).

2.3 Importância das abelhas sem ferrão

O Brasil possui a maior biodiversidade de melíponíneos do planeta, provavelmente não apenas pela extensão continental do país, mas também por sua grande variedade de biomas. Essas circunstâncias indicam que a existência de melíponíneos é importante para o estabelecimento e manutenção de ecossistemas, diversidade, sobrevivência, restrições de ocupação territorial e pela polinização, além das plantas nativas, de plantas domesticadas e utilizadas em grandes plantações (KERR *et al.*, 2001).

Esse grupo garante o equilíbrio do ecossistema, pois ao polinizar as angiospermas, elas podem formar frutos que podem ser utilizados como uma variedade de alimentos biológicos. Embora as abelhas sem ferrão sejam muito importantes para a manutenção do ecossistema, a redução da cobertura vegetal nos diversos biomas do Brasil tem levado à diminuição do número de espécies, muitas das quais não foram descritas ou catalogadas (SANTOS; DUARTE, 2018).

Existem apelos para a proteção deste grupo, no entanto, a falta de conhecimento dificulta a implementação de estratégias de gestão e proteção para estes grupos de polinizadores (SANTOS; DUARTE, 2018). Slaa *et al.* (2006) estimam que os serviços ecossistêmicos prestados pelas abelhas movimentam, globalmente, 200 bilhões de dólares por ano e que 30 % dos alimentos de origem vegetal consumidos pelo homem dependem diretamente da polinização realizada por essas abelhas, dentre os quais pode-se citar o tomate, pepino, café, morango, laranja, comuns na mesa dos brasileiros, e o camu-camu, cupuaçu e rambutan, que são mais utilizados na região Norte. Portanto, proteger essas abelhas ajuda a proteger os mais diversos tipos de vegetação (VITAL, 2017).

O conhecimento da ecologia básica das abelhas é essencial para sustentar o desenvolvimento e a implementação de estratégias de conservação. A compreensão dos fatores que regulam as populações e comunidades de abelhas e a sensibilidade das características das abelhas a esses fatores permitem identificar opções específicas de manejo para espécies individuais (MURRAY *et al.*, 2009).

Uma estratégia atual que vem sendo utilizada para a conservação destes polinizadores é a meliponicultura, ou seja, a criação das abelhas sem ferrão (KERR, 1998). De acordo com Kerr (1998), cerca de 70 espécies de melíponíneos poderiam ser utilizados para criação na meliponicultura, para uso em polinização ou para produção de

mel, por essas abelhas não possuírem ferrão, têm a vantagem de serem manuseadas por crianças e por pessoas alérgicas ao veneno da *A. mellifera*, por exemplo, e ainda sem o uso de roupas especiais, diminuindo seu custo.

Esta é uma atividade de agricultura familiar comum no Brasil, iniciada pelos índios (KERR *et al.*, 1996), que iniciaram a domesticação dessas abelhas. Os índios Kayapó possuem amplo conhecimento sobre o comportamento, distribuição, estrutura do ninho e zonas ecológicas das abelhas sem ferrão, chegando a nomear e classificar 34 tipos de abelhas, sendo nove cultivadas artesanalmente, assim como utilizam a resina e a cera para fabricar artefatos e para uso medicinal (CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2006).

Para os índios Guaranis, as abelhas possuem um papel fundamental, visto que são utilizadas em atividades culturais e religiosas. Os Guaranis utilizam os materiais produzidos pelas abelhas para fabricação de remédios, incluindo a cura e a prevenção de várias doenças, além de usar o mel como alimento. Além disso, passam para as crianças todas as informações de como utilizar e como encontrá-las (RODRIGUES, 2005; OLIVEIRA, 2020).

Os índios Guaranis já possuíam consciência sobre a preservação das abelhas, de forma que saíam cedo para observar e ouvir seus zumbidos nas flores. Com observações bem apuradas eles conseguiam achar o ninho das abelhas com a intenção de retirar cuidadosamente o ninho ou parte dele para colocar em uma cabaça e levar para perto da aldeia (OLIVEIRA, 2020). Os Guaranis cuidam das abelhas com a finalidade de preservar, onde destacam que no passado as abelhas os ajudaram a fugir para o sul na época que os portugueses chegaram ao Brasil (OLIVEIRA, 2020).

2.4 Influência dos fatores genéticos e ambientais em populações das abelhas sem ferrão

Mesmo com os diversos fatores favoráveis para a criação, a espécie, como várias outras, vem sofrendo constantes ameaças em função da grande proporção em que o desmatamento e uso indiscriminado de inseticidas estão tomando (SILVA, 2018). Esses fatores resultam, nas populações remanescentes, o desequilíbrio no aporte genético, refletido pela queda da variabilidade genética e aumento na estruturação genético-populacional. A fragmentação dos espaços ditos “verdes” impossibilita o fluxo gênico entre as populações, o que resulta no aumento das taxas de endogamia e consequentemente na diminuição dos estoques populacionais (SILVA *et al.*, 2014).

De acordo com Lopes (2004), a redução do tamanho populacional está associada à perda da variabilidade genética, pois em populações pequenas a segregação aleatória dos genes e a reprodução desigual entre os indivíduos produzem mudanças nas frequências alélicas, podendo ocorrer fixação e/ou perda de um alelo.

Para que as práticas de conservação das espécies de abelhas-sem-ferrão sejam eficientes, a compreensão de alguns temas se tornam essenciais no planejamento das ações, como por exemplo, o comportamento social e os estudos genéticos. Esses conhecimentos poderão garantir a formulação de estratégias eficazes de manejo e conservação, de forma a manter e ampliar os estoques populacionais nos meliponários, principalmente durante os períodos do ano onde as condições climáticas são mais adversas (SILVA *et al.*, 2019).

Devido às constantes ações de desmatamento e uso indiscriminado de agrotóxicos que tendem a diminuir as populações de abelhas, a meliponicultura tem se tornado crucial, não só para a conservação das espécies, mas também como fonte de renda para os agricultores com menor poder aquisitivo (CÂMARA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2014). Para que a conservação das espécies de abelhas-sem-ferrão seja efetivada, alguns temas se tornam essenciais nas abordagens. Desses, podem-se citar a morfofisiologia, comportamento, estudos genéticos e taxonomia (SILVA, 2018).

A redução da variabilidade genética das populações dessas abelhas como resultado da visível degradação do meio ambiente e suas consequências para a conservação dos meliponídeos devem ser estudadas, e, para que isso seja possível, se torna necessária a caracterização molecular dessas espécies (SOUZA *et al.*, 2008).

Portanto, mediante a disponibilidade de ferramentas moleculares, essas tornaram-se fundamentais nos estudos de conservação de vários organismos (HILLIS *et al.*, 1996), tornando possível obter informações que abrangem desde herança diferencial dos genes dentro de um mesmo indivíduo (AVISE, 2004) até relações em nível de espécie e biologia de populações (HOLLAND; HADFIELD, 2002).

2.5 Uso do marcador molecular mitocondrial no estudo de populações das abelhas sem ferrão

Em consequência aos avanços nos campos da biologia molecular, bioinformática e estatística, ferramentas avançadas vêm sendo desenvolvidas e disponibilizadas no meio científico, aumentou-se a confiabilidade dos estudos genéticos, principalmente em termos de utilização dos marcadores moleculares (SILVA, 2018). Os marcadores moleculares

têm sido utilizados como uma importante ferramenta na conservação de espécies selvagens e/ou de interesse econômico, tanto da fauna como da flora, pois fornecem dados importantes para estudos populacionais, tais como: estimativas de variação genética, grau de endogamia, diferenças interpopulacionais, fluxo gênico entre populações, determinação do tamanho efetivo da população, entre outros tipos de estudos (SILVA *et al.*, 2014).

Dentro dessa perspectiva, há marcadores que têm se destacado em estudos com abelhas, como por exemplo os marcadores de origem mitocondrial (SILVA, 2018). É comum a utilização desse marcador para estudos filogenéticos e filogeográficos, de forma a solucionar, inclusive, problemas referentes ao aspecto taxonômico, pois em sua maioria são marcadores de caráter semiconservativo (SILVA, 2018).

O estudo genético da biologia de populações deve estar concentrado no uso de marcadores haplóides e/ou codominantes, pois eles fornecem dados mais robustos para as análises quando comparados a marcadores dominantes, que possuem desvantagens técnicas e analíticas. O DNA mitocondrial (mtDNA) é um marcador molecular que se enquadra nessas categorias (FRANCISCO, 2002).

O emprego do mtDNA em estudos populacionais e evolutivos se vale principalmente do fato dele possuir uma alta taxa de substituições de base, apresentar alterações no tamanho total da molécula devido a inserções e deleções, principalmente na região rica em A+T (ARIAS *et al.*, 2003), assim como por possuir herança materna (em sua maioria) e tamanho reduzido (WEINLICH *et al.*, 2004).

A análise do DNA mitocondrial é utilizada em vários tipos de estudos, como de biogeografia, dinâmica populacional e até de relações genéticas entre espécies, portanto, os dados obtidos nesses estudos podem ser utilizados para propor medidas de conservação (SOUZA *et al.*, 2008).

Dentre os genes mitocondriais codificadores de proteínas, o gene COI (Citocromo Oxidase I) é o que possui a menor taxa evolutiva, sendo bastante conservado em relação à evolução dos aminoácidos (SIMON *et al.*, 1994).

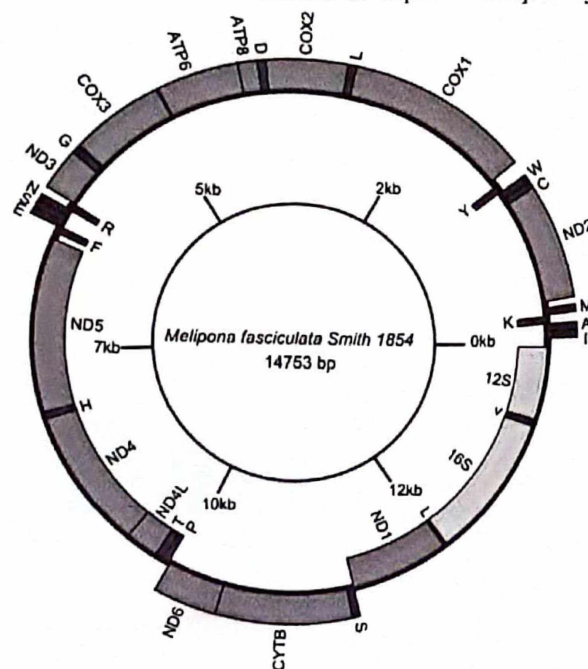
O gene COI codifica a subunidade I do citocromo C, uma proteína receptora terminal de elétrons da cadeia respiratória, considerada transmembrana, que possui como função catalisar a redução do oxigênio em H₂O e o bombeamento de prótons por meio das membranas das cristas mitocôndrias. A subunidade I do Citocromo C oxidase (COI), é a subunidade catalítica da enzima e localiza-se preeminente submergida nas membranas das cristas presentes nas mitocôndrias. Por ser um componente fundamental

da cadeia respiratória, apresenta-se bastante conservada entre as espécies que utilizam a fosforilação oxidativa em seu metabolismo. Contudo, mostra variação suficiente para diferenciação entre as espécies a nível de nucleotídeo (WAUGH, 2007).

A proposta do sequenciamento de uma curta região com cerca de 650 pares de bases do início do gene COI permitiu uma nova abordagem da utilização da variabilidade haplotípica e, ainda, tem mostrado elevada divergência entre espécies associadas para a grande parte dos grupos animais (WAUGH, 2007).

Por meio do sequenciamento de baixa cobertura, Silva (2018) realizou a montagem do mitogenoma de *M. fasciculata* (Figura 3), faltando a definição apenas da região em A+T (região controle). Esse trabalho tornou-se muito importante como material base para o desenvolvimento de marcadores moleculares voltados a estudos filogenéticos.

Figura 3. Mapa genético mitocondrial da espécie *Melipona fasciculata*.



Fonte: Silva (2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a diversidade genética de populações da abelha sem ferrão *Melipona fasciculata* oriundas dos municípios de Imperatriz e São Bento, estado do Maranhão, por meio da análise do mtDNA, visando gerar dados que auxiliem na conservação e manejo dessa importante espécie de abelha.

3.2 Específicos

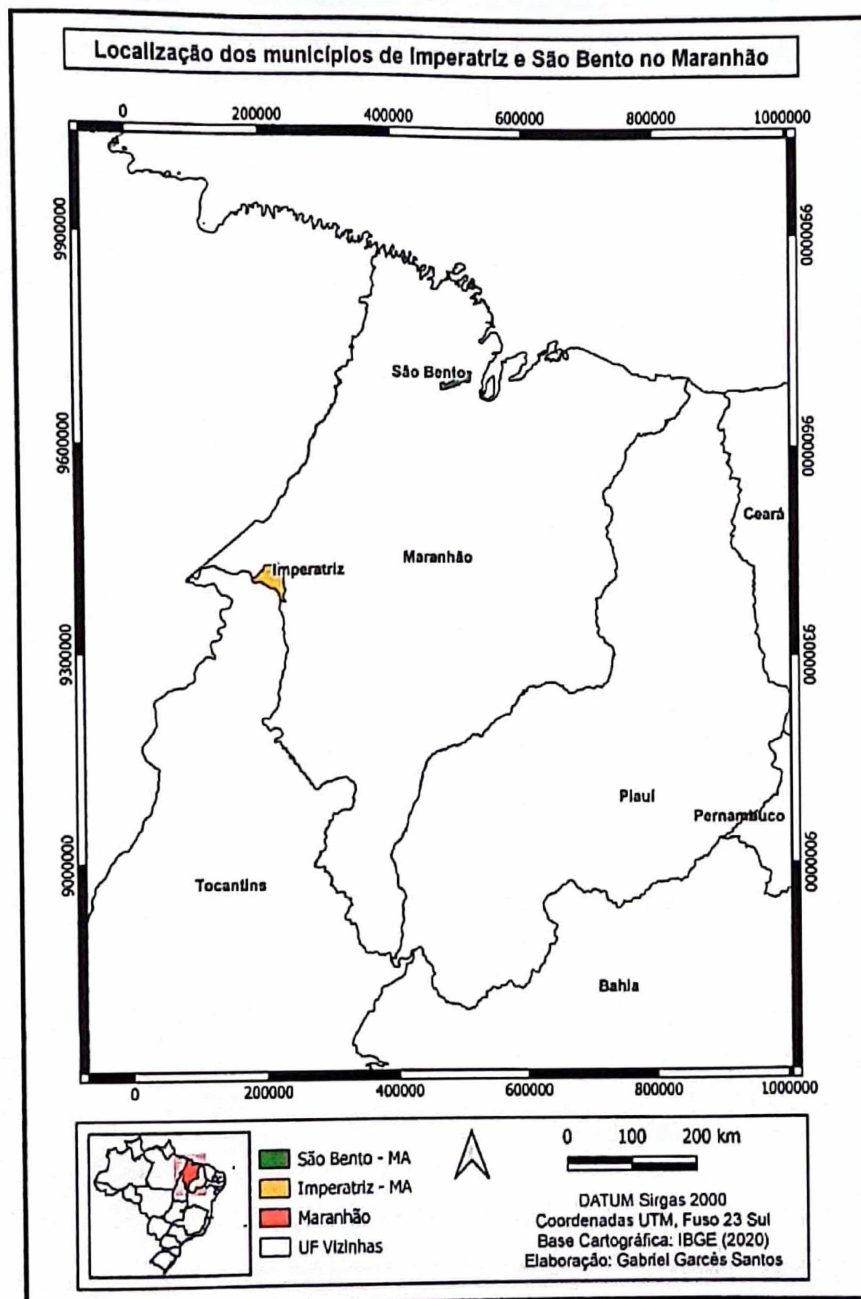
- Investigar a diversidade nucleotídica e haplotípica de populações da abelha tíuba (*M. fasciculata*) oriundas dos municípios de Imperatriz e São Bento, por meio do sequenciamento da região COI do mtDNA;
- Analisar a estruturação genética das populações e os índices de diversidade das populações estudadas;
- Investigar a expansão demográfica por meio de testes de neutralidade;
- Estabelecer uma base de dados voltados para a identificação e conservação da *M. fasciculata*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material biológico e área de coleta

Para este estudo foram coletadas amostras de *Melipona fasciculata* de dois diferentes municípios. Ao todo foram coletadas abelhas de seis colônias, sendo três de São Bento (2° 41' 45" Sul, 44° 49' 15" Oeste) e três de Imperatriz (5° 31' 33" Sul, 47° 28' 33" Oeste) (Figura 4).

Figura 4. Mapa de identificação das localidades amostradas.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Uma vez coletadas, as amostras foram identificadas, acondicionadas em frascos contendo álcool 70% e direcionadas ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular Warwick Estevam Kerr - LabWick/DBIO/CECEN, localizado na Universidade Estadual do Maranhão, onde ficaram conservadas sob temperatura de -20°C.

4.2 Extração e quantificação de DNA

O DNA genômico das abelhas foi extraído utilizando-se o protocolo padrão de Sambrook *et al.* (1989), com Fenol-Clorofórmio. Na adaptação dessa técnica, foi utilizado somente o tórax das abelhas para a extração do material genético, eliminando-se as asas, cabeça e metassoma. De acordo com Francisco (2002), as cabeças são retiradas para evitar contaminação das extrações com produtos glandulares e com os pigmentos dos olhos, pois tais contaminantes podem interferir no processo de digestão do DNA e na reação de PCR. Os tórax das abelhas (três de cada município) foram macerados utilizando-se nitrogênio líquido.

Para o protocolo de extração de Sambrook *et al.* (1989), foi colocado até 20 mg do material macerado em microtubo de 2,5 mL e adicionado 600 µL de tampão de Lise (Tris-1M pH 8, EDTA- 1M PH 8, NaCl-5M e H₂O destilada) + Proteinase K. Em seguida a amostra foi agitada no Vortex por 15 segundos; As amostras foram deixadas por 2 horas em banho Maria a 55°C; Logo após esperou-se esfriar em temperatura ambiente; Foi adicionado 600 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1); Foram agitadas no Vortex por 15 segundos e centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm; O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo; Em seguida foi adicionado ½ volume de Fenol (300 µL) + ½ volume de Clorofórmio (300 µL); Logo após foram agitadas no Vortex por 15 segundos e centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm; O sobrenadante foi transferido para outro microtubo; Adicionou-se 100 µL de acetato de sódio (3M, pH 4.8) e foram agitadas no Vortex por 15 segundos; Foi adicionar 600 µL de isopropanol) para precipitar o DNA e os microtubos foram agitados levemente até visualizar a nuvem de DNA; As amostras que não apareceu o pellet foram levadas para o Freezer por 1 hora e após esse tempo foram centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm; Em seguida o sobrenadante foi cuidadosamente descartado para não perder o pellet e os microtubos foram deixados secando para que todo o líquido evaporasse em estufa a 37°C, tendo o cuidado para não secar muito; Por fim, o pellet foi dissolvido em água estéril. Para pellet pequeno foi utilizado 20 µL de água estéril e para pellet maior 50 µL.

As concentrações das amostras de DNA (ng/ μ L) foram avaliadas em espectrofotômetro Biodrop μ Lite a 260 nm, e a pureza foi analisada com as relações entre as medidas de absorvância a 260 nm/280 nm e 260 nm/230 nm no mesmo equipamento.

4.3 Amplificação dos fragmentos de interesse e sequenciamento

O material genético extraído e quantificado foi submetido à técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase - “*Polymerase Chain Reaction*”) segundo a metodologia utilizada por Mullis e Faloona (1987) e Saiki *et al.* (1985). Todas as reações foram montadas com volume final de 25 μ L para cada amostra com os seguintes reagentes, suas respectivas concentrações e o volume utilizado em cada reação: 5 X PCR Buffer (5 μ L); 10 mM dNTP (0,8 μ L), 25 mM MgCl₂ (2,0 μ L), 10 μ M cada Primer (2,0 μ L), DNA 50 ng/ μ L (1 μ L), Taq DNA polymerase 5 U/ μ L (0,2 μ L) e H₂O ultra pura na quantidade suficiente para completar o volume final. Foi utilizado um par de primers nas reações de amplificação via PCR (Tabela 2), os mesmos utilizados por Simon *et al.* (1994) e testados por Ricardo *et al.* (2020) para a abelha *Bombus morio* e por Souza *et al.* (2018) para a abelha *Melipona subnitida*.

Tabela 2. Sequências de Primers utilizados para amplificação parcial da região COI em *Melipona fasciculata*.

Região	Primer	Sequência	Referência
COI	F	5' GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC 3'	Simon <i>et al.</i> (1994)
	R	5' CCCGGTAAAATTAATAAATAAACTTCC 3'	

As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems). As condições de amplificação utilizadas para este trabalho foram: desnaturação inicial por 4 minutos a 94 °C, seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 92 °C por 2 minutos; anelamento por 57 °C por 1 minuto e 50 segundos e alongação a 72 °C por 2 minutos. Extensão extra de 72 °C a 7 minutos e deixado à 4 °C até ser retirado do equipamento.

Para verificar a qualidade e o tamanho dos fragmentos amplificados, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a uma concentração de 1% (p/v), com tampão TBE 1X e corados com Brometo de Etídio (10mg/mL), utilizando-se o marcador molecular 1000bp DNA Leader (Promega) como parâmetro para verificar o

tamanho dos fragmentos amplificados via PCR. A visualização do gel foi realizada em fotodocumentador/transiluminador UV L-PIX TOUCH. Após a confirmação da amplificação do fragmento, os fragmentos amplificados foram preparados e encaminhados para o sequenciamento genético pela empresa ACTGene Análises genéticas, localizada no Rio Grande do Sul.

4.4 Análises moleculares

As sequências obtidas foram submetidas ao alinhamento múltiplo de forma automática na ferramenta CLUSTAL W, por meio do programa MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018), com parâmetros de penalidades sugeridos por Schneider (2007). Realizou-se a comparação das sequências nucleotídicas do gene COI obtidas neste estudo com as sequências do banco de dados do GenBank (MH680930), para verificar a identificação correta dos espécimes de *M. fasciculata*. O arquivo gerado foi então convertido para o formato Fasta e as sequências foram editadas no programa MEGA X, para inspeção visual do alinhamento produzido e possíveis correções na codificação das inserções ou deleções presentes. O software BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) foi utilizado por meio do programa MEGA X para identificar similaridades entre as sequências obtidas e as disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para região gênica sequenciada foram analisados alguns índices de diversidade genética e estes parâmetros foram comparados entre os distintos genes. Utilizando os programas ARLEQUIN 3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) e DNAsp 6 (ROZAS *et al.*, 2017) foram calculados os seguintes parâmetros de diversidade genética: diversidade haplotípica (Hd), que estima a probabilidade de amostragem de dois haplótipos do total amostral e estes serem diferentes (NEI, 1987); diversidade nucleotídica (π), que representa o número médio de diferenças entre duas sequências (por sítio) retiradas ao acaso da amostra total, para cada população (NEI; MILLER, 1990); índice de fixação (F_{ST}), índice de fixação para alelos por locus, ou seja, é a probabilidade de que 2 genes sejam homólogos, combinados ao acaso na população, ambos originários de um gene na população (WRIGHT, 1965) e Análise Hierárquica de Variância Molecular (AMOVA), para verificar a homogeneidade de um conjunto de dados, identificando assim se esta variabilidade é estruturada entre grupos, subgrupos ou organizada dentro dos indivíduos (NEI, 1987).

O programa MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018) foi utilizado para gerar a matriz de distância genética entre os espécimes, considerando-se o modelo evolutivo Kimura-

2-parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980). Três sequências obtidas do GenBank foram incorporadas como grupo externo para as análises do gene COI: *M. fasciculata* (MH680930), *M. bicolor* (AF466146) e *M. scutellaris* (NC_026198).

A rede de haplótipos foi construída no programa NETWORK v. 4.6 (POLZIN; DANESCHMAND, 2003), utilizando-se o algoritmo *Median Joining*, pois permite identificar os haplótipos relacionados que estão mais próximos. O dendrograma foi construído com base nas distâncias genéticas, pelo método de *Neighbor Joining*, utilizando-se o programa MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018).

Foram realizados testes de neutralidade pelo método D de Tajima (TAJIMA, 1989), e estimativa do parâmetro F_s de Fu (FU, 1997). O teste D de Tajima utiliza como base as diferenças existentes entre o número de sítios segregantes (S) ou o número de nucleotídeos distintos (π) entre os pares de sequências, selecionados aleatoriamente na amostra (TAJIMA, 1989). Resultados negativos e significativos para o valor de D indicam efeito carona, expansão populacional ou seleção purificadora; ao passo que os valores positivos indicam que está ocorrendo gargalo populacional recente ou seleção estabilizadora (TAJIMA, 1989).

O teste F_s de Fu realiza a comparação entre o número observado de alelos e o número de alelos esperados caso a população permanecesse constante. Sendo o valor de F_s dado pela equação " $F_s = \ln(S'/1 - S')$ " (FU, 1997). Valores negativos e significativos para F_s indicam que está ocorrendo expansão populacional. Visto que o F_s tende a ser negativo quando há um grande número de mutações recentes, um valor negativo alto é levado como evidência contra a neutralidade das mutações (FU, 1997).

Esses testes foram utilizados a fim de verificar a possível ocorrência de expansão demográfica ou gargalos populacionais. As análises foram implementadas pelo programa ARLEQUIN 3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). A significância dos testes foi obtida após 10000 simulações de coalescência.

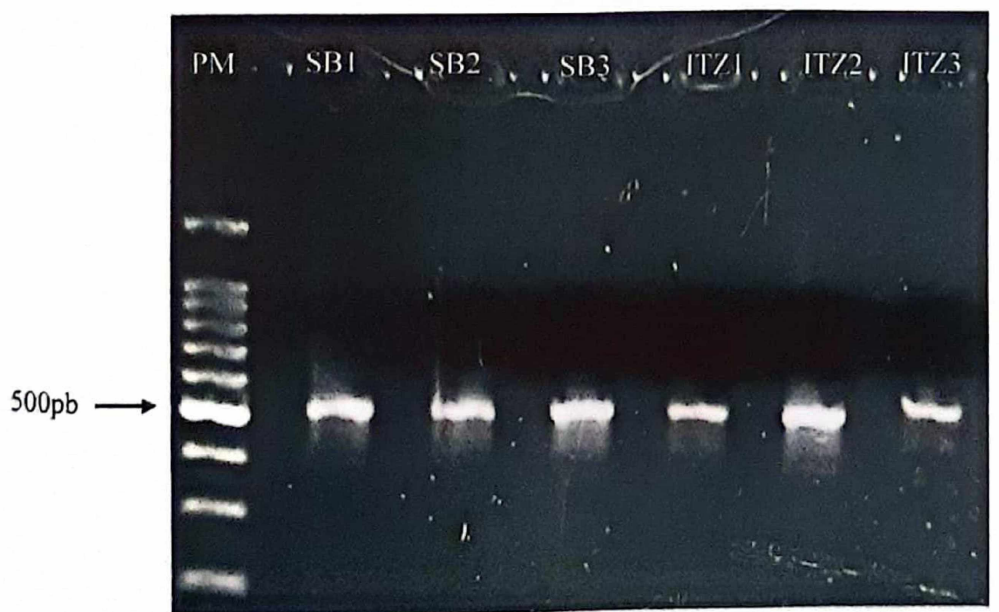
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características das sequências do mtDNA

Foram analisadas seis sequências de uma região do gene COI (Figura 5), que, após editadas, obteve-se fragmentos de 400 pb, nos quais 17 sítios variáveis foram encontrados. Resultado semelhante de pb foi encontrado por Bonatti *et al.* (2014) ao realizar amplificação e sequenciamento da região COI para a abelha *M. subnitida*, obtendo 446 pb do gene após edição das sequências. As amplificações apresentaram bom padrão de amplificação, sem a presença de bandas inespecíficas.

A composição nucleotídica foi de A = 34,17%, C = 13,33%, G = 8,33%, T = 44,17%, demonstrando a abundância de bases A e T, conforme esperado para genomas mitocondriais de insetos (CROZIER; CROZIER, 1993; SIMON *et al.*, 1994). Resultados semelhantes para a composição de nucleotídeos A e T foram encontrados por Souza *et al.* (2018), em que obteve composição nucleotídica de A = 32,50%, C = 9,60%, G = 13,30%, T = 44,50%, para a abelha *M. subnitida* e por Batalha-filho (2008), em que obteve composição nucleotídica de A = 37,30%, C = 9,4%, G = 10,70%, T = 42,50%, para a abelha *M. quadrifasciata*.

Figura 5. Gel de agarose 1% para confirmação da amplificação da região COI para as 6 amostras estudadas de *Melipona fasciculata*.



PM – Peso molecular 1000bp; SB1, SB2 e SB3 – São Bento; ITZ1, ITZ2 e ITZ3 – Imperatriz.

5.2 Confirmação da identificação da espécie

Os fragmentos amplificados foram alinhados à sequência do genoma mitocondrial da região COI de *M. fasciculata*, disponível no NCBI GeneBank (número de acesso: MH680930), correspondendo à posição nucleotídica de 1922 a 2321 (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação molecular das sequências obtidas de *Melipona fasciculata* comparadas com as sequências disponíveis no GenBank.

Morfologia	Molecular	Localidade	Código	Similaridade (%)
<i>M. fasciculata</i>	<i>M. fasciculata</i>	São Bento	SB1	99,00%
<i>M. fasciculata</i>	<i>M. fasciculata</i>	São Bento	SB2	98,75%
<i>M. fasciculata</i>	<i>M. fasciculata</i>	São Bento	SB3	98,50%
<i>M. fasciculata</i>	<i>M. fasciculata</i>	Imperatriz	ITZ1	99,25%
<i>M. fasciculata</i>	<i>M. fasciculata</i>	Imperatriz	ITZ2	99,25%
<i>M. fasciculata</i>	<i>M. fasciculata</i>	Imperatriz	ITZ3	99,25%

5.3 Análise do polimorfismo do fragmento

Para as populações de *M. fasciculata* nos municípios de São Bento e Imperatriz foram observados o número de indivíduos, de haplótipos (h) e de sítios polimórficos (S), assim como a diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica (π) e o número médio de diferenças nucleotídicas (k) (Tabela 4). A Hd foi de 1,000 para o município de São Bento e de 0,667 para Imperatriz, com média interpopulacional de Hd = 0,867. A π variou de 0,00667 a 0,00333 com valor interpopulacional de $\pi = 0,00583$. Comparado com outros estudos que utilizaram o mtDNA como um marcador para analisar a variabilidade genética em abelhas sem ferrão, a média interpopulacional de Hd foi mais elevada (ASSIS, 2010; BONATTI, 2012). Em relação à Hd para o município de São Bento (1,000), foi encontrado um resultado igual apenas no trabalho de Gonçalves (2010), com subespécies da abelha *Friseomelitta varia*, para o estado de Mato Grosso. Essa elevada Hd indica que, mesmo ocorrendo ao longo dos anos a degradação do habitat natural dessas abelhas, a variabilidade genética delas ainda encontra-se relativamente alta (BONATTI, 2012).

A π interpopulacional nesta pesquisa foi bem próxima ao valor 0,00547 encontrado por Batalha-Filho (2008), e que segundo o autor é considerado baixo. Observou-se que a π foi maior no município de São Bento, esse resultado pode estar relacionado à atividade da meliponicultura ser muito bem difundida na região da Baixada Maranhense, onde situa-se o município de São Bento. A região da Baixada Maranhense possui a maior produção de mel de tiúba (*M. fasciculata*) do estado (SILVA, 2006), e provavelmente o maior número de criadores (FERNANDES, 2017). O maior número de criadores e conseqüentemente o maior número de enxames resulta em uma maior diversidade genética, proporcionada pelo processo evolutivo de fluxo gênico entre as populações existentes naquela região.

Tabela 4. Diversidade genética das populações de *Melipona fasciculata* para os haplótipos do gene mitocondrial COI.

Populações	N	S	H	k	Índice de diversidade molecular	
					Haplotípica	Nucleotídica
					(Hd)	(π)
São Bento	3	4	3	2,667	1,0000	0,00667
Imperatriz	3	3	2	1,333	0,667	0,00333

(N) número de indivíduos; (S) número de sítios polimórficos; (h) número de haplótipos; (Hd) diversidade haplotípica; (π) diversidade nucleotídica; (k) número médio de diferenças.

São Bento foi caracterizado pelo maior π , pois foi a população com com haplótipos que mais se divergiram entre si, enquanto os haplótipos de Imperatriz (menor π) foram os mais semelhantes. Essa baixa variabilidade nucleotídica observada em Imperatriz pode ser explicada pelo pequeno número de indivíduos fundadores dessas populações durante o período de expansão regional, e pelas possíveis mudanças ambientais em períodos distantes, reduzindo assim o tamanho da população (gargalo populacional) (BONATTI, 2012). O município de Imperatriz ainda não possui a atividade da meliponicultura tão difundida, possuindo um menor número de criadores e conseqüentemente de enxames.

A variabilidade genética é um dos principais responsáveis pela sobrevivência de qualquer espécie a médio e longo prazo, visto que é por causa da variabilidade genética que uma espécie está própria a se moldar às constantes modificações que ocorrem no

meio ambiente (FRANKHAM *et al.*, 2010), principalmente devido às mudanças ocasionadas durante a evolução da espécie. É a variabilidade genética que permite às populações que passam por mudanças ambientais lidar com as pressões ecológicas do declínio populacional e da extinção local (WANG *et al.*, 2002).

Portanto, índices de variabilidade genética populacionais são bons indicadores de que uma espécie está indo bem, pois quanto mais elevados forem esses índices, maiores as chances dessas populações estarem em processo de diferenciação (SEQUEIRA *et al.*, 2005), sendo, portanto, fundamental nos programas de manejo e conservação, pois é extremamente necessária a definição do status taxonômico da espécie para poder propor essas medidas.

5.4 Análises filogenéticas e distância genética

Em relação aos haplótipos, foram encontrados 5 diferentes, correspondentes a 7 sítios variáveis (Tabela 5). H1, H2 e H3 são haplótipos de São Bento, já H4 e H5 são haplótipos de Imperatriz. Entre os haplótipos H1 e H4 existe 1 transição localizada nas posições 63 e 64 (A – T / T – A) e uma substituição na posição 59 (A – T). O haplótipo H1 difere de H2 e H3 por 1 transição localizada nas posições 64 (A – T) e 65 (T – A), 1 transição na posição 80 (G – C), e, em relação a H3, por 1 substituição na posição 169 (A – T). Entre os haplótipos H4 e H5 existem 1 transversão na posição 56 (G – T) e 1 transição na posição 59 (A – T). A substituição de uma purina (A – G) por outra, ou de uma pirimidina (C – G) por outra, é denominada de transição. Já a substituição de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa, é denominada de transversão (CRUZ *et al.*, 2011).

Assis (2010) ao realizar a amplificação e o sequenciamento da região COI de espécimes da abelha *Nannotrigona testaceicornis* oriundas do campus da USP em Ribeirão Preto e de áreas externas ao mesmo, dos estados de São Paulo e Minas Gerais, obteve 5 diferentes haplótipos, resultado semelhante ao obtido no presente trabalho. Porém, dos 5 haplótipos encontrados, três estavam presentes apenas nas amostras do campus da USP, sendo dois deles compartilhados com outras amostras: um com amostras de São Paulo e Minas Gerais e outro apenas com amostras de São Paulo. Os outros 2 haplótipos encontrados foram restritos às amostras de Minas Gerais. Portanto, em relação à distribuição dos haplótipos, é possível observar que os haplótipos encontrados no presente trabalho estão restritos apenas às regiões em que foram coletos os espécimes,

demonstrando assim que, possivelmente devido à distância geográfica, essas abelhas não compartilharam material genético.

A possibilidade dessas abelhas terem voado longas distância para se reproduzirem é refutada, pois apesar de poderem voar grandes distâncias (KUHN-NETO *et al.*, 2009; RODRIGUES; RIBEIRO, 2014), presume-se que, em geral, os voos são curtos para procurar recursos alimentares (SOUZA *et al.*, 2018). O mesmo comportamento é observado em relação à reprodução, em que as abelhas geralmente têm uma dispersão relativamente baixa quando à enxameação para reprodução (SOUZA *et al.*, 2018).

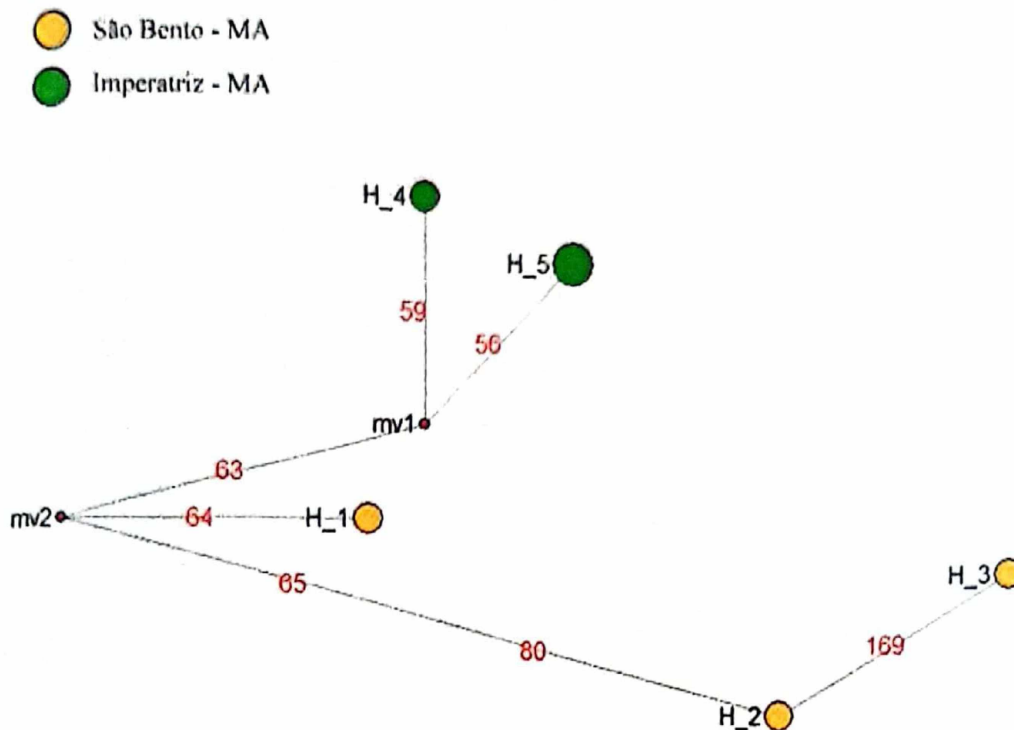
Tabela 5. Haplótipos e seus respectivos sítios variáveis. Os números verticais correspondem à posição em pb dos sítios polimórficos dentro do fragmento do gene COI de *Melipona fasciculata*.

Haplótipos	56	59	63	64	65	80	169
H1	G	A	T	A	T	G	A
H2	*	*	*	T	A	C	*
H3	*	*	*	T	A	C	T
H4	*	T	A	T	*	*	*
H5	T	*	A	T	*	*	*

Uma rede de haplótipos foi construída pelo método *Median-Joining* (Figura 6) implantado no software NETWORK v. 4.6 (POLZIN; DANESCHMAND, 2003). Na rede de haplótipos existem duas reticulações, representadas pelos círculos vermelhos menores. Esses pontos são chamados de mv (median vector), e representam os haplótipos intermediários que podem ter existido nessa população e deram origem aos haplótipos que existem atualmente. Existe a possibilidade desses pontos existirem e não terem sido amostrados, então são representados como pontos que devem ter existido para ligar os haplótipos. Portanto, o ponto mv2 poderia ter dado origem aos haplótipos de São Bento e dado origem a um haplótipo (mv1) intermediário que deu origem aos dois haplótipos de Imperatriz. É possível observar que apesar de a π interpopulacional ter sido baixa, um total de 5 haplótipos foram identificados, esse fato pode ser explicado devido a maioria deles diferirem um dos outros por poucos passos populacionais, de 3 a 4 (Figura 6).

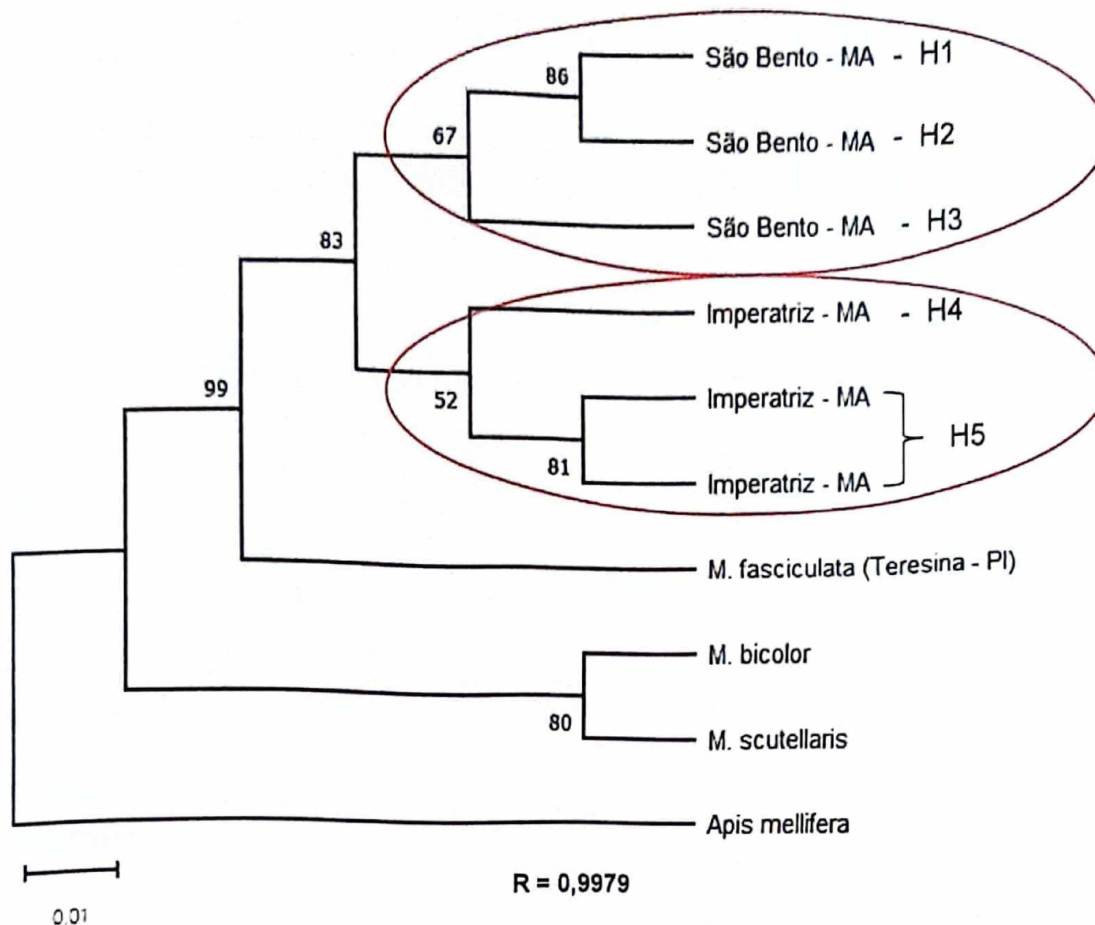
Resultados semelhantes foram encontrados por Bonatti (2012), ao identificar baixa π interpopulacional, mas quantidade considerável de haplótipos (11).

Figura 6. Rede de haplótipos para o gene COI da espécie *Melipona fasciculata*. Os números em vermelho entre as esferas representam os sítios polimórficos.



Ao observar a distribuição dos haplótipos encontrados, foi possível observar que foram agrupados em dois ramos separados. Resultado semelhante foi encontrado por Bonatti *et al.* (2014) ao estudar a abelha *M. subnitida*, onde dos 11 haplótipos encontrados no seu estudo apenas 4 foram compartilhados entre pelo menos duas populações, indicando pouco fluxo gênico, como observado no presente trabalho. O dendrograma foi gerado com base nas sequências de haplótipos identificados nas duas populações e nas sequências utilizadas como grupos externos (Figura 7). Ficou confirmada a relação entre os haplótipos encontrados e a sequência de *M. fasciculata* depositada no GenBank. Vale ressaltar que o coeficiente de correlação cofenética do dendrograma foi de 0,9979, considerado alto, o que fornece alta confiabilidade em relação às inferências geradas (ROHLF; FISHER, 1968).

Figura 7. Dendograma de proximidade genética pelo método de *Neighbor Joining* entre as populações de *Melipona fasciculata* e as espécies utilizadas como grupo externo.



Takahashi *et al.* (2001) propuseram que quanto mais recente for a separação de determinadas populações ou espécies, maiores as chances de haver compartilhamento de haplótipos, fenômeno caracterizado como Separação Incompleta de Linhagens. Portanto, o período de tempo que separa diferentes linhagens pode não ser suficiente para torna-las geneticamente distintas (SITES; MARSHALL, 2004). Então, pode-se concluir que devido não haver compartilhamento de haplótipos entre os municípios de São Bento e Imperatriz, a separação genética dessas populações pode ter ocorrido há muito tempo, tornando-as geneticamente diferentes. Além de, mais uma vez, o fato da meliponicultura não ser tão difundida ainda em Imperatriz, o transporte de colmeias com enxames possuindo diferentes materiais genéticos não deva ter chegado ao município ainda. Se esse processo fosse constatado, ocorreria direta e indiretamente a troca de genes entre essas abelhas geograficamente distantes.

Mediante os passos mutacionais observados, houve modificação na sequência proteica gerada para todos os haplótipos (Figura 8). Quando comparada a sequência de aminoácidos entre *M. fasciculata* obtidas na pesquisa com a de *M. fasciculata* oriunda de Teresina (P1), observou-se variações na sequência proteica (Figura 8). Segundo Hebert *et al.* (2003) diferenças observadas nas sequências de aminoácidos são capazes de identificar e indicar organismos como pertencentes a uma categoria taxonômica mais elevada.

Figura 8. Alinhamento das sequências de aminoácidos das amostras de *Melipona fasciculata* oriundas de São Bento (SB1, SB2 e SB3), de Imperatriz (ITZ1, ITZ2 e ITZ3) com a amostra de *Melipona fasciculata* de Teresina.

Species/Abbrv	M	N	I	S	F	W	L	P	P	S	L	M	L	L	L	L	S	N	I	I	F	P	S	S	G	T	G	W	T	I	Y	P	P	L	S	S	Y	L	H	S	S	P
1 SB1	M	N	I	S	F	W	L	P	P	S	L	M	L	L	L	L	S	N	I	I	F	P	S	S	G	T	G	W	T	I	Y	P	P	L	S	S	Y	L	H	S	S	P
2 SB2	M	N	I	S	F	W	L	P	P	S	L	M	L	L	L	L	S	N	I	I	F	P	S	S	G	T	G	W	T	I	Y	P	P	L	S	S	Y	L	H	S	S	P
3 SB3	M	N	I	S	F	W	L	P	P	S	L	M	L	L	L	L	S	N	I	I	F	P	S	S	G	T	G	W	T	I	Y	P	P	L	S	S	Y	L	H	S	S	P
4 ITZ1	M	N	I	S	F	W	L	P	P	S	L	M	L	L	L	L	S	N	I	I	F	P	S	S	G	T	G	W	T	I	Y	P	P	L	S	S	Y	L	H	S	S	P
5 ITZ2	M	N	I	S	F	W	L	P	P	S	L	M	L	L	L	L	S	N	I	I	F	P	S	S	G	T	G	W	T	I	Y	P	P	L	S	S	Y	L	H	S	S	P
6 ITZ3	M	N	I	S	F	W	L	P	P	S	L	M	L	L	L	L	S	N	I	I	F	P	S	S	G	T	G	W	T	I	Y	P	P	L	S	S	Y	L	H	S	S	P
7. <i>M. fasciculata</i> (Teresina - P1)	M	N	I	S	F	W	L	P	P	S	L	L	L	L	L	L	S	N	I	I	F	P	S	S	G	T	G	W	T	I	Y	P	P	L	S	S	Y	L	H	S	S	P

Em vermelho estão destacadas as regiões em que as variações estão presentes.

Os valores da distância-p foram calculados utilizando o modelo de Kimura-dois-parâmetros (K2P) entre as sequências dos 5 haplótipos de *M. fasciculata* e as sequências para o gene COI das espécies utilizadas como grupo externo (Tabela 6). Observou-se que a divergência nucleotídica intraespecífica variou de 0,25% a 1,26%. Ao comparar os haplótipos de São Bento e Imperatriz verificou-se que os haplótipos de diferentes municípios possuem maior divergência nucleotídica, como observado entre os haplótipos H3 (São Bento) e H4 e H54 (Imperatriz), em que constatou-se distância-p de 1,26%. As diferenças interespecíficas foram superiores a 3,85% quando levados em consideração os grupos externos, observando-se o valor máximo de 6,80% para *M. bicolor*. Resultados semelhantes foram encontrados por Hebert *et al.* (2003), que obteve divergência intraespecífica geralmente inferior a 1%, e concluiu que uma taxa modesta de divergência de apenas 2% pode significar uma história de isolamento reprodutivo de pelo menos milhões de anos.

A porcentagem de divergência para o diagnóstico de uma espécie é de 3%, confirmando assim, mais uma vez, a identificação da espécie *M. fasciculata* para as populações estudadas de São Bento e Imperatriz. Além disso, a média de divergência entre indivíduos do mesmo gênero é de 6,8% (HEBERT *et al.*, 2003). Portanto, diante

dos valores da distância-p encontrados, é possível inferir que a espécie *M. fasciculata* está geneticamente mais próxima da espécie *M. scutellaris* do que da espécie *M. bicolor*.

Tabela 6. Estimativa da divergência nucleotídica (%), baseada no modelo K2P, calculada entre os pares de haplótipos e entre esses e as sequências utilizadas como grupo externo.

	H1	H2	H3	H4	H5	Mf	Mb	Ms
H1								
H2	0,75							
H3	1,01	0,25						
H4	0,75	1,01	1,26					
H5	0,75	1,01	1,26	0,50				
Mf	1,01	1,26	1,52	0,75	0,75			
Mb	6,25	6,53	6,80	5,98	5,98	5,71		
Ms	5,98	6,26	6,53	5,71	5,71	5,45	3,85	

Mf = *M. fasciculata*, Mb = *M. bicolor* e Ms = *M. scutellaris*.

5.5 Estrutura populacional

Na AMOVA, os resultados de estruturação genética (Tabela 7) mostraram uma maior diversidade genética dentro de populações, com 66,67 % e menor diversidade entre populações com 33,33%. Para o índice de Fst (Φ) foi obtido o valor de 0,6667. Os valores para o Fst (ϕ_{ST}) podem variar de 0 (sem diversidade genética) a 1 (fixação de alelos). Wright (1978) propôs a interpretação dos valores do Fst, onde: de 0 a 0,05, pouca diferenciação genética; de 0,05 a 0,15, diferenciação moderada; de 0,15 a 0,25, grande diferenciação genética; e valores acima de 0,25 significam alta diferenciação genética. Portanto, as populações de *M. fasciculata* estudadas possuem uma alta diferenciação genética, ou seja, alta estruturação genética. Bonatti (2012) encontrou resultados semelhantes de 61,9% entre populações e 38,1% dentro de população, e Fst de 0,61898.

Tabela 7. Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) baseada nas sequências da região COI de *Melipona fasciculata*.

Componente da variação	% do total	Variância	Φ	p-valor
Interpopulacional	66,67%	1,250	0,6667	0,00000
Intrapopulacional	33,33%	0,625		

Em relação aos testes de neutralidade, embora não se tenha obtido valores significativos no teste D de Tajima (TAJIMA, 1989), o teste Fs de Fu (FU, 1997) obteve resultado igual a -3,12788, estatisticamente significativo (p-valor < 0,05) (Tabela 8). O valor negativo do teste Fs de Fu indica que pode estar ocorrendo expansões populacionais. Portanto, ao interpretar conjuntamente os dados do teste Fs de Fu e a baixa diversidade nucleotídica, pode-se concluir que estas populações podem estar sofrendo gargalos populacionais seguidos de recente expansão demográfica. Resultados semelhantes foram observados por Batalha-Filho (2008).

Tabela 8. Testes de neutralidade aplicados às sequências nucleotídicas da região COI em *Melipona fasciculata*.

Estruturação	D de Tajima	Fs de Fu
Grupo único	0,25497 p-valor = 0,60800	-3,12788 p-valor = 0,00940

6 CONCLUSÃO

- A identificação molecular obtida com a análise da região COI do mtDNA confirmou o status taxonômico de *Melipona fasciculata*, com altos índices de similaridade;
- A AMOVA confirmou a estruturação genética nas populações de *Melipona fasciculata*, com valor de F_{st} determinando uma alta estruturação genética;
- O teste de neutralidade F_s de F_u indicou que as populações estudadas podem estar sofrendo expansão populacional;
- A maior variabilidade genética foi observada na população de São Bento;
- Não foi observado compartilhamento de haplótipos entre as populações, indicando que não ocorre fluxo gênico entre elas.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ALVES, D. A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; FRANCOY, T. M.; SANTOS-FILHO, P. S.; BILLEN, J.; WENSEELES, T. Successful maintenance of a stingless bee population despite a severe genetic bottleneck. *Conservation genetics*, v. 12, n. 3, p. 647-658, 2011.
- ARAÚJO, K. S. S.; JÚNIOR, J. F. S.; SATO, M. O.; FINCO, F. D. B. A.; SOARES, I. M.; BARBOSA, R. S.; ALVIM, T. C.; ASCÊNCIO, S. D.; MARIANO, S. M. B. Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (Meliponinae) and Apis from two regions of Tocantins, Brazil. *Acta Amaz.*, v. 46, p. 61-68, 2016.
- ARAÚJO, M. J. A. M.; BÚFALO, M. C.; CONTI, B. J.; FERNANDES JR. A.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. *J. Mol. Pathophysiol.*, v. 4, p. 12-20, 2015.
- ARIAS, M. C.; FRANCISCO, F. O.; SILVESTRE, D. O DNA Mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. In: MELO, G. A. R.; ALVES-DOS-SANTOS, I. *Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure*. Criciúma: Editora UNESC, 2003. 320 p.
- ASSIS, A. F. **Estudo populacional e molecular de *Nannotrigona testaceicornis* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) através de DNA mitocondrial**. 2010. 66 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- AVISE J. C. **Molecular Markes, Natural History and Evolution**. Chapman e Hall: New York, 2004.
- BARTOLOMEU, A. R.; FRIÓN-HERRERA, Y.; DA SILVA, L. M.; ROMAGNOLI, G. G.; DE OLIVEIRA, D. E.; SFORCIN, J. M. Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *Biomed. Pharmacother.*, v. 81, p. 48-55, 2016.
- BATALHA-FILHO, H. **Distribuição geográfica, filogeografia e história evolutiva da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae)**. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- BATISTA, M. C. A.; ABREU, B. V. B.; DUTRA, R. P.; CUNHA, M. S.; AMARAL, F. M. M.; TORRES, L. M. B.; RIBEIRO, M. N. S. Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão State, northeastern Brazil. *Acta Amaz.*, v. 46, p. 315-322, 2016.

BONATTI, V. **Caracterização genético-morfológica de populações de *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) no nordeste brasileiro.** 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto, 2012.

BONATTI, V.; SIMÕES, Z. L. P.; FRANCO, F. F.; FRANCOY, T. M. Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. *Naturwissenschaften*, v. 101, p. 17-24, 2014.

CÂMARA, J. Q.; SOUSA, A. H. de; VASCONCELOS, W. E. de; FREITAS, R. da S. F.; MAIA, P. H. da S.; ALMEIDA, J. C. da; MARACAJÁ, P. B. Estudos de meliponíneos, com ênfase a *Melipona subnitida* D. no município de Jandaíra, RN. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 4, n. 1, p. 20, 2004.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. *Meliponini Lepeletier, 1836*. In: MOURE, J. S.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apidae) in the Neotropical Region*, Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, 2007. 1058 p.

CAMARGO, S. C.; LIMA, E. G. de; TOLEDO, V de A. A. de; GARCIA, R. C. Abelha rainha *Apis mellifera* e a produtividade da colônia. *Scientia Agraria Paranaensis*, v.14, n.4, p.213-220, 2015.

CAMPOS, J. F.; SANTOS, U. P.; MACORINI, L. F. B.; MELO, A. M. M. F.; BALESTIERI, B. P. J.; PAREDES-GAMERO, E. J.; CARDOSO, C. A. L.; SOUZA, K. P.; SANTOS, E. L. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chem. Toxicol.*, v. 65, p. 374–380, 2014.

CARVALHO-ZILSE, G. A.; COSTA-PINTO, M. F. F.; NUNES-SILVA, C. G.; KERR, W. E. Does beekeeping reduce genetic variability in *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini)? *Genetics and Molecular Research*, v. 8, n. 2, p. 758-765, 2009.

CINEGAGLIA, N. C.; BERSANO, P. R. O.; ARAÚJO, M. J. A. M.; BUFALO, M. C.; SFORCIN, J. M. Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells in vitro. *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, v. 2013, p. 1-6, 2013.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I.; VENTURIERI, G. C.; EARDLEY, C.; NOGUEIRA-NETO, P. Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie*, v. 37, p. 275-292, 2006.

CROZIER, R. H.; CROZIER, Y. C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, v. 133, n. 1, p. 97-117, 1993.

CRUZ, C. D.; VIANA, J. M. S.; CARNEIRO, P. C. S.; BHERING, L. L. **Genética, volume II: GBOL – software para ensino e aprendizagem de genética.** 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2011. 326p.

CUNHA, M. G.; FRANCHIN, M.; GALVÃO, L. C. C.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; KOO, H.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 13, n. 23, p. 1-9, 2013.

CUNHA, M. G.; ROSALEN, P. L.; FRANCHIN, M.; DE ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; RANSOM, T.; BEUTLER, J. A. Antiproliferative constituents of geopropolis from the bee *Melipona scutellaris*. **Planta Med.**, v. 82, p. 190–194, 2016.

CUNHA, M. S.; DUTRAS, R. P.; BATISTA, M. C. A.; ABREU, B. V. de B.; SANTOS, J. R. dos; NEIVA, V. do A.; AMARAL, F. M. M. do; RIBEIRO, M. N. de S. Padronização de extrativos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* smith (Tiúba). **Caderno de Pesquisa**, v. 16, n. 3, p. 8, 2009.

DA SILVA, S. S.; THOMÉ, G. S.; CATANEO, A. H. D.; MIRANDA, M. M.; FELIPE, I.; ANDRADE, C. G. T. J.; WATANABE, M. A. E.; PIANA, G. M.; SFORCIN, J. M.; PAVANELLI, W. R.; CONCHON-COSTA, I. Brazilian propolis antileishmanial and immunomodulatory effects. **Evid. Based Complement. Altern. Med.**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

DUTRA, R. P.; ABREU, B. V. B.; CUNHA, M. S.; BATISTA, M. C. A.; TORRES, L. M. B.; NASCIMENTO, F. R. F.; RIBEIRO, M. N. S.; GUERRA, R. N. M. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **J. Agric. Food Chem.**, v. 62, p. 2549–2557, 2014.

DUTRA, R. P.; BEZERRA, J. L.; DA SILVA, M. C. P.; BATISTA, M. C. A.; PATRÍCIO, F. J. B.; NASCIMENTO, F. R. F.; RIBEIRO, M. N. S.; GUERRA, R. N. M. Antileishmanial activity and chemical composition from Brazilian geopropolis produced by stingless bee *Melipona fasciculata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 287-293, 2019.

DUTRA, R. P.; NOGUEIRA, A. M. C.; MARQUES, R. R. de O.; COSTA, M. C. P.; RIBEIRO, M. N. S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. October, p. 557–562, 2008.

EPAGRI. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **Meliponicultura**. Florianópolis, 2017. 56p. (Boletim Didático, 141).

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564-567, 2010.

FERNANDES, R. T. **Características de qualidade do mel de abelha Tiúba (*Melipona fasciculata* Smith, 1854, Hymenoptera, Apidae), como contribuição para sua regulamentação**. 2017. 133 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2017.

FERNANDES, R. T.; CONTI-SILVA, A. C.; ROSA, I. G. Características de qualidade do mel de abelha sem ferrão (*Melipona fasciculata*) produzidos na baixada maranhense. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n.6, p.41268-41275, 2020.

FERNANDES, R. T.; ROSA, I. G.; CONTI-SILVA, A. C. Honey from Tiúba stingless bees (*Melipona fasciculata*) produced in diferente ecosystems: physical and sensory studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, p. 3748-3754, 2020.

FERREIRA, J. M.; FERNANDES-SILVA, C. C.; SALATINO, A.; MESSAGE, D.; NEGRI, G. Antioxidant activity of a geopropolis from northeast Brazil: chemical characterization and likely botanical origin. **Evid. Based Complement. Altern. Med.**, v. 2017, p. 1-6, 2017.

FRANCHIN, M.; CUNHA, M. G.; DENNY, C.; NAPIMOGA, M. H.; CUNHA, T. M.; KOO, H.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Bioactive fraction of geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases neutrophils migration in the inflammatory process: involvement of nitric oxide pathway. **Evid. Based Complement. Altern. Med.**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

FRANCISCO, F. O. **Diversidade Genética de Populações da Abelha sem Ferrão *Plebeia remota*: Análise do DNA Mitocondrial e Microsatélites**. 2002. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2002.

FRANCISCO, F. O. **Estrutura e diversidade genética de populações insulares e continentais de abelhas da Mata Atlântica**. 2012. 170 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, 2012.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. R.; BRSCOE, D. A. **Introduction to Conservation Genetics**. 2. ed. Cambridge University Press. Cambridge, England, 2010. 644p.

FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; MEDINA, L. M.; KLEINERT, A. de M. P.; GALETTO, L.; NATES-PARRA, G.; QUEZADA-EUÁN, J. J. G. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, v. 40, p. 332–346, 2009.

FREITAS, P. V. D. X. de; SILVA, I. E. da; FAQUINELLO, P.; ZANATA, R. A.; ARNHOLD, E.; SILVA-NETO, C. de M. External activity of the stingless bee *Melipona fasciculata* (Smith) kept in the Brazilian Cerrado. **Journal of Apicultural Research**, v. 2020, p. 1-6, 2020.

FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, p. 915-925, 1997.

GONÇALVES, P. H. P. **Análise da variabilidade genética de uma pequena população de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microsatélites e morfometria geométrica das asas**. 2010. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, 2010.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; WAARD, J. R. de. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HILLIS, D. M.; MORTIZ, C.; MABLE, B. K. **Molecular Systematics**. 2 ed. Sinauer Associates: Massachusetts, 1996. 655 p.

HOLANDA, C. A.; OLIVEIRA, A. R.; COSTA, M. C. P.; RIBEIRO, M. N. de S.; SOUZA, J. L.; ARAÚJO, M. J. A. M. Qualidade dos méis produzidos por *Melipona fasciculata* SMITH da região do Cerrado Maranhense. **Química Nova**, v.35, n. 1, p. 55-58, 2012.

HOLLAND, B. S.; HADFIELD, M. G. **Islands within an island: Phylogeography and conservation genetics of the endangered Hawaiian tree snail *Achatinella mustelina***. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 365-376, 2002.

KERR, W. E. **As Abelhas e o Meio Ambiente**, Trabalho apresentado ao XII Congresso Brasileiro de Apicultura, realizado em Salvador, BA, Uberlândia, MG, pp. 1-8, 1998.

KERR, W. E. **Biologia e manejo da tiúba: a abelha do Maranhão**. 1. ed. São Luís: EDUFMA, 1996. 156 p.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; SILVA, A. C. da; ASSIS, M da G. P. de. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias Estratégicas**, v.12, p.20-41, 2001.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KUHN-NETO, B.; CONTRERA, F. A. L.; CASTRO, M. S.; NIEH J. C. Long distance foraging and recruitment by a stingless bee, *Melipona mandacaia*. **Apidologie**, v. 40, p. 472-480, 2009.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol. Biol. Evol.**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.

LIBERIO, A. S.; PEREIRA, A. L. A.; DUTRA, R. P.; ARAMYS, S. R.; ARAÚJO, M. J. A. M.; MATTAR, N. S.; SILVA, L. A.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; GUERRA, R. N. M.; MONTEIRO-NETO, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 11, n. 108, p. 1-10, 2011.

LIMA-VERDE, L.W.; FREITAS, B. M. A criação de abelhas indígenas sem ferrão de potencial zootécnico – uma alternativa socioeconômica e agroecológica para as populações rurais do Nordeste do Brasil. In: XIMENES, L.J.; COSTA, L.S.A.;

- NASCIMENTO, J. L. S. **Manejo racional de abelhas africanizadas e de meliponíneos no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2011. 386 p.
- LOPES, D. M. **Diversidade e estrutura genética em populações de *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae) por análise de microssatélites**. 2004. 55 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2004.
- MENEZES, C. **Abelha tiúba (*Melipona fasciculata* Smith)**. 2021. 1 fotografia. Disponível em: < <https://abelha.org.br/fichas-catalograficas-das-especies-relevantes-para-a-meliponicultura/>>. Acesso em: 29/12/2021.
- MICHENER, C. D. **The bees of the World**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 2007, 953 p.
- MICHENER, C. D. The Meliponini. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. H. (Orgs.). **PotHoney: um legacy of stingless bees**. New York: Springer, 2013. 654 p.
- MORGADO, L. N.; CARVALHO, C. F.; SOUZA, B.; SANTANA, M. P. Fauna de Abelhas (HYMENOPTERA: APOIDEA) nas Flores de Girassol *Helianthus annuus* L. em Lavras – MG. **Ciência e agrotecnologia**, v. 26, n. 6, p. 1167-1177, 2002.
- MULI, E. M.; MAINGI, J. M.; MACHARIA, J. Antimicrobial properties of propolis and honey from the Kenyan stingless bee, *Dactylurina schimidti*. **Apiacta**, v. 43, p. 49–61, 2008.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol**, v. 55, p. 335-350, 1987.
- MURRAY, T.; KUHLMANN, M.; POTTS, S. Conservation ecology of bees: populations, species and communities. **Apidologie**, v. 40, p. 211-236, 2009.
- NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press, New York., 1987. 514 p.
- NEI, M.; MILLER, J. C. A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. **Genetics**, v. 125, p. 873- 879, 1990.
- NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Editora Nogueirapis, 1997. 445 p.
- NUNES-SILVA, P.; HRNCIR, M.; SILVA, C. I. da; ROLDÃO, Y. S.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Stingless bees, *Melipona fasciculata*, as efficient pollinators of eggplant (*Solanum melongena*) in greenhouses. **Apidologie**, v. 44, p. 537–546, 2013.
- OLIVEIRA, P. S.; MÜLLER, R. C. S.; DANTAS, K. das G. F.; ALVES, C. N.; VASCONCELOS, M. A. M. de; VENTURIERI, G. C. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae,

Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. *Química Nova*, v. 35, n. 9, p. 1728–1732, 2012.

OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, C.; SOARES, A. E. E.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Trap-nests for stingless bees. *Apidologie*, v. 44, p. 29-37, 2013.

OLIVEIRA, W. J. de S. **Etnobiologia das abelhas nativas do Brasil nas etnias Kaiabi, Kayapó, Xavante e Guarani**. 2020. 21 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas Licenciatura) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Departamento de Biologia, Goiânia, 2020.

PEREIRA, J. O. P. **Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* baseada no seqüenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear**. 2006. 142 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

PEREIRA, U. de P.; BONETTI, A. M.; GOULART, L. R.; SANTOS, A. R. dos; OLIVEIRA, G. C. de; CUADROS-ORELLANA, S.; UREIA-VIEIRA, C. Complete mitochondrial genome sequence of *Melipona scutellaris* a Brazilian stingless bee. *Mitochondrial DNA Part A*, v. 27, n. 5, p. 3387-3388, 2016.

PEREIRA, V. A.; ARBOITTE, M. Z.; SOUZA, T. H. S. de; ANASTÁCIO, M. D.; PIRES, J. N.; BRAUSE, C. A.; MELO, A. F. de. Produção de rainhas de *Apis mellifera* L. africanizadas em colônias com rainhas ou orfanadas. *Conjecturas*, v. 21, n. 6, p. 927-947, 2021.

POLZIN, T.; DANESHMAND, S. V. On steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters*, v. 31, n. 1, p. 12 – 20, 2003.

RIBEIRO-JUNIOR, J. A.; FRANCHIN, M.; CAVALLINI, M. E.; DENNY, C.; DE ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Gastroprotective effect of geopropolis from *Melipona scutellaris* is dependent on production of nitric oxide and prostaglandin. *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, v. 2015, p. 1-5, 2015.

RICARDO, P. C.; FRANÇOSO, E.; ARIAS, M. C. Fidelity of DNA polymerases in the detection of intraindividual variation of mitochondrial DNA. *Mitochondrial DNA Part B*, v. 5, n. 1, p. 108-112, 2020.

RODRIGUES, A. S. **Etnoconhecimento sobre as abelhas sem ferrão: Saberes e Prática dos Índios Guarani M'BYÁ na Mata Atlântica**. 2005. 236 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ/USP, Piracicaba, 2005.

RODRIGUES, F.; RIBEIRO, M. F. Influence of experience on homing ability of foragers of *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Sociobiology*, v. 61, p. 523–528, 2014.

ROZAS, J.; FERRER-MATA, A.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; GUIRAO-RICO, S.; LIBRADO, P.; RAMOS-ONSINS, S. E.; SÁNCHEZ-GRACIA, A. DnaSP 6: DNA

Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol. Biol. Evol.*, v. 34, p. 3299-3302, 2017.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ERNHEIN, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. **Cold Spring Harbor Laboratory**, 1989.

SANTOS, F. S. dos; DUARTE, O. M. O. Percepção de moradores rurais do entorno de um fragmento de Mata Atlântica em Porto Seguro - BA sobre as abelhas sem ferrão. *Pindorama*, v. 7, n. 7, 2018.

SANTOS, H. F. D.; CAMPOS, J. F.; SANTOS, C. M. D.; BALESTIERI, J. B. P.; SILVA, D. B.; CAROLLO, C. A.; DE PICOLI SOUZA, K.; ESTEVINHO, L. M.; DOS SANTOS, E. L. Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 18, n. 5, p. 1-18, 2017.

SCHNEIDER, H. **Método de Análise Filogenética: Um Guia Prático**. 3. ed. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2007. 200 p.

SEQUEIRA, F.; ALEXANDRINO, J.; ROCHA, R.; ARNTZEN, J. W.; FERRAND, N. Genetic exchange across a hybrid zone within the Iberian endemic golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica*. *Molecular Ecology*, v. 14, p. 245-254, 2005.

SILVA, G. R. da. **Genômica e genética populacional da abelha-sem-ferrão *Melipona fasciculata* no Brasil**. 2018. 191 f. Dissertação (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2018.

SILVA, G. R. da; PEREIRA, F. de M.; SOUZA, B. de A.; LOPES, M. T. do R.; CAMPELO, J. E. G.; DINIZ, F. M. Aspectos bioecológicos e genético-comportamentais envolvidos na conservação da abelha Jandaíra, *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini), e o uso de ferramentas moleculares nos estudos de diversidade. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 81, n. 3, p. 299-308, 2014.

SILVA, G. R. da; PEREIRA, F. de M.; SOUZA, B. de A.; LOPES, M. T. do R.; DINIZ, F. M. Pesquisas com abelhas-sem-ferrão (Hymenoptera: Meliponini) e aplicabilidade dos marcadores moleculares: Uma revisão sistemática da literatura. *PUBVET*, v.13, n.1, p.1-19, 2019.

SILVA, J. M. **Recursos alimentares utilizados por abelhas *Apis mellifera scutellata* e *Melipona compressipes fasciculata* em São Bento - Baixada maranhense**. 2006. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luiz, Maranhão, 2006.

SILVA, W. P.; PAZ, J. R. L. Abelhas-sem-ferrão: muito mais do que uma importância econômica. *Natureza*, v. 10, n 3, p. 146-152, 2012.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: Sistemática e Identificação**. 1. ed. Belo Horizonte: Fernando A. Silveira, 2002. 253 p.

SILVESTRE, D. **Sequenciamento e análise do genoma mitocondrial de *Melipona Bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2002. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Biologia, 2002.

SILVESTRE, D.; DOWTON, M.; ARIAS, M. C. 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. **Genet. Mol. Biol.**, v. 32, n. 2, p. 451-460, 2008.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n. 6, p. 651-701, 1994.

SITES JR., J. W.; MARSHALL, J. C. Operational criteria for delimiting species. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 35, p.199-277, 2004.

SLAA, E. J.; CHAVES, L. A. S.; MALAGODI-BRAGA, K. S.; HOFSTEDE, F. E. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 293-315, 2006.

SOUZA, B. A.; DE CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M. O. Notas sobre a Bionomia de *Melipona Asilvai* (Apidae: Meliponini) como subsídio à sua criação racional. **Arch. Zootec.**, v. 57, n. 217, p. 53-62, 2008.

SOUZA, F. S. de; COSTA, M. A. P. de C.; OLIVEIRA, E. J. F. de; RIBEIRO, M. de F.; SOUZA, B. de A.; ARAÚJO, E. D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CARVALHO, C. A. L. de. Genetic Variability of *Melipona subnitida* (Hymenoptera: Apidae) in Introduced and Native Populations. **Journal of Insect Science**, v. 18, n. 5, p. 1-6, 2018.

SOUZA, S. A.; CAMARA, C. A.; SILVA, E. M. S.; SILVA, T. M. S. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (jandaíra) bees. **Evid. Based Complement. Altern. Med.**, v. 2013, p. 1-5, 2013.

SOUZA, S. A.; DIAS, T. L. M. F.; SILVA, T. M. G.; FALCÃO, R. A.; MOREIRA, M. S. A.; SILVA, E. M. S.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. Chemical composition, antinociceptive and free radical-scavenging activities of geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, v. 61, p. 560-565, 2014.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, p.585-595, 1989.

TAKAHASHI, K.; TERAJ, Y.; NISHIDA, M.; OKADA, N. Phylogenetic relationships and ancient incomplete lineage sorting among cichlid fishes in lake Tanganyika as

revealed by analysis of the insertion of retroposons. **Molecular Biology and Evolution** v.18, n.11, p. 2057–2066, 2001.

VENTURIERI, G. C. **Criação de abelhas indígenas sem ferrão**. 2. ed. rev. atual. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. 60 p.

VENTURIERI, G. C.; RAIOL, V. F. O.; PEREIRA, C. A. B. Avaliação da criação racional de *Melipona fasciculata* (Apidae: Meliponina), entre os agricultores familiares de Bragança, PA, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2003.

VENTURIERI, G. R. **Ecologia da polinização do açaizeiro (*Euterpe oleracea*) com e sem a introdução de colônias da abelha urucu-amarela (*Melipona flavolineata*)**. 2015. 120 f. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, Brasil, 2015.

VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), 2012. 96 p.

VITAL, T. G. **Revisão de literatura: importância das abelhas nativas (melíponas) para os pequenos produtores**. 2017. 32 f. Monografia (Curso Superior de Tecnologia em Agroecologia) – Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, Paraíba, 2017.

WANG, J. T. L.; ZHANG, K.; CHANG, G.; SHASHA, D. Finding approximate patterns in undirected acyclic graphs. **Pattern Recognition**, v. 35, n.2, p. 473- 483, 2002.

WAUGH, J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **BioEssays: News and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 29, n. 2, p. 188-97, 2007.

WEINLICH, R.; FRANCISCO, F. de O.; ARIAS, M. C. Mitochondrial DNA restriction and genomic maps of seven species of *Melipona* (Apidae: Meliponini). **Apidologie**, v. 35, n. 4, p. 365-370, 2004.

WILSON, A. C.; CANN, R. L.; CARR, S. M.; GEORGE, M.; GYLLENSTEN, U. B.; HELM-BYCHOWSKI, K. M.; HIGUCHI, R. G.; PALUMBI, S. R.; PRAGER, E. M.; SAGE, R. D.; STONEKING, M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biol. J. Linn. Soc.**, v. 26, p. 375-400, 1985.

WRIGHT, S. **Evolution and Genetics of Populations: Variability within and among Natural Populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 465 p.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F statistics with special regard to system of mating. **Evolution**, Lawrence, v. 19, p. 395-342, 1965.