

HELDER CANTO RESENDE

FILOGEOGRAFIA E CONSERVAÇÃO DE *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994 E *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, E BIOGEOGRAFIA DO GÊNERO *Melipona* Illiger, 1806 (HYMENOPTERA: APIDAE)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R433f
2012

Resende, Helder Canto, 1977-

Filogeografia e conservação de *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994 e *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, e biogeografia do gênero *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera: Apidae) / Helder Canto Resende. – Viçosa, MG, 2012. xiv, 140f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Abelha sem ferrão. 2. Abelha sem ferrão - Genética.
3. Mata Atlântica - Conservação. 4. Filogeografia.
5. Biogeografia. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.799

HELDER CANTO RESENDE

FILOGEOGRAFIA E CONSERVAÇÃO DE *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994 E *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, E BIOGEOGRAFIA DO GÊNERO *Melipona* Illiger, 1806 (HYMENOPTERA: APIDAE)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 05 de junho de 2012.

Eduardo Andrade Botelho de Almeida

Luiz Orlando de Oliveira

Karla Suemy Clemente Yotoko
(Coorientadora)

Sérgio Lucena Mendes

Lucio Antonio de Oliveira Campos
(Orientador)

"Quanto maiores a agudeza e severidade com que formulamos uma tese, tanto mais irresistivelmente ela clamará pela sua antítese."

Hermann Hesse. O jogo das contas de Vidro, 1943.

Dedico às minhas professoras:

Cassia Eufrasio Canto Resende, minha mãe e primeira professora, que cuidadosamente me ensinou que se deve ter os trabalhos sempre limpos.

Tia Tânia que na pré escola me alfabetizou na Cartilha Sodré e me ensinou que mesmo sabendo que os queijos são brancos devemos pintá-los de amarelo para que outros o vejam.

Marisa, minha professora de biologia no ensino médio, que identificou em mim um pesquisador e matou o infeliz técnico em informática que eu seria.

Terezinha Aparecida Teixeira minha professora de Genética na graduação, com gratidão por ter me iniciado na ciência do DNA conduzindo meus caminhos para a Universidade Federal de Viçosa.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e companheiro de tantos cafezinhos Lucio Antonio de Oliveira Campos, professor e orientador não só no doutorado, mas na vida. Meu muito obrigado por todas as palavras sempre sábias. Jogamos muita conversa fora e aproveitamos outras tantas. Espero contá-lo sempre entre meus bons amigos.

Paula, Julia e Bárbara. Somos nossa família. "Amo vocês, vocês me amam, somos uma família feliz. Com um forte abraço e um grande beijo meu, quero dizer, amo vocês". Muito obrigado por me amarem tanto e sempre, especialmente quando não mereço.

Ao amigo e companheiro de coletas Iris Stanciola. Muito obrigado pelas boas horas de convivência e por ter se ausentado de sua família para me ajudar nas expedições. Muito obrigado por ter me ensinado tanto.

Aos criadores de abelha sem ferrão do Espírito Santo, Bahia, Sergipe, Pernambuco e Paraíba, por dividirem seus conhecimentos comigo. Sem o auxílio destes nada teria sido feito. Muito Obrigado. Em especial, agradeço ao senhores José Valin (*in memorian*), Fábio Caliman, Orzênio Zorzal, José Luiz Teixeira, Jovane, José Belon, Jerônimo Vilas Boas, Vianney Jr. e Felipe Tirelli.

Meus mais sinceros agradecimentos a todos que colaboraram em várias etapas deste trabalho, em especial:

Aos amigos e colaboradores nas coletas Aline Borba Santos, Ana Maria Waldschmidt e seus alunos, Denilson Luiz, Henrique Batalha Filho, Jerônimo Vilas Boas, Joaquim, José Mauro de Souza Balbino, José Bellon, Rafael Justino Braz, Rui Peruqueti, Vianney Jr. e Weider Santana.

Aos professores e amigos Fabrício Rodrigues dos Santos, Anderson, Bárbara e José Eustáquio do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, da Universidade Federal de Viçosa, especialmente aos amigos Anderson Fernandes e Hugo Werneck, aos professores Tânia, Mara, Gustavo e Denilce, aos companheiros Danúbia Rosa, Andressa, Bárbara, Denise, Juliana e Marcília pela boa convivência.

Agradeço aos membros da banca de qualificação e de defesa de tese, professores Eduardo A. B. Almeida, Fernando A. Silveira, Karla S. C. Yotoko, Luiz Orlando de Oliveira, Sérgio Lucena Mendes e Tânia M. Fernandes Salomão, pelas valiosas contribuições para a minha formação e para a melhoria deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa.

Ao Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa

Às agências de fomento FAPEMIG, CNPq e CAPES pela concessão de bolsa de estudos e recursos que viabilizaram a execução de nossos projetos de pesquisa.

RESUMO

RESENDE, Helder Canto, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2012. **Filogeografia e conservação de *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994 e *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, e biogeografia do gênero *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera: Apidae).** Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Coorientadores: Karla Suemy Clemente Yotoko e Mara Garcia Tavares

A abelha sem ferrão *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994, a uruçucapixaba, é endêmica da Mata Atlântica brasileira e está ameaçada de extinção. Sua distribuição geográfica é conhecida apenas em áreas de altitude do estado do Espírito Santo. *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, a uruçú nordestina, tem sido considerada como presumivelmente ameaçada de extinção devido à redução de sua área de ocorrência natural. A espécie ocorre na Mata Atlântica entre os estados da Bahia ao Rio Grande do Norte. O presente trabalho teve por objetivo determinar a área de ocorrência geográfica da espécie *M. capixaba*, inferir as relações filogenéticas e filogeográficas entre *M. capixaba* e *M. scutellaris*, estudar um caso de hibridação entre essas abelhas e apresentar uma hipótese sobre a história biogeográfica do gênero *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera: Apidae). Os resultados obtidos indicam que a espécie *M. capixaba* ocorre apenas no estado do Espírito Santo em altitudes entre 800 e 1200 metros, com temperaturas médias anuais em torno de 18-23°C e cobertura vegetal do tipo Floresta Ombrófila Densa e Floresta Ombrófila Aberta, restrita a uma área de aproximadamente 3450Km², possivelmente a menor distribuição geográfica conhecida entre as abelhas sem ferrão. As espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* são espécies irmãs como demonstra as árvores filogenéticas reconstruídas com base em sequências mitocondriais e nucleares. O atual padrão de diversidade genética dessas espécies deve ser explicado por eventos históricos de vicariância na Mata Atlântica. A hibridação entre essas abelhas foi confirmada e os resultados demonstram que machos de *M. scutellaris* são capazes de fecundar rainhas de *M. capixaba*, gerando híbridos férteis. Por isso, deve-se impedir a introdução de colônias de *M.*

scutellaris na área de ocorrência da espécie ameaçada *M. capixaba*. A história biogeográfica do gênero *Melipona* deve ser explicada por processos históricos de expansão geográfica e vicariância desde o Mioceno e Plioceno, até processos mais recentes de vicariância, no Pleistoceno, em diferentes ambientes da América do Sul, América Central e México. Assim, as relações filogenéticas e biogeográficas entre as espécies do gênero *Melipona* oferecem interessante perspectiva de estudo para o entendimento da história biogeográfica Neotropical.

ABSTRACT

RESENDE, Helder Canto, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2012. **Phylogeography and conservation of *Melipona capixaba* Moure and Camargo, 1994 and *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, and biogeography of the genus *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera: Apidae).** Adviser: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Co-advisers: Karla Suemy Clemente Yotoko and Mara Garcia Tavares.

The stingless bee *Melipona capixaba* Moure and Camargo, 1994, the "uruçu-capixaba" is endemic to the Brazilian Atlantic Forest and is threatened with extinction. Their geographical distribution is known only in high altitude areas of the state of Espírito Santo. *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, the "uruçu-nordestina", has been considered as presumably threatened with extinction due to the reduction of its area of natural occurrence. The species occurs in the Atlantic Forest between the states of Bahia and Rio Grande do Norte. This study aimed to determine the geographic area of occurrence of the species *M. capixaba*, infer the phylogenetic and phylogeographic relationships between *M. capixaba* and *M. scutellaris*, study a case of hybridization between these bees and present a hypothesis about the biogeographic history of the genus *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera: Apidae). The results indicate that the species *M. capixaba* occurs only in the state of the Espírito Santo, Brazil at altitudes between 800 and 1200 meters, with average annual temperatures around 18-23° C, and vegetation type ombrophilous dense Atlantic Forest and open ambrophilous forest, restricted to an area of approximately 3,450 Km², possibly the smallest known geographical distribution among the stingless bees. *M. capixaba* and *M. scutellaris* are sisters species as demonstrated by reconstructed phylogenetic trees based on nuclear and mitochondrial sequences. The current pattern of genetic diversity of these species must be explained by historical vicariance events in the Atlantic Florest. The hybridization between these bees was confirmed and the results show that male *M. scutellaris* are able to fertilize the queens of *M. capixaba*, creating fertile hybrids. Therefore, we must prevent the introduction of colonies of *M. scutellaris* in the area of

occurrence of threatened species *M. capixaba*. The biogeographic history of the genus *Melipona* be explained by historical processes of expansion and vicariance of the Miocene and Pliocene, to more recent cases of vicariance in the Pleistocene, in different environments of South America and Central America. Thus, the phylogenetic and biogeographic relationships among species of the genus *Melipona* study offers interesting perspective for understanding the biogeographic history Neotropical.

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
Histórico dos estudos com <i>Melipona capixaba</i>	2
Contribuições e perspectivas.....	4
CAPÍTULO 1. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA, MANEJO E CONSERVAÇÃO DA ABELHA SEM FERRÃO <i>Melipona capixaba</i> (Hymenoptera: Apidae)	6
1. RESUMO.....	6
2. INTRODUÇÃO	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
4.1. Distribuição Geográfica.....	13
4.2. Distribuição geográfica em relação à altitude	15
4.3. Distribuição geográfica e temperatura média anual.....	18
4.4. Distribuição geográfica e vegetação	20
4.5. Área Estimada de Ocorrência da <i>Melipona capixaba</i>	22
4.6. Distribuição geográfica e condições climáticas.....	24
4.7. Considerações acerca do endemismo da espécie	24
4.8. Status de conservação	25
4.9. Remanescentes Florestais	26
4.10. Aspectos legais da criação da urucu capixaba	30
4.11. Uso não sustentável: risco para a manutenção da espécie.....	32
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
6. AGRADECIMENTOS	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

**CAPÍTULO 2. FILOGEOGRAFIA DAS ABELHAS SEM FERRÃO
Melipona capixaba e *Melipona scutellaris*: CONSERVAÇÃO DE
 POPULAÇÕES AMEAÇADAS.....39**

1. RESUMO.....	39
2. INTRODUÇÃO	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1. Material biológico	45
3.2. Análises moleculares	45
3.3. Análises populacionais, hipóteses filogenéticas, redes de haplótipos e datação molecular	46
4. RESULTADOS	49
4.1. Variação nucleotídica.....	49
4.2. Inferências Filogenéticas	50
4.3. Divergência Genética e Estruturação Geográfica	52
4.4. Análises de Variação Molecular AMOVA e índices de fixação ..	58
4.5. Estimativas de Diversidade.....	59
4.6. Datação Molecular e tempo de divergência.....	60
5. DISCUSSÃO	62
5.1. Relações filogenéticas	62
5.2. Eventos de especiação.....	62
5.3. Unidades de manejo e populações para conservação.	67
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

**CAPÍTULO 3. NOVO REGISTRO DE HIBRIDAÇÃO ENTRE AS
 ABELHAS *Melipona capixaba* e *Melipona scutellaris* (Hymenoptera:
 Apidae).....78**

1. RESUMO.....	78
2. INTRODUÇÃO	79

3. MATERIAL E MÉTODOS	83
3.1. Material biológico	83
3.2. Dados morfológicos e moleculares	83
3.3. Análises de similaridade	84
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4.1. Comparações morfológicas	85
4.2. Evidências moleculares - DNA mitocondrial	86
4.3. Evidências moleculares - DNA nuclear	88
4.4. Consequências para a conservação de <i>M. capixaba</i>	92
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
CAPÍTULO 4. História biogeográfica do gênero <i>Melipona</i> Illiger, 1806 (Hymenoptera:Apidae): expansão e vicariância na América do Sul e América Central.	97
1. RESUMO	97
2. INTRODUÇÃO	98
3. MATERIAL E MÉTODOS	102
3.1. Material biológico	102
3.2. Dados moleculares	102
3.3. Análises filogenéticas, rede de haplótipos e datação molecular	103
4. RESULTADOS	105
4.1. Hipótese filogenética e datação molecular.	105
4.2. Relações filogenéticas, datação molecular e distribuição geográfica das espécies	109
4.2.1. Subgênero <i>Michmelia</i> , grupos <i>Fasciata</i> , <i>Melanoventer</i> e <i>Rufiventris</i>	109
4.2.2. Subgênero <i>Melikerria</i>	112
4.2.3. Subgênero <i>Melipona</i>	115

5. DISCUSSÃO	116
5.1. Processos biogeográficos na Região Amazônica.....	116
5.2. Processos biogeográficos na Mata Atlântica	117
5.3. Processos biogeográficos em ambientes de formações abertas	118
5.4. Ocupação da América Central e México.....	120
5.5. Relações entre os diferentes ambientes.....	121
5.6. Esboço sobre a história biogeográfica do gênero <i>Melipona</i>	123
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
CONCLUSÕES GERAIS.....	130
ANEXOS.....	131

INTRODUÇÃO GERAL

Melipona capixaba Moure e Camargo (1994) é uma abelha sem ferrão (Apidae: Meliponini) de porte relativamente grande (operárias de 11mm) com registros de ocorrência conhecidos, até então, apenas para as regiões de altitudes elevadas no entorno da localidade de Aracê, município de Domingos Martins, ES. Essa talvez seja a menor distribuição conhecida entre as abelhas sem ferrão (Melo, 1996). Apesar de estar incluída na lista vermelha da fauna brasileira ameaçada de extinção, justificando conhecimentos mais amplos para sua preservação, pouco ainda se sabe sobre sua área de distribuição geográfica atual, as condições em que se encontram as possíveis populações remanescentes, a história evolutiva da espécie, os desafios e perspectivas para a conservação da espécie. Este trabalho busca sanar um pouco da lacuna de conhecimentos sobre a espécie *M. capixaba*.

Os dados estão apresentados em quatro capítulos. O primeiro capítulo discorre sobre a distribuição geográfica da espécie com base na mais ampla amostragem já realizada desde sua descoberta e faz considerações sobre o seu atual estado de conservação. O segundo capítulo trata sobre as relações filogenéticas intra e interespecíficas entre *M. capixaba*, *M. scutellaris* e espécies da apifauna amazônica. O capítulo dois também aborda a diversidade genética das populações remanescentes, apresentando possíveis genótipos a serem considerados para a formação de populações de conservação e reintrodução em áreas protegidas. O terceiro capítulo é um estudo de caso, o segundo registro de ocorrência de hibridação entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*, que verificamos a partir de sequências de DNA mitocondrial e nuclear, e traz considerações acerca das consequências da introdução de *M. scutellaris* na área de ocorrência de *M. capixaba*. O quarto capítulo trata sobre a biogeografia do gênero *Melipona* e os processos de expansão populacional e vicariância que marcaram a história evolutiva do gênero nas Américas do Sul e Central.

Histórico dos estudos com *Melipona capixaba*

Moure e Camargo (1994) descreveram a espécie *M. capixaba* relacionando-a com grupos da apifauna amazônica e, mais particularmente à espécie *M. scutellaris* do nordeste brasileiro. Gabriel A. Rodrigues de Melo, atualmente professor da Universidade Federal do Paraná, foi o primeiro a coletar informações sobre esta abelha em 1992, sendo considerado seu descobridor. Suas observações foram publicadas em Melo (1996) onde o autor descreve a arquitetura dos ninhos, registra o primeiro caso de associação entre Milichiidae (Diptera) e abelhas sem ferrão, faz considerações acerca da distribuição geográfica da espécie e relata as primeiras informações sobre criação da abelha por meliponicultores locais. Como o próprio autor destaca a distribuição restrita às adjacências de Aracê (Pedra Azul), Domingos Martins precisavam ser confirmadas por coletadas adicionais, uma vez que o autor trabalhou com 17 colônias todas da mesma região (Melo, 1996).

Entre os anos de 1994 e 1996, Vania Alves do Nascimento, atualmente professora da Fundação Educacional de Ituiutaba/Universidade do Estado de Minas Gerais, realizou seu trabalho de Mestrado sob orientação do professor Warnick E. Kerr. Foram estudados aspectos biológicos, ecológicos e genéticos da *M. capixaba* iniciando um programa de ampliação do número de colônias da espécie ensinando aos criadores da região de Domingos Martins métodos de divisão de colônias.

Nascimento (1996) verificou que a espécie *M. capixaba* também ocorria nos municípios de Conceição do Castelo, Venda Nova do Imigrante e Afonso Cláudio, além de Domingos Martins. A autora sugeriu a ocorrência entre 700 e 1000 metros de altitude, não ficando claro se tais dados foram obtidos a partir de amostras de colônias naturais ou de colônias manipuladas em meliponários. A autora ainda relatou o primeiro caso de hibridação entre as abelhas *M. capixaba* e *M. scutellaris* (Nascimento *et al.* 2000).

Das 53 colônias formadas por divisão por Nascimento (1996) 26 colônias não sobreviveram, sendo que destas, 38,46% morreram por incapacidade de formar rainha após a divisão, 19,23% por troca natural de rainha, 11,54% morreram por ataque de forídeos, 7,69% por ataques de formigas, 7,69% por

saque, e 15,39% morreram por causas desconhecidas (Nascimento, 1996). O programa de multiplicação de colônias iniciado pela equipe do prof. Kerr foi encerrado com a conclusão do mestrado da professora Vânia e, como verificado em minhas expedições de coleta em 2007, outras colônias não sobreviveram por falta de orientação técnica e cuidados adequados e apenas um criador do município de Venda Nova do Imigrante multiplica suas colônias com considerável sucesso.

Em maio de 2003, o Ministério do Meio Ambiente, através da Lista de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (Instrução Normativa nº 3, de 27 de maio de 2003) considerou a espécie *M. capixaba* como ameaçada de extinção. O Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção traz informações acerca das principais ameaças e estratégias de conservação recomendadas no caso da *M. capixaba* (Silveira *et al.*, 2008).

A partir de 2007, eu e o técnico Iris Stanciola da Universidade Federal de Viçosa iniciamos o trabalho de coleta e pesquisa na área de ocorrência da espécie, em colaboração com a professora Tânia M. Fernandes Salomão em seu projeto "Subsídios biológicos e moleculares para a preservação de *Melipona capixaba* (Hymenoptera: Apidae)". Durante os anos de 2007 a 2009 realizei cinco expedições de coleta de 10 a 12 dias de duração cada uma, para coletarmos informações acerca da *M. capixaba*, seus criadores e obter amostras para análises de pólen, do mel e de DNA. As amostras obtidas foram utilizadas nos trabalhos de três dissertações de mestrado e dois trabalhos de iniciação científica que estimaram a variabilidade genética da espécie por meio de marcadores moleculares ISSR, RFLP, Microssatélites e sequenciamento de DNA, além de análises de pólen e mel.

Em 2008, sob a orientação do professor Lucio A. O. Campos, iniciei o doutoramento com a proposta de estudar a genética e a evolução da espécie *M. capixaba*, visando a sua conservação. Dois artigos foram publicados nesse período como resultados de nossas primeiras coletas.

No primeiro (Resende *et al.* 2008) relatamos o primeiro registro da visitação de orquídeas pela abelha *M. capixaba*. Orquídeas são comumente visitadas por abelhas da tribo Euglossini, mas também são visitadas por

diferentes abelhas da tribo Meliponini (por exemplo Roubik, 2000; Singer 2002). Este novo registro apresenta um interessante caso a ser investigado devido à rica flora de orquídeas presente na Mata Atlântica, muitas delas endêmicas e também ameaçadas de extinção. A Lista de Espécies Ameaçadas de Extinção no Espírito Santo (Espírito Santo, Decreto nº1.499, 14 de junho de 2005) cita 205 espécie de Orquidaceae ameaçadas, oito destas representantes do gênero *Maxillaria* e duas do gênero *Xylobium*. Tais gêneros foram identificados como possíveis flores visitadas por *M. capixaba* em nosso trabalho (Resende *et al.* 2008).

No segundo artigo (Luz *et al.* 2011) as coletas de pólen em colmeias de *M. capixaba* permitiram à professor Cynthia F. P. da Luz, do Instituto de Botânica de São Paulo, identificar 33 tipos polínicos utilizados como fonte de alimento para *M. capixaba* sendo reconhecidos 23 gêneros de 15 famílias de plantas visitadas. Esse trabalho representa um importante passo para futuros programas de preservação, oferecendo uma lista de espécies a serem utilizadas em casos de reflorestamento e enriquecimento da flora apícola para *M. capixaba*.

Outros dois artigos sobre a variabilidade genética e sobre análises físico-químicas do mel de *M. capixaba* estão em vias de publicação. Novas publicações devem ser apresentadas em breve por Bruna D. V. Serra. Durante seu doutoramento em Entomologia pela Universidade Federal de Viçosa sob orientação do Prof. Lucio A. O. Campos, Bruna residiu nos últimos anos de sua tese na região de ocorrência da *M. capixaba* e desenvolveu seu trabalho sobre a biologia e o manejo da espécie.

Contribuições e perspectivas

Com o presente trabalho pretende-se estimar a área de distribuição geográfica de ocorrência das populações remanescentes da espécie ameaçada *M. capixaba*, elaborar hipóteses sobre a história evolutiva das espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* que possam explicar o atual padrão de distribuição geográfica e diversidade genética destas abelhas e apresentar hipótese sobre a história biogeográfica do gênero *Melipona*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Luz CFP, Fernandes-Salomão TM, Lage LGA, Resende HC, Tavares MG, Campos LAO. (2011) *Psyche*. doi:10.1155/2011/107303

Melo GAR (1996) Notes on the nesting biology of *Melipona capixaba* (Hymenoptera, Apidae) *J. Kansas Entomol. Soc.*, **69**(2): 207-210.

Moure JS, Camargo JMF (1994) *Melipona* (Michmelia) *capixaba*, uma nova espécie de Meliponinae (Hymenoptera, apidae) do sudestes do Brasil. *Rev. Bras. Zool.* **11**(2): 289-296.

Nascimento VA (1996) Aspectos biológicos, ecológicos e genéticos da *M.elipona* (Michmelia) *capixaba* - Moure e Camargo, 1994 (Hymenoptera, Apidae) Dissertação. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 74 p.

Nascimento VA, Matusita SH, Kerr WE (2000) Evidence of hybridization between two species of *Melipona* bees. *Gen. Mol. Biol.* **23**(1): 79-81.

Resende HC, Barros F, Campos LAO, Fernandes-Salomão TM (2008) Visitação de orquídeas por *Melipona capixaba* Moure & Camargo (Hymenoptera: Apidae), abelha ameaçada de extinção. *Neotrop. Entomol.* **37**(5):609-611.

Roubik DW (2000) Deceptive orchids with Meliponini as pollinators. *Plant. Syst. Evol.* **222**:271-279.

Silveira FA, Melo GAR, Campos LAO (2008) *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1995, in Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP, editores. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília, DF, MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas. volume 1. pp 381-382.

Singer R (2002) The pollination mechanism in *Trigonidium obtusum* Lindl (Orchidaceae: Maxillariinae): sexual mimicry and trap-flowers. *Ann. Botany* **89**:157-163.

CAPÍTULO 1. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA, MANEJO E CONSERVAÇÃO DA ABELHA SEM FERRÃO *Melipona capixaba* (Hymenoptera: Apidae)

1. RESUMO

A abelha sem ferrão *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994 é endêmica da Mata Atlântica brasileira, ocorre de forma restrita em regiões de altitude do estado do Espírito Santo, possivelmente a menor distribuição geográfica conhecida entre as abelhas sem ferrão e é considerada como ameaçada de extinção. Talvez devido à sua pequena área de ocorrência, talvez porque sua descoberta tenha se realizado há apenas duas décadas, pouco ainda se conhece a respeito da biologia da espécie, sua distribuição geográfica atual e as reais condições de sua conservação. Apresentamos aqui os resultados obtidos a partir da maior amostragem de *M. capixaba* já realizada em seu local de ocorrência natural. Elaboramos um mapa de distribuição utilizando sistema de informação geográfica. Nossos dados indicam que a espécie *M. capixaba* ocorre em municípios do estado do Espírito Santo em altitudes entre 800 e 1200 metros, com temperaturas médias anuais em torno de 18-23°C e cobertura vegetal do tipo Floresta Ombrófila Densa ou Aberta, restrita a uma área de aproximadamente 3450Km². Outras áreas similares podem ser encontradas nos limites do estado de Minas Gerais e Espírito Santo sugerindo possíveis áreas para a ocorrência natural ou para o manejo de populações de conservação da espécie. Verificamos as condições de manutenção das colônias tanto em seu habitat natural como em condições de manutenção *ex situ* e identificamos as principais ameaças e as perspectivas para a conservação da espécie. Discutimos os aspectos legais e as complicações relativas ao manejo de fauna silvestre ameaçada de extinção no Brasil e apresentamos algumas sugestões para um futuro plano de manejo da espécie.

2. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica, um dos biomas mais ameaçados do planeta, se estende ao longo da costa atlântica brasileira e também em áreas da Argentina e do Paraguai em sua porção sudeste e sul. De acordo com o Mapa da Área de Aplicação da Lei nº 11.428 de 2006 (IBGE, 2008) a extensão original da Mata Atlântica Brasileira era de 1.315.460 Km², cobrindo cerca de 15% do território nacional em 17 estados da federação. Atualmente estima-se que os remanescentes da Mata Atlântica representem menos de 8% da sua área original (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 2010). A perda de habitat tem como consequência direta a redução populacional, extinções locais, fragmentação do habitat com isolamento das populações remanescentes, tornando as espécies vulneráveis à extinção.

Com 100% de sua área dentro do Bioma Mata Atlântica, o estado do Espírito Santo é um dos espaços mais criticamente ameaçados do território brasileiro. São consideradas ameaçadas de extinção 959 espécies da fauna e flora do estado do Espírito Santo, destas, 240 espécies (66 fauna e 174 flora) estão criticamente ameaçadas (segundo classificação IUCN, 2001), 254 em perigo (38 fauna e 216 flora) e 456 vulneráveis (131 fauna e 334 flora) sendo que outras 40 já são consideradas extintas na Natureza (Espírito Santo, 2005).

É neste *hotspot* de biodiversidade que ocorre de forma endêmica a abelha sem ferrão *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994, única abelha social incluída na Lista de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (BRASIL, 2003). A espécie foi classificada na categoria Vulnerável¹ sendo consideradas como principais ameaças o intenso desmatamento em sua região de ocorrência que fragmenta e isola as populações, reduz as fontes de alimento e nidificação dificultando a sobrevivência e a reprodução das colônias em sua área de distribuição (Silveira *et al.* 2008).

¹ Categoria VULNERÁVEL - VU-B1ab(iii): táxon que enfrenta alto risco de extinção na natureza. Distribuição geográfica cuja extensão de ocorrência estimada é menor que 20.000km², severamente fragmentada ou com distribuição conhecida em não mais que dez localidades. Declínio contínuo observado, inferido ou projetado em sua área, extensão e/ou qualidade do habitat (Machado *et al.* 2008)

Melipona capixaba (Fig. 1) é uma abelha robusta de porte relativamente grande, 11mm para as operárias, de pilosidade intensa com predominância de pelos fulvo-pálidos e negros, integumento do mesonoto muito liso e brilhante, integumento do metasoma também negro e faixas pré-marginais dos tergos metassomáticos quase nulas (Moure e Camargo, 1994).



Figura 1. *Melipona (Michmelia) capixaba* Moure & Camargo (1994). a) Operárias; b) discos de cria; c) estrutura do ninho; d) uma colônia nativa de *M. capixaba* (seta indica entrada do ninho); e) uma rainha fisogástrica; f) potes de mel e pólen em corte; g) detalhe da estrutura trabalhada na entrada do ninho; h) mel extraído.

Os estudos com a abelha *M. capixaba* começaram em 1992, portanto há apenas duas décadas. Melo (1996) apresentou os resultados da primeira observação a respeito da espécie em sua área de ocorrência natural, verificando que a estrutura dos ninhos é similar a outros ninhos de abelhas do gênero *Melipona*, construídos em ocos de árvores, com entradas variando desde muito simples a estruturas muito elaboradas. O autor fez considerações sobre a biologia da espécie, sua distribuição geográfica e registrou como prática comum a criação da abelha na região.

A espécie é popularmente conhecida como "uruçu-negra" ou "uruçu-preta". Às vezes é também conhecida por "pé-de-pau", embora a entrada do ninho natural possa ocorrer a mais de dois metros de altura. Tal nome também é utilizado na região para designar a espécie *M. bicolor*. *M. capixaba* também é popularmente chamada de "uruçu-das-terras-frias", nome dado nas regiões mais baixas do estado do Espírito Santo, em referência à sua ocorrência nas terras frias, mais altas. Outro nome comum é "uruçu-capixaba" em referência ao seu endemismo. Ouvimos pela primeira vez o nome uruçu-capixaba do senhor Luiz Fábio Feitoza Caliman, meliponicultor de Venda Nova do Imigrante(ES) e damos a ele o crédito da expressão. O nome popular até então mais utilizado é uruçu-preta. No entanto, em algumas localidades do Espírito Santo, o nome uruçu-preta também é utilizado para designar a espécie *M. quadrifasciata*. Por isso, optamos por utilizar o nome "uruçu-capixaba" com a intenção de popularizar o termo e valorizar sua regionalidade.

A distribuição geográfica da uruçu-capixaba ainda não foi bem estabelecida. Melo (1996) verificou sua distribuição restrita a uma pequena área no entorno da localidade de Aracê, município de Domingos Martins(ES), ocorrendo apenas em regiões mais altas dessa localidade (900-1000m). Silveira (2008) citou espécimes capturados no município de Santa Teresa(ES), bem como informações da possível ocorrência no município de Alegre(ES). Nascimento (1996) verificou a ocorrência de colônias de uruçu-capixaba nos municípios de Conceição do Castelo(ES), Venda Nova do Imigrante(ES) e Afonso Cláudio(ES), em regiões entre 700 e 1000 metros de altitude. Todos os registros publicados citam as regiões de altitude do Espírito Santo, em áreas no

entorno de Domingos Martins(ES), possivelmente a menor distribuição conhecida entre as abelhas sem ferrão, como já sugerido por Melo (1996).

Apresentamos aqui os resultados obtidos a partir da maior amostragem de *M. capixaba* já realizada em seu local de ocorrência natural. Nosso objetivo foi confirmar a área de distribuição geográfica atual da espécie, definir uma área estimada de ocorrência e sugerir áreas potenciais para o manejo e conservação, verificar as condições de manutenção das colônias tanto em seu habitat natural como em condições de manutenção *ex situ* (criação em meliponários), identificar as principais ameaças e as perspectivas para a conservação da espécie. Sugerimos com isso algumas ações importantes para futuras estratégias de conservação da urucu-capixaba.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas cinco expedições de coleta, com durações entre 10 a 15 dias cada expedição, entre os anos de 2007-2009. Além das expedições de coleta mantivemos contato frequente com outros pesquisadores e criadores da urucu-capixaba coletando informações sobre a ocorrência natural e manutenção da espécie. As expedições de coleta tiveram como foco as colônias naturais ou aquelas mantidas próximas às suas áreas de coleta, com incursões em matas nativas somente nos casos onde a localização da colônia era conhecida por um guia local. Além disso, levantamos as colônias mantidas em meliponários na área de ocorrência geográfica conhecida e fora dela.

Cada colônia amostrada foi catalogada e sua posição geográfica identificada por meio do sistema de posicionamento global (GPS) utilizando-se o aparelho GPS Garmim® GPSMAP 76CSX. Os dados foram importados para o software ARCGis ESRI® 9.3 onde as análises espaciais foram realizadas.

Para as análises espaciais foram utilizados *Shapefiles* disponíveis em bancos de dados de acesso livre. Foram utilizados os *shapefiles* de elevação digital do programa ASTER GDEM (METI e NASA) disponíveis em <<http://www.gdem.aster.ersdac.or.jp/>>; *shapefiles* de limites físicos dos municípios e estados da federação brasileira, disponíveis no site do IBGE <<http://www.ibge.gov.br/home/download/geociencias.shtm>>; *shapefiles* sobre a vegetação da Mata Atlântica e áreas de conservação disponíveis no site do MMA - Ministério do Meio Ambiente <<http://mapas.mma.gov.br/i3geo/datadownload.htm>>; e IBAMA - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente <<http://siscom.ibama.gov.br/shapes/>>; e os *shapefiles* de Remanescentes Florestais da Mata Atlântica disponibilizados pela Fundação SOS Mata Atlântica e INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais em <<http://mapas.sosma.org.br/dados/>>.

Para gerar o mapa de contornos utilizados na delimitação de áreas considerando as cotas altimétricas foram gerados mapas de curvas de nível a partir do *shapefile* de elevação digital ASTER GDEM, definindo os contornos pelo método de *Surface Analysis* implementada no ARCGis ESRI® 9.3.

Para gerar o mapa interpolado de temperatura foram utilizados os dados de séries históricas de 30 anos (1977-2006) obtidos de 110 estações climatológicas localizadas no estado do Espírito Santo e estados vizinhos, gentilmente cedidos por Rodrigo Bettim Bergamaschi, especialista em Geoprocessamento Aplicado ao Planejamento, membro da Coordenação de Geoprocessamento do Instituto Jones dos Santos Neves, Vitória/ES. Para a espacialização da variável temperatura foi utilizado o método de Krigagem Esférica implementado no ARCGis ESRI® 9.3, considerando as variáveis de temperaturas médias anuais na série histórica.

Os mapas de contorno, de espacialização das temperaturas e de vegetação foram comparados e as áreas com interseção dessas três variáveis foram consideradas na delimitação da área estimada de ocorrência da espécie *M. capixaba*. Para o cálculo de extensão das áreas delimitadas foram considerados os cálculos de área de polígonos irregulares implementado pela ferramenta de cálculo geométrico do ARCGis ESRI® 9.3, utilizando os sistema de coordenadas projetadas SAD 1969 UTM Zone 24S, considerando quilômetros quadrados como unidade de cálculo de área.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Distribuição Geográfica

Registramos ocorrência de 177 colônias de *M. capixaba* em 58 pontos amostrais em 12 municípios do estado do Espírito Santo (Figura 2; Tabela1 do Anexo). Em dez municípios, a espécie ocorre em matas nativas ou são mantidas em áreas próximas ao local onde foram coletadas: Afonso Cláudio, Alfredo Chaves, Brejetuba, Castelo, Conceição do Castelo, Domingos Martins, Marechal Floriano, Vargem Alta, Venda Nova do Imigrante e Santa Maria de Jetibá. Também verificamos a presença de colônias nos municípios de Divino de São Lourenço e Santa Teresa, mas nestes não obtivemos informações de ocorrência natural e as colônias observadas ali foram introduzidas, sendo sua origem o município de Venda Nova do Imigrante e Santa Maria de Jetibá, respectivamente.

No município de Divino de São Lourenço há apenas uma informação não confirmada de um antigo criador de abelhas na região que possuía colônias de uma abelha grande e negra que produzia bastante mel (João Luiz Santos, meliponicultor, comunicação pessoal). Tal informação ainda não pôde ser confirmada. No município de Santa Teresa, apesar de não termos verificado a ocorrência natural da espécie, informações de Silveira *et al.* (2008) e outros criadores relatam a sua ocorrência no município. É possível que a espécie ocorra em áreas restritas neste local e por isso a dificuldade de verificá-la.

De qualquer forma, considerando a manipulação humana, mesmo que se encontre atualmente na natureza colônias de urucu-capixaba, não será possível definir se a espécie ocorria originalmente nestes locais ou se as colônias na natureza são resultado de enxameamento e ocupação a partir das colônias que foram introduzidas pelos criadores. Consideraremos neste estudo como área de distribuição atual os locais onde a espécie ocorre naturalmente ou onde haja informações de coleta ou ocorrência de ninhos naturais.

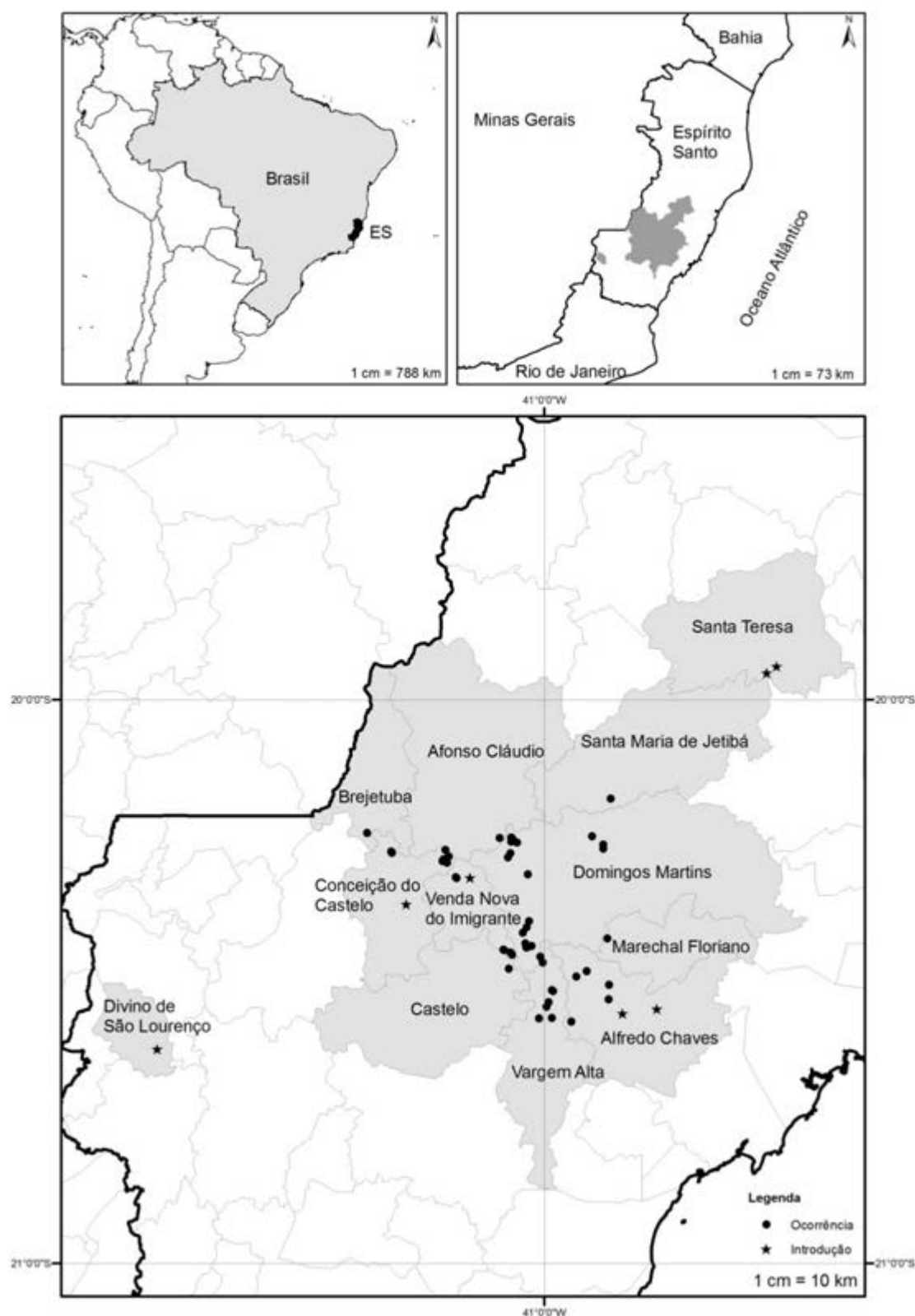


Figura 2. Mapa dos 58 locais de coleta das 177 colônias observadas em 12 municípios do estado do Espírito Santo. Os círculos representam colônias nativas ou próximas à sua área de ocorrência natural. As estrelas representam colônias introduzidas, oriundas de outras localidades.

Nas 177 colônias contabilizadas não incluímos 60 colônias obtidas por divisões realizadas pelo meliponicultor Luiz Fábio Feitoza Caliman, do município de Venda Nova do Imigrante(ES). Tal meliponicultor conta atualmente com mais de 60 colônias de uruçú capixaba manejadas em colméias racionais, resultantes da divisão de colônias (Caliman, 2008). Como relatado por ele, suas colônias originais eram três e optamos por contabilizar na amostragem geral apenas as três matrizes.

4.2. Distribuição geográfica em relação à altitude

Colônias naturais de *M. capixaba*, isto é em matas nativas, foram observadas em altitude mínima de 882 m e máxima de 1155 m (Tabela 1). Em regiões com altitudes entre 800 m e 1200 m foram observadas tanto colônias naturais como colônias manejadas. Em regiões com altitudes entre 600 m e 800 m foram observadas apenas colônias manejadas. Não há dados da ocorrência natural ou manejo de colônias em regiões acima de 1200 m e abaixo de 600 m (Figura 3).

Tabela 1 Altitudes mínimas e máximas de ocorrência da *Melipona capixaba* observadas neste estudo.

Altitudes mínimas e máximas das colônias amostradas	Altitude (m)
menor altitude entre as colônias nativas	882
maior altitude entre as colônias nativas	1155
menor altitude entre as colônias manejadas	612
maior altitude entre as colônias manejadas	1180

Melo (1996) estabelece as cotas de 900-1000 m como altitudes de ocorrência da espécie. Nascimento (1996) cita a ocorrência entre 700 e 1000 metros. No entanto, devido às características de seu estudo, é possível que a autora tenha observado apenas colônias manejadas por criadores.

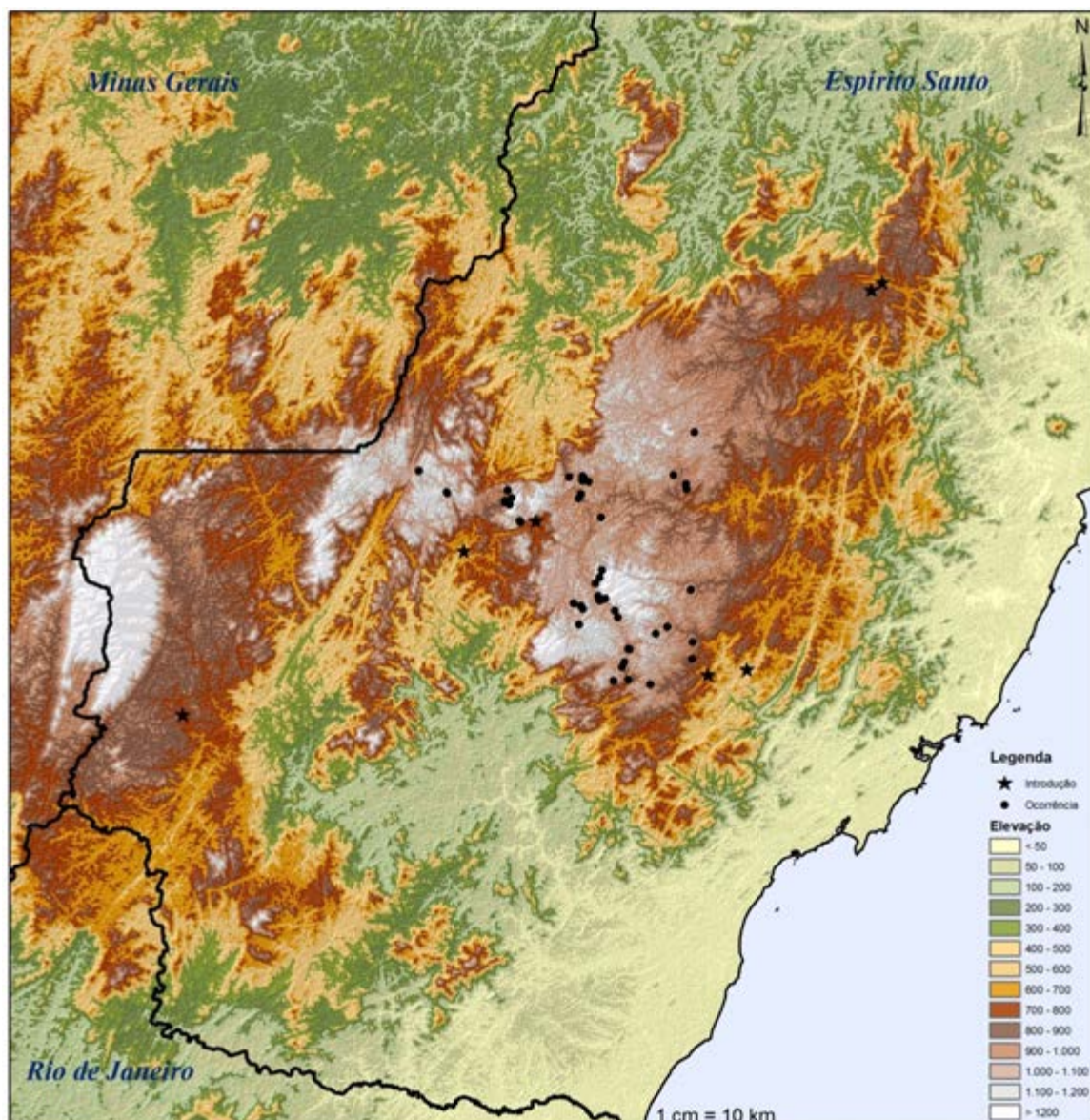


Figura 3. Mapa de elevação digital para área de ocorrência da *Melipona capixaba*, indicando os pontos de coleta e as altitudes com base no Modelo Digital de Elevação Global - GDEM do programa ASTER - *Advanced Spaceborne Thermal Emission and Reflection Radiometer* (2009). Os círculos representam colônias nativas ou próximas à sua área de ocorrência natural. As estrelas representam colônias introduzidas, oriundas de outras localidades.

Apesar de a ocorrência natural ter sido verificada apenas entre 800-1200 metros, colônias de *M. capixaba* são manejadas com relativo sucesso em altitudes entre 700-800 m em regiões com temperaturas mais amenas e próximas a matas nativas. Em pelo menos três locais verificamos a manutenção de colônias mantidas entre 600 e 700m (altitude mínima de 612m) mas nestes casos, o manejo exige cuidados especiais como suplementação alimentar com mel de *Apis* em determinadas épocas do ano.

Das 177 colônias amostradas, 146 colônias foram verificadas entre as altitudes de 800-1100m (82,48%) sendo esta a cota altimétrica em que mais comumente se encontra colônias de *M. capixaba*, tanto nativas como manejadas (Tabela 2).

Tabela 2. Número de amostras e porcentagem de colônias amostradas em cada cota altimétrica. As divisões para cada cota foram meramente didáticas e consideramos a menor e a maior altitude em que se observaram colônias de *Melipona capixaba*.

	n amostral	%
N amostral de colônias entre 612-700m	11	6.21
N amostral de colônias entre 700-800m	16	9.04
N amostral de colônias entre 800-900m	24	13.56
N amostral de colônias entre 900-1000m	65	36.72
N amostral de colônias entre 1000-1100m	57	32.20
N amostral de colônias entre 1100-1180m	4	2.26
Total de colônias amostradas	177	100

Até onde é de nosso conhecimento, colônias de *M. capixaba* não se mantêm em altitudes mais baixas que 600m, especialmente em regiões com temperaturas mais quentes, mesmo quando manejadas de forma adequada. Alguns meliponicultores nos informaram de tentativas fracassadas de manutenção de colônias nos municípios de Guarapari (ES), Marataízes(ES) e Vitória (ES), no litoral capixaba e também em áreas mais quentes do município de Santa Teresa(ES). Colônias experimentais introduzidas nos meliponários da

Universidade Federal de Uberlândia (MG) e Universidade Federal de Viçosa (MG) também não resistiram por muito tempo.

Não há relatos de ocorrência de *M. capixaba* para as regiões ao norte do município de Santa Teresa (ES), a leste de Marechal Floriano (ES), ao sul de Vargem Alta (ES) e a oeste de Brejetuba (ES). Silveira *et al.* (2008) cita uma possível ocorrência para o município de Alegre (ES), mas não foi possível verificar tal informação.

4.3. Distribuição geográfica e temperatura média anual

É fala comum entre os criadores da uruçu-capixaba que a espécie "gosta" de climas frios. Para verificar a relação entre ocorrência e temperatura, comparamos os dados de ocorrência com um mapa de distribuição espacial das temperaturas médias anuais para o estado do Espírito Santo (Figura 4).

As estações climatológicas (E.C.) localizadas nas áreas onde mais comumente se observou colônias de uruçu capixaba registraram temperaturas médias anuais (Tma) abaixo de 19°C na série histórica de 30 anos (1977-2006). Na localidade de Aracê, Domingos Martins, a E.C. de Aracê (1075 m de altitude) registrou Tma de 18,2°C e a E.C. Centro Serrano (950m) registrou Tma de 18,8°C. Considerando os limites observados para a ocorrência e/ou manutenção de colônias da uruçu capixaba, a E.C. de Santa Teresa (648m) registrou Tma de 20,5°C, a E.C. de Matilde, Alfredo Chaves (515m) Tma de 21,9°C e a E.C. de Conceição do Castelo (600m) Tma de 21,7°C para a série histórica.

Não observamos nem a ocorrência nem o manejo de colônias de uruçu capixaba em regiões do Espírito Santo onde a temperatura média anual na série histórica foi maior que 23°C. Sendo assim, parece-nos que regiões cujas temperaturas médias anuais ultrapassem os 23°C não são regiões propícias para a ocorrência e ou o manejo da espécie. Mesmo em regiões com altitude entre 800m e 1200m de altitude, mas com Tma maiores que 20°C-21°C a ocorrência de uruçu capixaba não foi verificada ou é restrita, sendo mais comum verificar a ocorrência em regiões com temperaturas mais amenas entre 18°C e 20°C.

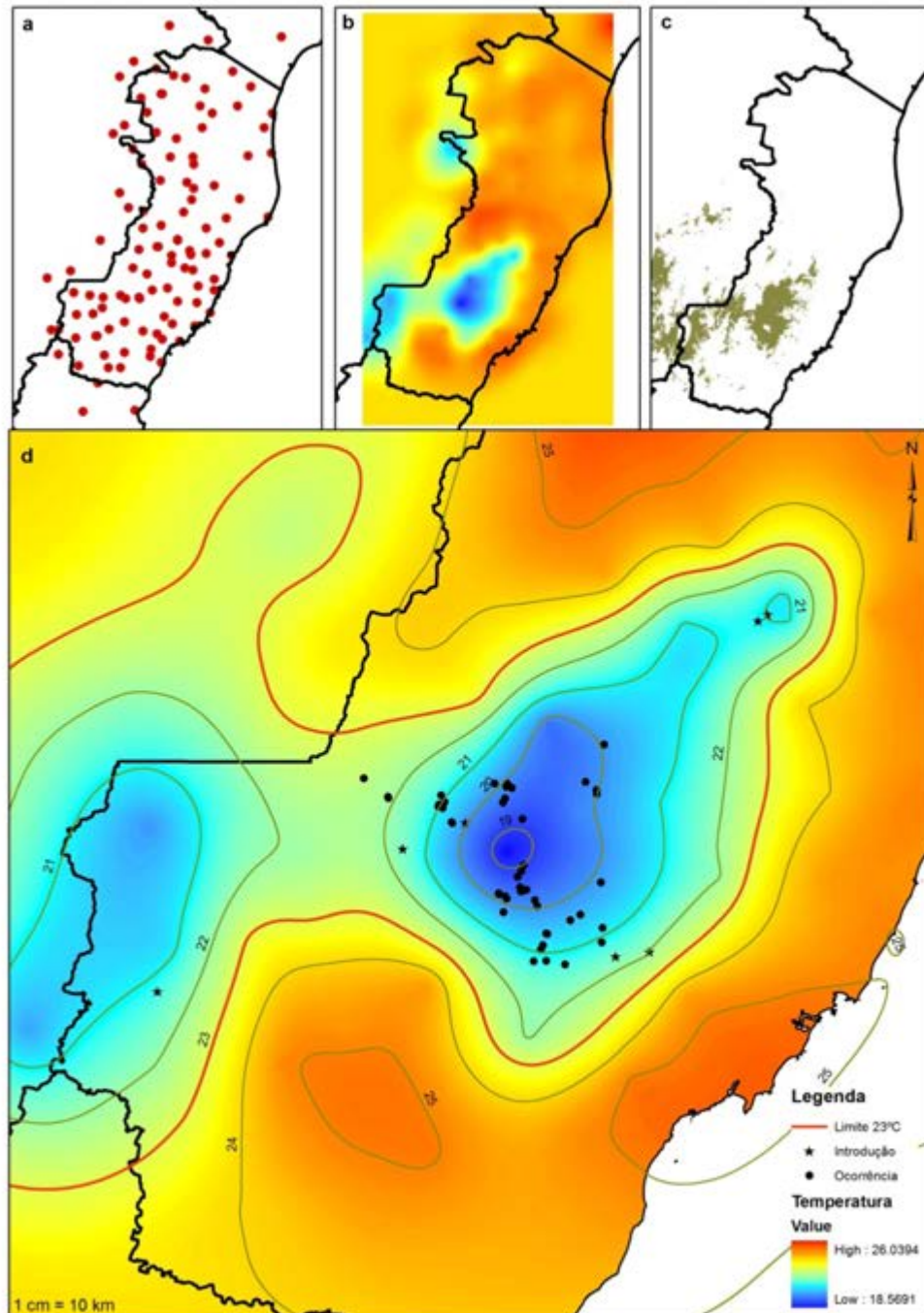


Figura 4. Mapa de espacialização das temperaturas médias anuais (T_{ma}) para o estado do Espírito Santo com base em séries históricas de 30 anos (1977-2006) obtidas de 110 estações climatológicas localizadas no Espírito Santo e estados vizinhos (a) Distribuição espacial das estações climatológicas; (b) T_{ma} para todo o estado; (c) Áreas com altitudes entre 800 e 1200m; (d) T_{ma} para a área de ocorrência da espécie *Melipona capixaba* considerando como limite de distribuição e manejo T_{ma} entre 18 e 23°C para a média da série histórica (linha vermelha).

4.4. Distribuição geográfica e vegetação

Segundo o Mapa da Área de Aplicação da Lei nº 11.428 de 2006 (Lei da Mata Atlântica - IBGE 2008) a vegetação local para as áreas onde se amostrou *M. capixaba* é quase que exclusivamente do tipo Floresta Ombrófila Densa, com alguma ocorrência de Floresta Ombrófila Aberta (Figura 5).

O termo Ombrófila, de origem grega, significa "amigo das chuvas" e foi utilizado na classificação de formações vegetais proposta por Ellemberg & Mueller-Dombois (1965/66 *apud* IBGE, 1992). A formação Floresta Ombrófila Densa é caracterizada por macro e mesofanerófitos, além de lianas lenhosas e epífitos em abundância, com temperaturas elevadas (médias de 25°C) e de alta precipitação bem distribuída ao longo do ano, com poucos meses de seca (IBGE, 1992). As condições de temperatura variam conforme a altitude. Nas áreas onde se observa a presença de *M. capixaba* a Floresta Ombrófila Densa pode ser classificada como Floresta Ombrófila Densa Montana. A formação Montana situa-se nos altos dos planaltos e/ou serras de 500 até 1500m, entre 16° Lat. S e 24° Lat. S (IBGE, 1992).

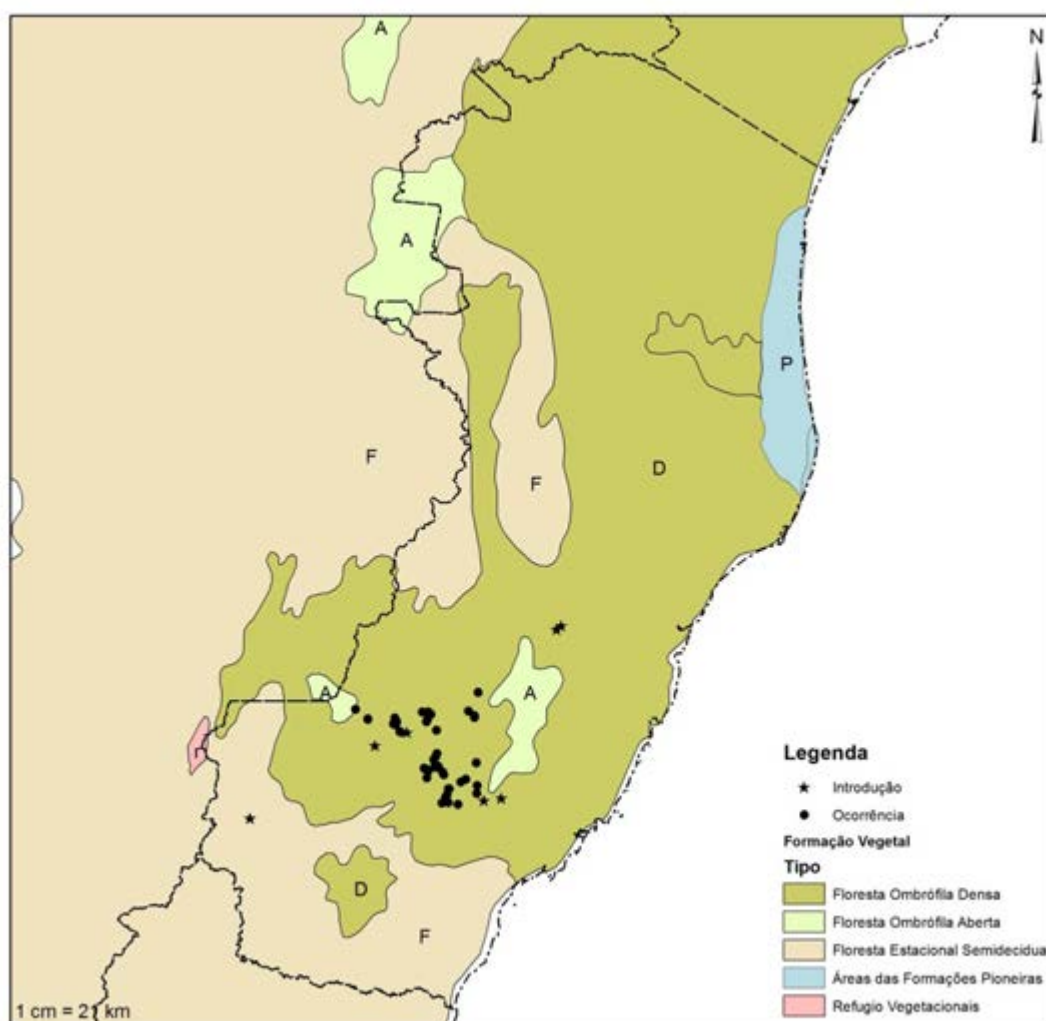


Figura 5. Mapa de cobertura vegetal do estado do Espírito Santo, considerando as formações florestais originais conforme o Mapa da Área de Aplicação da Lei nº 11.428 de 2006 (Lei da Mata Atlântica, IBGE 2008). Legenda (conforme IBGE 2008): D - Floresta Ombrófila Densa (Floresta Tropical Pluvial); A - Floresta Ombrófila Aberta (Faciações da Floresta Ombrófila Densa); F - Floresta Estacional Semidecidual (Floresta Tropical Subcaducifólia); P - Áreas das Formações Pioneiras (Sistema Edáfico de Primeira Ocupação); r - Refúgios Vegetacionais (Comunidades Relictuais).

4.5. Área Estimada de Ocorrência da *Melipona capixaba*

Comparando os pontos onde foi possível verificar a presença de *M. capixaba* com os mapas de elevação, de espacialização das temperaturas médias anuais e de vegetação, é possível delimitar uma Área Estimada de Ocorrência Natural da *M. capixaba*. Tal área compreende regiões com altitudes entre 800-1200 m de altitude, cujas temperaturas médias anuais estejam em torno de 18°C-23°C, com cobertura vegetal do tipo Floresta Ombrófila Densa Montana ou Floresta Ombrófila Aberta Montana (Figura 6).

As regiões com essas características se restringem a uma área calculada em 3.453 Km², com maior número de colônias amostradas na localidade de Aracê, Domingos Martins (ES) e limitando-se a oeste pelos municípios de Ibatiba (ES), Lajinha (MG) e Mutum (MG), a nordeste Santa Teresa (ES) e Santa Leopoldina (ES) e ao sul o município de Vargem Alta (ES) (Figura 6). A ocorrência de *M. capixaba* ao leste de Brejetuba (ES) não foi verificada em nossa amostragem, mas novas expedições de coleta podem incluir as áreas dos municípios de Lajinha/MG, Mutum/MG e Ibatiba/ES como áreas potenciais para a ocorrência e manutenção da espécie.

Outra área com potencial para a ocorrência/manutenção da urucu capixaba pode ser sugerida para o entorno da região do Parque Nacional do Caparaó, área calculada em 1.328 Km², especialmente nos limites do estado do Espírito Santo (Figura 6). Não há registros de ocorrência natural de *M. capixaba* na região do Caparaó e, por isso, tal área não foi considerada dentro da área estimada de ocorrência. Apesar da vegetação nesta região ser classificada como Floresta Estacional Semidecidual conforme IBGE (2008), a região do Parque Nacional do Caparaó, especialmente nos seus limites capixabas, possui vegetação bastante parecida com Florestas Ombrófilas de outras regiões de altitude. A proximidade com a área de distribuição e as características locais sugerem uma possível ocorrência natural ou, pelo menos, áreas potenciais para o manejo da espécie. Há pelo menos um registro de criação da urucu capixaba nessa região, no município de Divino de São Lourenço/ES, sendo sete colônias atualmente, oriundas de Venda Nova do Imigrante/ES.

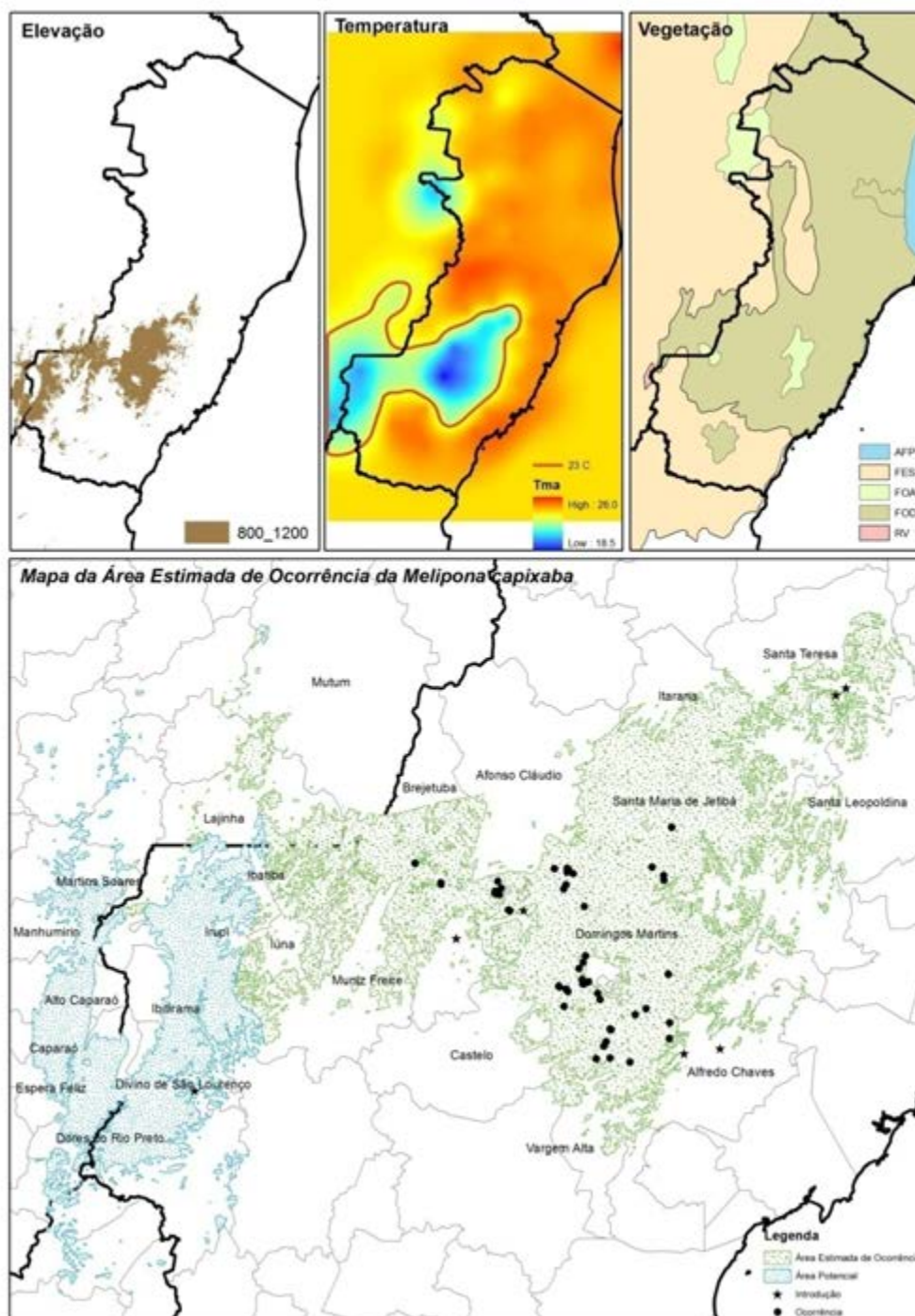


Figura 6. Área Estimada de Ocorrência da *Melipona capixaba* considerando como propícias para a ocorrência natural e ou a manutenção de colônias as áreas com elevações entre 800m e 1200m de altitude, temperatura médias anuais entre 18°C e 23°C e cobertura vegetal do tipo Floresta Ombrófila Densa e Floresta Ombrófila Aberta (área verde). A área azul, na qual não se conhece colônias naturais, foi considerada como área potencial para ocorrência ou manutenção da espécie.

4.6. Distribuição geográfica e condições climáticas

Segundo a classificação climática de Köppen-Geiger, com mapa atualizado por Peel *et al.* (2007) o clima predominante na área estimada para a ocorrência de *M. capixaba* é do tipo Clima Tropical Monção, classe "Am". Segundo tal classificação, regiões com climas tropicais caracterizam-se por temperatura média do mês mais frio do ano maior ou igual a 18°C, ausência de estações com baixas temperaturas (estações invernosas) e precipitação anual superior à evapotranspiração potencial anual, com elevadas taxas de precipitação anual e precipitação do mês mais seco não maior que 60 mm (Peel *et al.* 2007)

Segundo a classificação climática do Mapa de Climas do Brasil o clima predominante na área estimada para a ocorrência de *M. capixaba* é do tipo Clima Tropical, em parte Mesotérmico Brando (média de temperatura entre 10°C e 15°C) em parte Subquente (média entre 15°C e 18°C em pelo menos um mês) podendo também serem classificados como Úmido (um a três meses secos) e Semiúmido (quatro a cinco meses seco) (IBGE 2002).

As precipitações observadas na série histórica de 30 anos para a região de ocorrência estimada estão acima de 1200 mm anuais, maiores que a evapotranspiração, caracterizando assim um ambiente úmido. A Estação Climatológica (E. C.) de Aracê, Domingos Martins (ES) registrou precipitação média de 1.361,94 mm para a série histórica, com evapotranspiração real (ETR) de 810,56 mm em média para o mesmo período. A E.C. Centro Cerrado, Domingos Martins, registrou precipitação média de 1.380,94 mm e ETR de 838,86 mm de média para o mesmo período.

4.7. Considerações acerca do endemismo da espécie

As relações entre o relevo, a vegetação e as condições climáticas regionais podem ser fatores adaptativos relevantes para explicar o endemismo de *M. capixaba* e sua restrita área de ocorrência. Regiões próximas onde não há ocorrência registrada para a espécie possuem áreas com elevadas altitudes, mas com regimes climáticos e vegetações diferentes, como é o caso das regiões de altitudes do estado de Minas Gerais dominadas por climas mais

quentes e mais secos, ou regiões do Espírito Santo e Rio de Janeiro com elevações mais baixas e climas mais quentes e úmidos.

Também é preciso considerar a história evolutiva da espécie e as mudanças ocorridas ao longo do seu processo evolutivo como fatores determinantes de endemismo. Condições climáticas e formações vegetais sofrem mudanças regionais ao longo do processo de especiação com consequências na adaptação do táxon.

Por outro lado, faz-se necessário considerar que a restrita distribuição geográfica observada atualmente possa ser resquícios de uma distribuição mais ampla no passado e que se tornou reduzida devido a processos de extinção local, especialmente com o elevado índice de desflorestamento da Mata Atlântica.

4.8. Status de conservação

Considerando apenas a área de aproximadamente 3.453 Km² em que estimamos a ocorrência natural e onde se verificou a presença de colônias naturais de *M. capixaba* é possível reafirmar o que já foi destacado por Melo (1996) que essa possa ser a menor distribuição conhecida entre as abelhas sem ferrão. Mesmo considerando também a área adjacente de 1.328 km² no entorno do Parque Nacional do Caparaó e em localidades do estado de Minas Gerais como áreas potenciais para o manejo da espécie, a extensão da ocorrência ainda é estimada em menos de 5.000 Km².

Com isso, podemos sugerir a mudança quanto à classificação da espécie no atual status de "Vulnerável" VU-B1ab(iii) (ver nota de rodapé 1, pág 2) para a categoria de ameaça: **Em Perigo EN-B1ab(iii)** segundo os critérios adotados na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas (Fundação Biodiversitas, Machado *et al.* 2008).

São considerados na categoria "Em Perigo" - EN-B1abiii os táxons que enfrentam risco muito alto de extinção na natureza com distribuição geográfica cuja extensão de ocorrência é estimada em menos de 5.000km², severamente fragmentada e com declínio contínuo observado, inferido ou projetado em sua área, extensão e/ou qualidade do habitat (Machado *et al.* 2008). Tais condições

correspondem à situação em que se encontra a espécie *M. capixaba* atualmente, justificando a reclassificação para a categoria “Em Perigo”.

4.9. Remanescentes Florestais

Assim como para toda a extensão do bioma Mata Atlântica a área estimada de ocorrência da *M. capixaba* tem sofrido contínua perda de florestas com a ocupação humana. Desde 1985, a Fundação SOS Mata Atlântica e o INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais elaboram o Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica. Com relatórios e mapas atualmente em sua sexta edição traz informações do avanço e da contínua perda de formações vegetais originais, fornecendo dados sobre as áreas desflorestadas e os remanescentes florestais do bioma Mata Atlântica.

Conforme os dados apresentados pelo Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica (SOS Mata Atlântica e INPE, 2011), o estado do Espírito Santo tem sofrido contínuo processo de desflorestamento desde a colonização. Estima-se que dos 4.614.814 ha (100% da área do estado) originalmente cobertos pelo Bioma Mata Atlântica restem apenas 510.752 ha, ou 11,07% da cobertura original, considerando Floresta, Restinga e Mangue. A Tabela 3 mostra a evolução do desflorestamento no estado.

O desmatamento foi citado por Silveira *et al.* (2008) como a principal fonte de ameaça para *M. capixaba* em seu ambiente natural, uma vez que a espécie depende de árvores para a sua nidificação, especialmente árvores mais velhas com troncos adequados à instalação dos ninhos, além da perda de fontes de alimento (pólen e néctar). Além disso, o desflorestamento leva à fragmentação e isolamentos dos remanescentes florestais, que podem por consequência fragmentar e isolar as populações e aumentar os índices de acasalamentos aparentados (endogamia) que levarão à perda de diversidade genética aumentando a vulnerabilidade da espécie.

Tabela 3. Estimativa das perdas de formações florestais no estado do Espírito Santo (SOS Mata Atlântica e INPE, 1998)

Ano	Área (ha)	% Remanescentes Florestais ¹
1912 ²	2.994.200	65,03
1958 ³	1.367.910	29,71
1980 ³	627.025	13,62
2005 ^{4*}	476.173	10,32 ^{**}
2010 ^{5***}	478.088	10,36 ^{**}

*Área avaliada no estado equivalente a 100% (0% de cobertura de nuvens)

**Em relação à área do Bioma Mata Atlântica avaliada do estado, considerando o período de análise. A área avaliada pode sofrer interferência com a presença de nuvens nas imagens de satélite.

*** Área avaliada no estado equivalente a 89% (11% de cobertura de nuvens)

Considerando apenas as formações do tipo Floresta e desconsiderando as formações do tipo Restinga e Mangue.

² Campos, Gonzaga de - Mapa Florestal, *apud* SOS Mata Atlântica e INPE (1998)

³ IBAMA, 1990, *apud* SOS Mata Atlântica e INPE (1998)

⁴ SOS Mata Atlântica e INPE (2009)

⁵ SOS Mata Atlântica e INPE (2011)

Comparando o Mapa da Área Estimada de Ocorrência da *M. capixaba* (Figura 6) e o Mapa dos Remanescentes Florestais de Mata Atlântica (SOS Mata Atlântica e INPE, 2011) observa-se que a cobertura vegetal original encontra-se atualmente bastante fragmentada formando um mosaico de vegetação que pode isolar as populações locais (Figura 7).

Considerando a área estimada de ocorrência da *M. capixaba*, dos 3.453 Km² calculados, apenas 1.303 Km² (37,37%) correspondem a fragmentos florestais remanescentes da Mata Atlântica¹. Destes, 93, 5% correspondem a fragmentos remanescentes menores que 1 Km² (100ha).

¹ As análises espaciais consideram apenas fragmentos maiores que 3ha ou 0.03Km² na execução do Mapa dos Remanescentes Florestais da mata Atlântica (SOS Mata Atlântica e INPE, 2011)

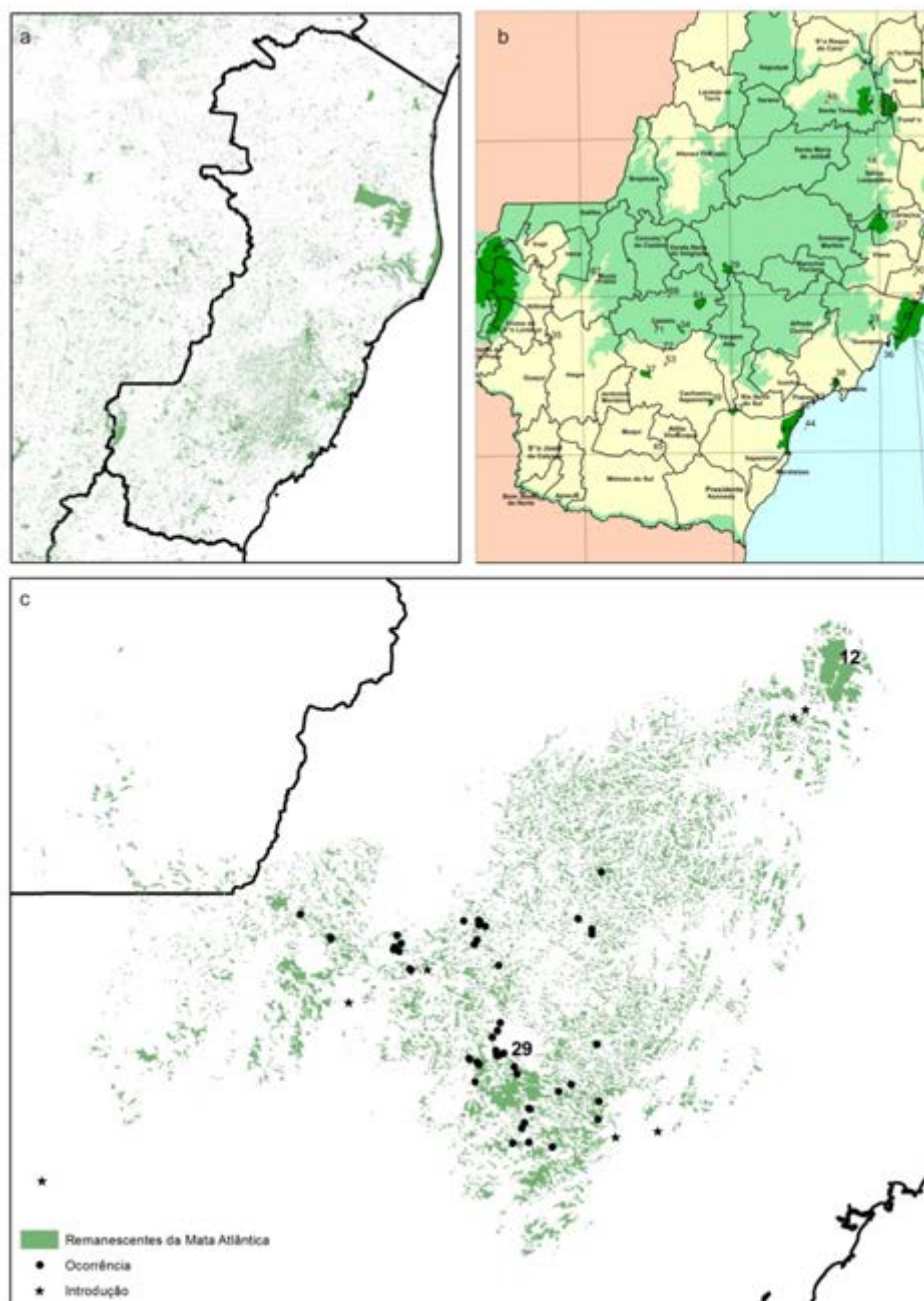


Figura 7. Mapa dos remanescentes florestais da Mata Atlântica na área estimada de ocorrência da *Melipona capixaba*. (a) Remanescentes Florestais para todo o estado do Espírito Santo (SOS mata Atlântica e INPE, 2011). (b) Recorte do Mapa das Áreas Naturais Protegidas do estado do Espírito Santo (IEMA, 2011). (c) Remanescentes florestais considerando apenas a área estimada de ocorrência da *M. capixaba*. 12, Reserva Biológica Augusto Ruschi; 29 Parque Estadual de Pedra Azul. Os números acompanham a referência das áreas consideradas no Mapa das Áreas Naturais Protegidas no estado do Espírito Santo (IEMA, 2011).

Nascimento (1996) estimou o número de alelos sexuais para a espécie *M. capixaba* em 24 alelos, sendo necessárias 1.000 colônias da urucu capixaba para se manter esse número de alelos sexuais. Ainda segundo a autora, seriam necessários para abrigar 1.000 colônias de urucu capixaba 28,26 Km² de mata. Os fragmentos na região de ocorrência possuem em média cerca de 0.35Km² (35ha) bastante abaixo portanto do que o esperado por Nascimento (1996) para a manutenção dos alelos sexuais da espécie. Apenas dois fragmentos na região estimada de ocorrência da espécie são maiores que 28 Km².

O maior fragmento, com aproximadamente 47 Km² de área (4.742 ha) corresponde à Reserva Biológica Augusto Ruschi, município de Santa Teresa (ES), localizada no extremo nordeste da área estimada de ocorrência. Nossos dados não contemplam registros de ocorrência natural nesta região sendo que as abelhas amostradas em Santa Teresa (ES) foram introduzidas por criadores que as adquiriram na região de Santa Maria de Jetibá (ES). De qualquer forma, a Reserva Biológica Augusto Ruschi é uma interessante área de estudo para a verificação da ocorrência natural ou para a manutenção de populações para a conservação da urucu-capixaba.

O segundo maior fragmento remanescente, com aproximadamente 43 Km² de área (4.301 ha) corresponde a regiões no entorno do Parque Estadual de Pedra Azul, incluindo parte deste. Nem toda a extensão do P.E. Pedra Azul foi considerada porque seus limites incluem em sua grande maioria áreas acima de 1.200m de altitude. No entanto, o entorno do Parque, na região de Aracê, Domingos Martins (ES) até o município de Vargem Alta (ES) pode ser considerada a região mais promissora para se implantar um programa de manejo e conservação da espécie visando a manutenção de populações protegidas.

Próximo à área de ocorrência estimada ainda encontramos outras áreas de conservação como o Parque Nacional do Caparaó e o Parque Estadual do Forno Grande. No entanto, essas áreas também correspondem a regiões de altitudes acima de 1.200 m, por isso, a presença de *M. capixaba* deve ser mais provável nas áreas do entorno destas reservas biológicas.

Outras áreas naturais protegidas no estado do Espírito Santo em que se pode investigar a ocorrência natural ou a possibilidade de manutenção de populações protegidas são a APA de Goiapaba-Açu e Parque Natural de Goiapaba-Açu (Santa Teresa/ES). No entanto essas áreas ficam próximas do limite da distribuição estimada e esforços de preservação podem surtir melhor efeito nas áreas ao centro da distribuição, especialmente entre as regiões de Domingos Martins, Santa Maria de Jetibá, Vargem Alta, Conceição do Castelo e Brejetuba/ES onde iniciativas para a preservação da espécie podem estabelecer populações protegidas em áreas ainda bem preservadas da Mata Atlântica dessas regiões.

4.10. Aspectos legais da criação da uruçu capixaba

A criação de abelhas sem ferrão na região de ocorrência de *M. capixaba* é bastante comum entre agricultores locais. Melo (1996) registrou tal prática em suas primeiras observações da espécie em 1992. Conversando com os criadores da uruçu-capixaba, verificamos que a prática de coleta de mel da espécie e mesmo a retirada de colônias da mata e sua manutenção em casa dos criadores é prática já de muitos anos. Um dos criadores citou que seu pai possuía colônias de uruçu-capixaba em casa há pelo menos 80 anos.

Devido ao intenso desflorestamento e a retirada de colônias de uruçu-capixaba das matas é bastante provável que a grande maioria das colônias remanescentes esteja com os criadores. Menos de 10% das colônias que observamos se encontravam na natureza, e pelo menos uma das que havíamos observado já foi retirada da mata (Figura 9).

Pela lei de crimes ambientais (Brasil, Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998) é considerado crime contra a fauna pelo texto dado em seu Artigo 29, "Matar, perseguir, caçar, apanhar, utilizar espécies da fauna silvestre, nativos ou em rota migratória, sem a devida permissão, licença ou autorização da autoridade competente, ou em desacordo com a obtida", passível de pena com detenção de seis meses a um ano, e multa.



Figura 9. Imagem exemplificando prática comum na região de ocorrência da *Melipona capixaba*: a retirada de colônias nativas da espécie para a manutenção em propriedades particulares. Na imagem (a) a seta indica a entrada do ninho, em (b) a seta indica a árvore que foi cortada para a retirada do ninho.

Pelo que verificamos nenhum dos criadores de abelhas na região de ocorrência de *M. capixaba* tem permissão dos órgãos ambientais competentes para a criação de abelhas nativas. Com a inclusão da *M. capixaba* na lista oficial de espécies ameaçadas, qualquer desses crimes cometidos contra a espécie ainda é considerado como circunstância agravante (Lei nº 9.605, Art.15 nº II item q e Art. 40 §2º).

A criação da uruçu-capixaba é prática anterior às atuais leis de proteção da fauna silvestre. Considerando que grande parte da população remanescente da *M. capixaba* encontra-se em poder de criadores, se a lei for plenamente aplicada aos criadores locais que se encontram irregulares é provável que os prejuízos para a espécie sejam irreparáveis. É preciso assim considerar uma

via legal alternativa para a criação de uruçu-capixaba em sua área de ocorrência natural de modo a contribuir para a preservação da espécie.

A RESOLUÇÃO CONAMA nº 346, de 16 de agosto de 2004 (DOU, 17 de agosto de 2004) disciplina a proteção e a utilização das abelhas silvestres nativas, bem como a implantação dos meliponários. Segundo tal resolução "Art. 3º - É permitida a utilização e o comércio de abelhas e seus produtos, procedentes dos criadouros autorizados pelo órgão ambiental competente, na forma de meliponários, bem como a captura de colônias e espécimes a eles destinados por meio da utilização de ninhos-iscos"; ficando dispensados de autorização de funcionamento os meliponários com menos de 50 colônias e que se destinem à produção artesanal de abelhas nativas em sua região geográfica de ocorrência natural.

No nosso entendimento, salvo melhor juízo, uma vez que a espécie *M. capixaba* encontra-se incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção a Resolução CONAMA nº 346 não se aplica à espécie. Portanto, sua criação não tem amparo legal, mesmo para os que possuem menos de 50 colônias, especialmente nos moldes como ocorre a captura, com cortes de árvore e retirada da colônia da natureza.

Uma alternativa seria a PORTARIA IBAMA Nº 139-N, de 29 de dezembro de 1993 que regulamenta a instalação de "Criadouros Conservacionistas" como áreas delimitadas e preparadas, dotadas de instalações capazes de possibilitar a criação racional de espécies da fauna silvestre brasileira, com assistência adequada. No entanto, como a *M. capixaba* é considerada em ameaça de extinção é preciso ponderar se tal Portaria se aplicaria à espécie.

4.11. Uso não sustentável: risco para a manutenção da espécie

O mel da abelha uruçu-capixaba é muito apreciado pelos habitantes na região geográfica de ocorrência natural o que estimula a coleta para consumo imediato e também a criação para a produção artesanal de mel, seja para consumo próprio ou para comércio. No entanto, tais práticas podem representar um sério risco para a sobrevivência da espécie.

Um senhor residente no município de Alfredo Chaves (ES) relatou-nos que era prática comum, quando ainda se encontravam muitas colônias de abelhas nas matas nativas, a coleta do mel dessas espécie. Nessas coletas, o mel de urucu-capixaba era muito apreciado e eles chegavam a abrir árvores e coletar cerca de 20 litros de mel. O mel era coletado e a colônia era abandonada aberta e à mercê da ação de predadores. Segundo informado por ele muitas colônias foram abertas dessa maneira para a extração do mel. A Figura 10 mostra uma árvore onde uma colônia de *M. capixaba* foi extraída para a coleta do mel no município de Domingos Martins (ES).



Figura 10. Uma árvore onde havia uma colônia de *Melipona capixaba*, destruída pela ação de meleiros para a coleta do mel da espécie. A árvore fica no município de Domingos Martins/ES. No mesmo fragmento florestal ainda se encontra pelo menos uma outra colônia de *M. capixaba* que observamos.

Outra prática igualmente danosa é a criação inadequada da espécie e a falta de cuidados com as colônias quando mantidas em propriedades particulares. A criação racional, em caixas racionais, não é bem aceita pelos criadores locais. Apesar do trabalho iniciado por Nascimento (1996), os criadores da uruçu-capixaba, salvo algumas poucas exceções, ainda mantêm suas colônias em cortiços, segmentos de troncos obtidos na natureza, de árvores que são cortadas e lavradas para receberem as colônias de uruçu capixaba.

Em muitos casos os cortiços são mantidos em locais inadequados (Figura 11) colocando em risco a sobrevivência da colônia. Além disso, não é incomum ouvirmos dos criadores que suas abelhas "foram embora", não reconhecendo que a colônia morreu. Um único criador de Domingos Martins (ES) nos informou que seu pai, e depois ele, chegaram a possuir mais de 30 colônias de uruçu capixaba, todas retiradas da mata, hoje restando apenas quatro.



Figura 11. Um cortiço de uruçu capixaba mantido na região de Aracê, Domingos Martins/ES, em condições precárias de conservação, colocando em risco a sobrevivência da colônia. A seta branca indica a entrada da colônia.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conservação da espécie *M. capixaba* depende de ações conjuntas e cooperativas que envolvam os diferentes órgãos ambientais responsáveis pela proteção da fauna silvestre e da biodiversidade local - IBAMA, Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e IEMA, Instituto Estadual de Meio Ambiente do Espírito Santo e Instituto Chico Mendes; órgãos que agreguem os produtores locais tal como o INCAPER - Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural; instituições de pesquisa tais como a Universidade Federal de Viçosa e Universidade Federal do Espírito Santo; organizações não governamentais de defesa da Mata Atlântica tal como a Fundação SOS Mata Atlântica; e, especialmente, as Associações de Apicultores e Meliponicultores do ES, os criadores locais e a população das áreas geográficas de ocorrência natural da espécie.

A ação conjunta entre essas partes deve levar em consideração a necessidade de amparo legal em relação às colônias que são criadas há muitos anos e ainda estão em poder dos criadores, estabelecendo criadouros (meliponários) conservacionistas. As implantações de meliponários e populações de conservação da *M. capixaba* devem ser incentivadas especialmente em áreas de preservação ambiental, com reintrodução em áreas naturais tais como os Parques e Reservas Biológicas onde a manutenção da espécie seja viável ou mesmo em Reservas Particulares, especialmente no centro da área de distribuição da espécie, nas proximidades de Pedra Azul e Aracê, Domingos Martins (ES).

6. AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível devido ao auxílio dos criadores de *Melipona capixaba* que contribuíram com amostras das colônias, informações e suporte para todo o nosso trabalho de campo. Aos criadores da urucu capixaba no Espírito Santo nosso muito obrigado. Os nossos agradecimentos ao Sr. Iris Stanciola, técnico da Universidade Federal de Viçosa, por seu apoio em todas as expedições de coleta. À Dra. Tânia Maria Fernandes Salomão que nos passou os primeiros contatos dos criadores de abelha na região do Espírito Santo. Ao INCAPER, Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural do Espírito Santo, especialmente ao senhores Lúcio e Balbino pelo apoio e contato com os criadores. Aos senhores Luiz Fábio Feitoza Caliman, José Belon, José Valin, Jovane e Zorzal pelo apoio durante as expedições de coleta e por nos apresentar muitos dos meliponicultores a que tivemos acesso. À FUNARBE, Fundação Artur Bernardes pela gestão dos recursos financeiros, em especial à Sra. Rita de Aparecida Silva pelo apoio nesta questão. À FAPEMIG, CNPq e CAPES pela concessão de bolsas de estudo e financiamento de projetos que viabilizaram a execução deste trabalho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brasil (2003) Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção. Instrução Normativa nº 3, de 27 de maio de 2003.

Caliman LFF (2008) Está salva, geneticamente, a *Meliponca capixaba*. Mensagem Doce, 96, disponível em <<http://www.apacame.org.br/mensagem-doce/96/experiencia.htm>>, acesso em 03/05/2011.

Ellemberg H, Mueller-Dombois DA (1965/66) Key to raunkiaer plant life forms with revised subdivisions. *Ber. Beobot. Inst. ETH, Stifftg Rubel*, Zurich, 37:56-73.

Espírito Santo (2005) Lista da fauna e flora ameaçada de extinção do Espírito Santo, Decreto nº1.499, 14 de junho de 2005.

Fundação SOS Mata Atlântica, INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (2010) Atlas dos Remanescentes de Mata Atlântica - relatório técnico 2008/2010. Disponível em < <http://mapas.sosma.org.br/dados/>>, acesso em 17/02/2012.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (1992) Manual técnico da vegetação brasileira. Série Manuais Técnicos em Geociências, n1. Rio de Janeiro: 92p.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2002) Mapa de Climas do Brasil. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/download/geociencias.shtm> acesso em 17/02/2012.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2008) Mapa da Área de Aplicação da Lei nº 11.428 de 2006. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/download/geociencias.shtm> acesso em 17/02/2012.

IEMA - Instituto Estadual de Meio Ambiente/ES (2011) Mapa das Áreas Naturais Protegidas no estado do Espírito Santo, disponível em http://www.meioambiente.es.gov.br/download/MAPA_UC_ES.pdf, acesso em 04/03/2011.

Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP, editores. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília, DF, MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas. volume 1. pp 52.

Melo GAR (1996) Notes on the nesting biology of *Melipona capixaba* (Hymenoptera, Apidae). J. Kans. Entomol. Soc. 69:207-210.

Moure JS, Camargo JMF (1994) *Melipona* (Michmelia) *capixaba*, uma nova espécie de Meliponinae (Hymenoptera, apidae) do sudestes do Brasil. Rev. Bras. Zool. 11 (2): 289-296.

Nascimento VA (1996) Aspectos biológicos, ecológicos e genéticos da *M.elipona* (*Michmelia*) *capixaba* - Moure e Camargo, 1994 (Hymenoptera, Apidae) Dissertação. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 74 p.

Peel MC, Finlayson BL, McMahon TA (2007) Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci.*, 11, 1633–1644.

Silveira FA, Melo GAR, Campos LAO (2008) *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1995, in Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP, editores. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília, DF, MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas. volume 1. pp 381-382.

CAPÍTULO 2. FILOGEOGRAFIA DAS ABELHAS SEM FERRÃO *Melipona capixaba* e *Melipona scutellaris*: CONSERVAÇÃO DE POPULAÇÕES AMEAÇADAS.

1. RESUMO

Melipona (Michmelia) capixaba Moure & Camargo, 1994, a uruçú capixaba, é a única espécie de abelha social atualmente incluída na Lista Vermelha das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção - IBAMA, 2003/2008. *Melipona (Michmelia) scutellaris* Latreille, 1811, a uruçú nordestina, tem sido considerada como presumivelmente ameaçada de extinção devido à redução de sua área de ocorrência natural. Neste capítulo, estudamos a filogeografia e a diversidade genética dessas abelhas com base em sequências nucleotídicas parciais dos genes mitocondrial CO1 e nuclear EF1 α e Pol2. Nossos resultados mostram uma relação próxima entre as duas espécies, posicionando-se como espécies irmãs na árvore filogenética. Nossa filogenia baseada em relógio molecular calibrado com datação fóssil permitiu a elaboração de uma hipótese evolutiva de expansão populacional e vicariância para o grupo. Três momentos distintos compõem a hipótese: **(i)** evento de expansão durante o Mioceno em áreas com extensas florestas úmidas permitiu a ocupação de diferentes áreas da América do Sul pelas linhagens ancestrais; **(ii)** evento de vicariância do Plioceno (~5 Maa) isolou a Mata Atlântica das outras formações florestais, restringindo nesse ambiente a linhagem ancestral das espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*, **(iii)** eventos de vicariância durante o Pleistoceno isolaram as linhagens ancestrais que divergiram nos atuais grupos de *M. scutellaris* (~650 mil a 1,2 Maa) e a na especiação de *M. capixaba* (~1,2 Maa).

2. INTRODUÇÃO

Melipona (Michmelia) capixaba Moure & Camargo, 1994, popularmente conhecida como uruçu-preta ou uruçu capixaba, foi incluída como “espécie vulnerável” na Lista de Espécies Ameaçadas de Extinção editada pelo IBAMA em 2003. Com uma das menores áreas de distribuição conhecida entre as abelhas sem ferrão, nossos dados indicam a sua ocorrência restrita a uma área estimada menor que 5.000 Km² no estado do Espírito Santo, em áreas de Mata Atlântica - Floresta Ombrófila Densa tipo Montana, entre altitudes de 800 e 1200 metros (veja Capítulo 1).

Melipona (Michmelia) scutellaris Latreille, 1811, popularmente conhecida como uruçu-verdadeira ou uruçu-do-nordeste, originalmente distribuía-se desde a Amazônia até o estado da Bahia (Mariano Filho, 1911 *apud* Carvalho, 2000). Atualmente, considera-se que a espécie ocorra entre os estados da Bahia até o Rio Grande do Norte o que fez com que a espécie fosse considerada como presumivelmente ameaçada de extinção (Kerr, 2002).

A Floresta Atlântica brasileira, área de ocorrência natural das duas espécies, têm sofrido intenso e contínuo processo de desflorestamento e perda de habitats naturais. Considerado o bioma mais ameaçado do Brasil, estima-se que restam apenas 7,9% de remanescentes florestais acima de 100 hectares (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 2010). Com isso as populações remanescentes das espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* sofrem redução no tamanho populacional com perda de variabilidade genética, fragmentação e isolamento das populações remanescentes, aumentando a endogamia e os riscos de extinção.

A Genética da Conservação é um campo de estudo que busca aplicar as técnicas da genética para reduzir o risco de extinção das espécies ameaçadas. Foca nas consequências que surgem da redução populacional onde fatores estocásticos e os efeitos da endogamia são extremamente importantes. Visa assim preservar as espécies como entidades dinâmicas capazes de se adaptarem às mudanças ambientais (Frankham *et al.*, 2008)

A manutenção da diversidade genética é um dos principais focos da biologia da conservação fornecendo potencial evolutivo e adaptativo às espécies. Por isso, é de fundamental importância conhecer a sua composição genética e como esta se encontra estruturada, para orientar as ações de conservação e manejo (Galetti Jr. *et al.*, 2008).

As abelhas *M. capixaba* e *M. scutellaris* oferecem interessante perspectiva para estudos comparativos quanto à diversidade genética, estrutura genética das populações e distribuição geográfica das variantes genéticas. As espécies são próximas filogeneticamente e ocorrem de forma nativa na Mata Atlântica ao longo da costa atlântica brasileira de forma alopátrica. Enquanto *M. capixaba* tem uma das menores distribuições geográficas conhecidas e é considerada como ameaçada de extinção devido à sua redução populacional, *M. scutellaris* é mais amplamente distribuída e parece ter uma população ainda relativamente grande devido à prática bem estabelecida e difundida de sua criação.

Além disso, as duas espécies são criadas em suas áreas geográficas de ocorrência natural e boa parte da população remanescente de ambas as espécies está nas mãos de meliponicultores. Estas colônias podem representar importante fonte de recurso genético em programas de manejo, aumentando a variabilidade em locais onde a diversidade foi reduzida devido à redução populacional ou para a reintrodução em áreas onde tenha havido extinções locais.

Outro importante foco da Genética da Conservação é a possibilidade de resolução de incertezas taxonômicas a partir do uso de marcadores moleculares em grupos de difícil distinção morfológica, normalmente denominadas espécies crípticas. Isso porque espécies aparentemente com baixo risco de extinção e amplamente distribuídas podem na realidade representar mais de uma espécie ou um complexo de espécies distintas (Frankhan *et al.* 2008). Esse pode ser o caso de *M. scutellaris*.

Observações da Profa. Ana Maria Waldschmidt (Universidade Estadual do Sul da Bahia) e também do Prof. Gabriel A. R. Melo (Universidade Federal do Paraná) sugerem que pelo menos as populações de altitude da espécie *M.*

scutellaris localizadas nas regiões das chapadas na Bahia possam ser suficientemente diferentes das populações litorâneas para serem consideradas uma nova espécie (comunicação pessoal durante o VIII Encontro Sobre Abelhas, julho 2008, Ribeirão Preto, SP). Tais observações apontam para um possível complexo de espécies crípticas em *M. scutellaris* e, em se confirmando tal hipótese, as populações remanescentes das regiões de chapada podem ser consideradas também como ameaçadas de extinção pela sua reduzida área de ocorrência e pequeno tamanho populacional.

Moure e Camargo (1994) quando da descrição da *M. capixaba* sugeriram uma relação de espécies irmãs entre *M. capixaba* e *M. scutellaris*. A relação próxima também foi sugerida por Nascimento *et al.* (2000) devido à hibridação natural entre as espécies quando em simpatria.

Duas filogenias moleculares de abelhas sem ferrão foram recentemente publicadas. Na primeira Rasmussen & Cameron (2010) apresentaram proposta filogenética para a tribo Meliponini e, na segunda, Ramírez *et al.* (2010) para o gênero *Melipona*. Entretanto, em nenhuma delas a espécie *M. capixaba* foi amostrada. Cristiano *et al.* (2012) apresentam uma hipótese filogenética com base em sequências do gene mitocondrial CO1, onde *M. capixaba* é alocada ora como grupo irmão de *M. scutellaris* ora como grupo irmão de *M. scutellaris*, *M. ogilviei*. Entretanto, o objetivo daqueles autores foi demonstrar a ocorrência aparentemente comum de *numts* (*Nuclear mitochondrial DNA*) em diferentes espécies de *Melipona*, incluindo *M. capixaba* e *M. scutellaris*, podendo levar a interpretações errôneas da filogenia. Assim, as relações filogenéticas e a filogeografia das espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* permanecem pouco esclarecidas e tal conhecimento é importante contribuição ao entendimento dos processos e padrões que atuaram para a diversificação da Mata Atlântica.

Em recente estudo sobre a história biogeográfica da Mata Atlântica DaSilva e Pinto-da-Rocha (2011) declaram que uma das formas para se inferir a história biogeográfica da Mata Atlântica é comparar padrões repetidos de distribuição e filogenia das espécies que podem ajudar a reconstruir a história do bioma como um todo. Estes autores tratam das principais divisões biogeográficas da Mata Atlântica com relação à áreas de endemismo de

diversos grupos divididas em quatro regiões: (i) Pernambuco, (ii) Sul da Bahia, (iii) Serra do Mar e (iv) Florestas de Araucária. Tais divisões são baseadas em áreas de endemismo para anfíbios, aves, borboletas, dípteros, mamíferos, plantas lenhosas, primatas e répteis, citando os exemplos dado pelos autores, além dos Opiliões, foco do estudo em questão.

A maioria dos estudos a respeito dos processos históricos da diversificação da fauna da Mata Atlântica, especialmente no centro e norte de sua distribuição geográfica propõe que a diversificação está relacionada com os processos de vicariância e estabelecimento de populações isoladas em ambientes estáveis, remetendo ao modelo de refúgios vegetacionais durante as mudanças climáticas do Quaternário (por exemplo: Cabanne *et al.*, 2008; Lara-Ruiz *et al.*, 2008; Carnaval *et al.*, 2009).

De acordo com o modelo de refúgios (Haffer, 1969; Vanzolini & Willinas, 1970; Brown Jr. & Ab'Saber, 1979) eventos de fragmentação devido à flutuações climáticas durante o Pleistoceno causou o isolamento de populações e consequentemente favoreceu a diversificação e especiação nestes ambientes. Carnaval *et al.* (2009) apresenta evidências para um largo refúgio que existiu durante o Quaternário na região central da Bahia e outra área estável na região de Pernambuco. Para estes autores, tais refúgios foram responsáveis pela diversificação em diferentes organismos tais como lagartos, preguiças, pequenos mamíferos e sapos. Uma vez que a distribuição de *M. scutellaris* e *M. capixaba* coincide com tais áreas, é possível que tal modelo também se aplique ao processo evolutivo dessas abelhas.

No entanto, Costa (2003) estudando os padrões de diversificação de pequenos mamíferos da Mata Atlântica e ambientes associados como a Amazônia e o Cerrado, afirmam que a especiação e diversificação no Neotrópico não serão explicados por um único modelo de vicariância ou mudanças climáticas. Pelegrino *et al.* (2005), por exemplo, remete ao sistema de rios para explicar a estruturação genética de espécies de lagartos do complexo *Gymnodactylus darwini* na Mata Atlântica. Resente *et al.* (2010) sugerem que o atual padrão de estruturação genética da formiga ameaçada de extinção *Dinoponera lucida* deve ser explicado tanto por eventos recentes do

Pleistoceno como mais antigos do Plioceno. Portanto, o modelo de refúgios Quaternários sozinho não pode explicar totalmente a diversificação na Mata Atlântica.

Este estudo teve por objetivo (i) apresentar uma hipótese filogenética para as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*, (ii) inferir sobre as relações histórico evolutivas que influenciaram a atual distribuição das espécies e o seu processo de especiação, (iii) testar a hipótese de especiação críptica no grupo *M. scutellaris*, (iv) estimar a variabilidade genética destas espécies com base em sequências nucleotídicas parciais de genes mitocondriais e nucleares e como tal variabilidade se encontra estruturada. Pretende-se com isso sugerir áreas potenciais para o estabelecimento de populações conservacionistas em ambientes de proteção permanente, bem como genótipos prioritários para a composição destas populações visando a manutenção da variabilidade genética existente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

Foram avaliadas um total de 147 colônias sendo 44 colônias da espécie *M. capixaba* e 103 colônias da espécie *M. scutellaris*, amostradas ao longo de toda a área de ocorrência geográfica conhecida das duas espécies (Tabelas 2 e 3 do Anexo). Cada colônia foi registrada segundo a localização geográfica, identificada por meio do sistema de posicionamento global (GPS) utilizando-se o aparelho GPS Garmim® GPSMAP 76CSX. Os dados foram importados para o software ARCGis ESRI® 9.3 onde as análises espaciais foram realizadas. Para as colônias onde não foi possível a exata marcação do ponto de georeferência, utilizaram-se as localizações geográficas dos municípios como estimativas aproximadas. Também foram utilizadas sequências disponíveis no GeneBank para as espécies de *Melipona* e outros Apidae para o enraizamento da árvore e datação molecular (Tabela 4 do Anexo)

Para as análises moleculares o DNA total de uma operária de cada colônia foi extraído segundo protocolo descrito por Fernandes-Salomão *et al.* (2005) e utilizados para as reações de PCR. As soluções de reação continham um volume total de 50µL, sendo as concentrações finais de 50ng de DNA total, 1X de tampão de reação, 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM da mistura de dNTPs, 0,15mM de cada primer e 1u de Platinum® *Taq* Polimerase, *Invitrogen*™. Os tubos contendo a reação de amplificação foram incubados em termociclador a 94°C por 2min para completa desnaturação das fitas, seguidos de 35 ciclos de amplificações PCR, cada ciclo com passo de desnaturação a 94°C por 45s, passo de anelamento do primer a 51°C por 1min, passo de extensão das fitas a 72°C por 1min 30s, e passo final de extensão a 72°C por 5min.

3.2. Análises moleculares

Para amplificação do fragmento correspondente ao gene citocromo oxidase I (CO1) foram utilizados os primers CO1 *forward* 5'- ATAATTTTTTTT ATAGTTATAC-3' e *reverse* 5'- GGAAAAAAGTTATATTAACWC-3' (Ramírez *et al.* 2010). Também foram sintetizados os primers LCOdeg: 5'- TATC WACHAATCATAAAAATMTTGG -3' e HC0deg: 5'- TAAACTTCWGGAT

GWCCAAAAAATCA -3', modificados dos primers universais LCO1490 e HC02198 propostos por Folmer *et al.* (1994). Para a amplificação dos fragmentos correspondentes ao gene nuclear EF1 α foram utilizados os *primers* EF1- α (long) *forward* 5'-GGGYAAAGGWCCTTC AARTATGC-3' e *reverse* 5'-AATCAGCACCTTTAGGTGG-3' e para o gene referente a RNA Polimerase II (POL2) os *primers* Pol-II *forward* 5'-AAYAAR CCVGTATGGGTATTGTRCA-3' e *reverse* 5'-AGRTANGARTTCTCRACGAA TCCTCT-3' (Ramírez *et al.* 2010). Os produtos da amplificação via PCR foram purificados e diretamente sequenciados em sequenciadores automáticos pela empresa MacroGen Inc. Coréia do Sul.

Os cromatogramas resultantes das reações de sequenciamento foram avaliados e as sequências consenso foram obtidas utilizando os programas phredPhrap e Consed (Ewing *et al.*, 1998; Ewing & Green, 1998). Todas as sequências consenso foram visualmente inspecionadas e, quando necessário, editadas. Os alinhamentos da sequências foram obtidos com o auxílio do programa ClustalW (Higgins *et al.*, 1994) implementados no MEGA versão 5 (Tamura *et al.* 2011).

Cristiano *et al.* (2012) demonstraram a existência de *numts* trabalhando com o gene CO1 tanto em *M. capixaba* como em *M. scutellaris*. Uma vez que trabalhamos com essa mesma região gênica tanto em *M. capixaba* como em *M. scutellaris*, avaliamos todas as sequências CO1 obtidas, conforme sugerido por aqueles autores. Para reduzir a possibilidade de ocorrência de *numts* em nosso conjunto de dados finais, as sequências foram obtidas por sequenciamento direto do produto PCR, a partir de quatro reações de sequenciamento diferentes (R e F para cada conjunto de primers CO1). Todas as sequências foram traduzidas para a sequência de aminoácidos e a presença de códons de parada no frame de leitura foi verificada. Qualquer sequência detectada como possível *numt* foi excluída do alinhamento.

3.3. Análises populacionais, hipóteses filogenéticas, redes de haplótipos e datação molecular

Para inferir sobre a diversidade genética e estrutura das populações foram calculados índices de diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (Hd)

(Nei, 1987) e análises de variância molecular - AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) implementadas com auxílio dos programas DNASP (Rozas *et al.*, 2003) e ARLEQUIN 3.0 (Excoffier *et al.* 2005).

Para a reconstrução filogenética foram utilizadas análises de Máxima Verossimilhança realizadas no MEGA versão 5 (Tamura *et al.* 2011) com 100 replicações de Bootstrap e modelos definidos pelo ModelTest (Posada & Crandall 1998). Também foram realizadas análises Bayesianas implementadas pelo MrBayes versão 3.2 (Ronquist *et al.* 2011) com modelos definidos pelo mrModelTest versão 2, definidos pelo critério AIC (Nylander, 2004). Modelos diferentes foram estimados para cada conjunto de dados (CO1, Ef1a e Pol2) e as árvores foram reconstruídas com os dados concatenados, considerando a partição para cada conjunto gênico. Foram realizadas 10.000.000 de gerações para as cadeias markovianas MCMC com eliminação de 25% das gerações iniciais.

Foram produzidas duas árvores filogenéticas enraizadas com diferentes grupos externos. O grupo interno (gênero *Melipona*) foi o mesmo para as duas árvores e foram utilizadas 13 amostras de *M. capixaba* (todos os diferentes haplótipos mitocondriais), 39 amostras de *M. scutellaris* (representando toda a área de ocorrência da espécie) e 33 amostras de outras *Melipona*, especialmente do subgênero *Michmelia*. Para os grupos externos foram utilizadas 29 amostras de outras abelhas corbiculadas, incluindo Meliponini, Apini, Bombini, Euglossini e um representante do gênero *Epicharis* (Centridini) como grupo externo, totalizando 114 OTUs. A primeira árvore foi reconstruída utilizando se como grupo externo cinco amostras de Meliponini Neotropicais e árvore 2, utilizada para a datação molecular, foi reconstruída com todas as amostras dos grupos externos.

As redes de haplótipos foram reconstruídas por análise de *median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999) utilizando o programa NETWORK 4.5 (www.fluxus-engineering.com) e editadas manualmente para melhor visualização gráfica dos grupos formados.

A datação molecular foi realizada no programa r8s (Sanderson, 2003). O r8s estima o tempo de divergência entre os clados a partir de uma árvore

filogenética com tamanho de ramos estimados, sendo o tamanho de ramos o número de substituições ao longo de cada ramo. Para as estimativas de tempo de divergência foi utilizada a mesma árvore filogenética obtida por inferência bayesiana. Como critério foram utilizados relógio molecular relaxado, com método *PL* (*Penalized likelihood*) (Sanderson, 2002) e algoritmo TN, que considera taxas de substituição diferentes em cada ramo da árvore. Comparativamente, também foram calculados o tempo do ancestral comum mais recente - *Tmrca* dos principais clados de interesse, com análises implementadas no Beast - *Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*, versão 1.7.1 (Drummond *et al*, 2012). As análises foram conduzidas utilizando diferentes modelos de substituição para cada conjunto de genes (CO1, EF1a e POL2). Foram calculadas cinco estimativas independentes, cada rodada com 25.000.000 de gerações para MCMC e eliminação de 25% das árvores iniciais. Os resultados foram analisados no *Tracer - MCMC Trace Analysis Tool*, versão 1.5 (Rambaut e Drummond, 2009).

Para calibrar o relógio molecular foram considerados múltiplos pontos de calibração, sendo a idade da raiz da árvore estimada entre 80-90 milhões de anos - Ma (estimativa da idade dos corbiculados baseada em Cardinal *et al*. 2010); como calibração para os Meliponini utilizou-se a datação fóssil para *Cretotrigona prisca* entre 65-70 Ma (Michener & Grimaldi, 1988a e b; Engel, 2000); como calibração para os Apini a datação fóssil para *Apis lithohermaea* entre 14-16 Ma (Engel, 2006); e 14-17 Ma para a idade do gênero *Melipona* (Ramírez *et al.*, 2010).

4. RESULTADOS

4.1. Variação nucleotídica

Foram obtidos cerca de 1.100 pares de bases (pb) correspondentes ao gene mitocondrial CO1, cerca de 1000 pb correspondentes ao gene nuclear EF1 α e 852pb para o gene nuclear POL2. As sequências dos genes foram confirmadas com mais de 98% de similaridade com outras sequências dos mesmos genes e de espécies próximas comparadas no GenBank - NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) por meio do algoritmo BLAST.

Como esperado, as sequências mitocondriais mostraram-se mais variáveis que as nucleares, mas, ainda assim, bastante conservadas. Pouca variação foi observada entre as sequências nucleares, mostrando-se altamente conservadas mesmo entre as espécies. A tabela 1 mostra o número de sítios variáveis, a composição de bases e a distância-*p* (número de sítios diferentes/número total de sítios) entre os pares de sequências dos indivíduos avaliados. A avaliação das sequências referentes ao CO1 não sugeriu a ocorrência de *numts* para as amostras de *M. capixaba* nem de *M. scutellaris*.

Tabela 1 – Número de sítios, composição de bases e distância-*p* entre os pares de sequências para os fragmentos dos genes COI e EF1 α das espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*.

	Nº sítios	C	V	S	%T	%C	%A	%G	Distância- <i>p</i> *
<i>M. capixaba</i>									
COI	1162	1146	16	4	43	11	34	12	0.003
EF1α	944	944	0	0	32	18	29	22	0
POL2	852	852	0	0	33	22	27	18	0
<i>M. scutellaris</i>									
COI	1146	1091	55	9	43	11	35	11	0.01
EF1α	1007	1003	4	1	28	22	32	18	0.001
POL2	852	852	0	0	33	22	27	18	0

C – Número de sítios conservados; V – sítios variáveis; S – *singletons*; * Média de todas as distâncias par-a-par.

4.2. Inferências Filogenéticas

O alinhamento final utilizado para produzir as hipóteses filogenéticas resultou em 998pb CO1, 850pb EF1a e 668pb POL2, totalizando 2516 pb com os genes concatenados. O modelo evolutivo selecionado para CO1 foi GTR+I+G, para EF1a foi GTR + G e para POL2 GTR+I+G.

A Figura 1 mostra a árvore produzida por Inferência Bayesiana a partir de 10.000.000 de gerações de MCMC, eliminando 25% das árvores iniciais. Optamos por apresentar apenas a seção da árvore referente ao subgênero *Michmelia* para facilitar a visualização das relações entre os grupos de interesse.

M. capixaba e *M. scutellaris* aparecem como grupos irmãos e formam um clado dentro do subgênero *Michmelia*, Grupo Fasciata, com alto suporte estatístico de Probabilidade posterior - PP (0,90PP na árvore 1 e 1/PP na árvore 2). O grupo *M. capixaba* forma um subclado bem sustentado estatisticamente (1/PP), com uma divisão principal em dois clados (0,86 e 0,98/PP). Estes grupos são coincidentes com a principal separação verificada na rede de haplótipos para a espécie e congruente com uma certa separação geográfica.

A espécie *M. scutellaris* aparece como grupo parafilético dentro do clado (*M. scutellaris*, *M. capixaba*). Uma politomia (incluindo o clado *M. capixaba*) separa as amostras de *M. scutellaris* em pelo menos três ramos formando grupos diferentes em *M. scutellaris*. O primeiro destes ramos tem alto suporte estatístico (1/PP) e reúne a maioria das sequências de *M. scutellaris*, formando dois grupos coincidentes com a rede de haplótipos (G1 e G2). O grupo 1 reúne amostras coletadas na região mais litorânea da área de distribuição geográfica da espécie, com indivíduos amostrados desde o sul da Bahia, passando por Sergipe e Pernambuco, até o sul da Paraíba. O grupo 2 reúne indivíduos amostrados no extremo norte da distribuição geográfica da espécie, incluindo as regiões litorâneas e as áreas interioranas de brejos de altitude do estado da Paraíba.

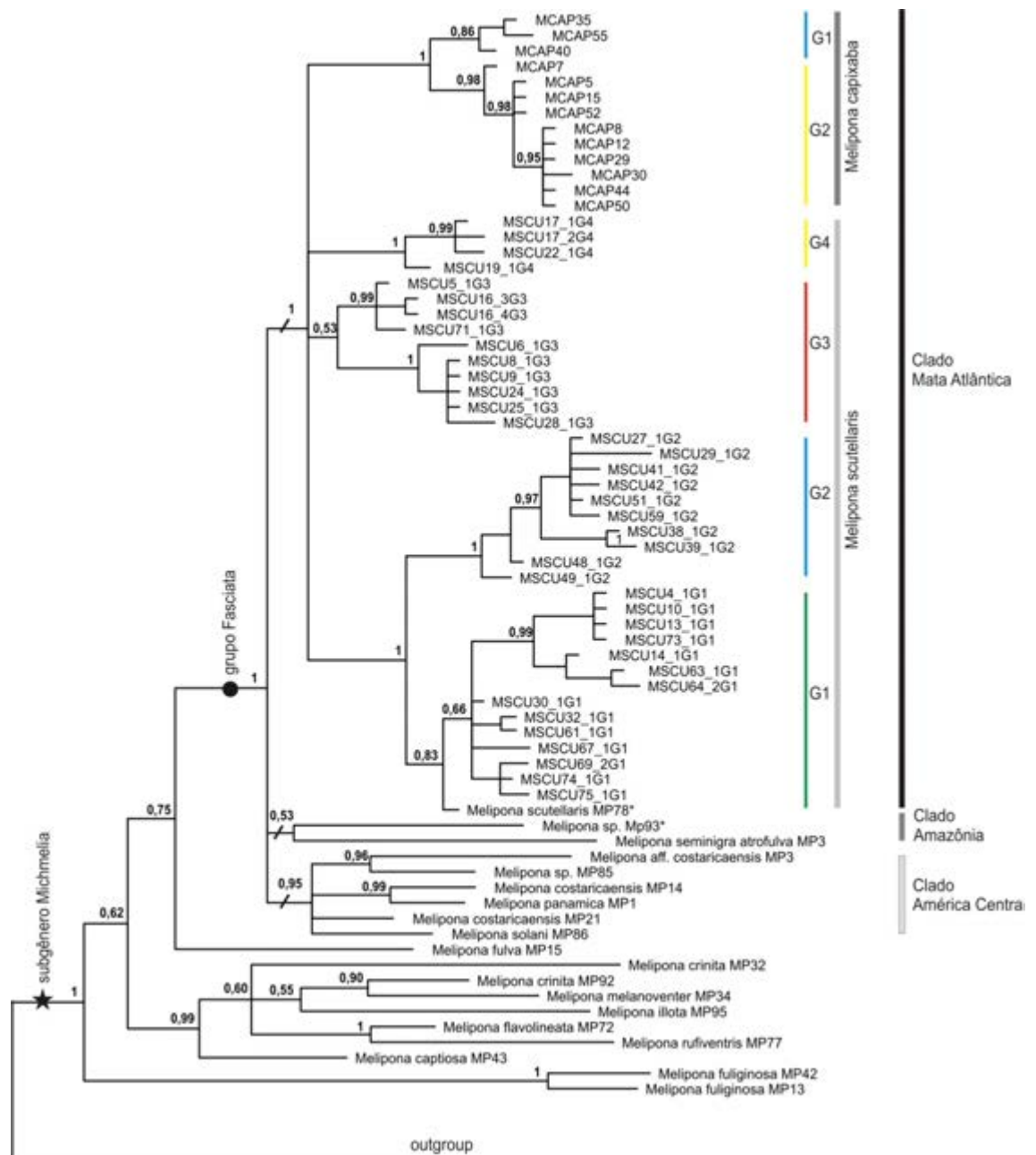


Figura 1. Árvore consenso de maioria do conjunto de cadeias de Markov, cada conjunto com 10.000.000 de gerações para MCMC, eliminando-se 25% das árvores iniciais de cada uma, reconstruída por inferência bayesiana utilizando sequências dos genes mitocondrial COI e nuclear EF1alfa. Os números à esquerda dos nós indicam probabilidade posterior para os clados.

O segundo ramo tem baixo suporte estatístico (0,53/PP), mas reúne dois grupos também coincidentes com a rede de haplótipos, ambos bem suportados estatisticamente (G3a, 1/PP e G3b, 0.99/PP) que reúnem amostras coletadas nas regiões da chapada da Bahia, nas áreas mais interioranas da distribuição geográfica da espécie. O terceiro ramo relativo à *M. scutellaris* é bem sustentado (1/PP) e coincide com o grupo 4 identificado na rede de haplótipos reunindo amostras coletadas no extremo sul da distribuição geográfica no estado da Bahia, em regiões também de altitude mais elevadas em comparação com as amostras mais litorâneas.

Outro aspecto interessante revelado pela hipótese filogenética apresentada é a concordância entre os clados monofiléticos e a distribuição geográfica das espécies. Considerando apenas o grupo Fasciata, subgênero *Michmelia*, nota-se a formação de dois clados monofiléticos. O clado nomeado **Clado Mata Atlântica** (1/PP) reúne exatamente as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*, únicas espécies deste grupo a ocorrer no bioma Mata Atlântica. O segundo nomeado **Clado América Central**, (0,95/PP na árvore 1 e 0,99PP na árvore 2) agrupa indivíduos com ocorrência geográfica nesta região do continente americano. Indivíduos coletados da região Amazônica contém apenas três amostras e, por isso, não representam bem as espécies que ocorrem neste bioma.

4.3. Divergência Genética e Estruturação Geográfica

Árvores filogenéticas não enraizadas considerando todos os diferentes haplótipos mitocondriais de ambas as espécies e redes de haplótipos mitocondriais considerando todos os indivíduos amostrados também sugerem estruturação espacial das linhagens mitocondriais. Para as árvores não enraizadas consideramos apenas os dados mitocondriais, uma vez que não há diferenças informativas nos genes nucleares analisados. As redes de haplótipos foram igualmente reconstruídas considerando apenas as sequências CO1, todas as amostras, 44 colônias da espécie *M. capixaba* e 103 colônias da espécie *M. scutellaris*, amostradas ao longo de toda a área de ocorrência geográfica conhecida das duas espécies.

Os modelos evolutivos considerados nas análises de Máxima Verossimilhança e Bayesiana foram HKY+I para a espécie *M. capixaba* e GTR+I para a espécie *M. scutellaris*, conforme critérios AIC obtidos pelo ModelTest e mrModelTest.

Para a espécie *M. capixaba*, tanto a árvore de Máxima Verossimilhança como a de Inferência Bayesiana apresentam dois grupos bem suportados com altos valores de probabilidade posterior e de *bootstrap* (Fig. 2a). A rede de haplótipos para a espécie *M. capixaba* (Fig. 2b) recupera os mesmos grupos da árvore filogenética, com uma separação de três passos mutacionais, a maior na rede de haplótipos, entre os haplótipos considerados no grupo 1 e os haplótipos considerados no grupo 2.

Os grupos considerados nas análises filogenéticas e na rede de haplótipos coincidem com uma distribuição geográfica centro/norte (G1) e centro/sul (G2) (Fig. 2c). Não há um isolamento entre os dois grupos no centro da distribuição onde ocorrem haplótipos de ambos os grupos, na região de Pedra Azul, município de Domingos Martins/ES. No norte e oeste da distribuição ocorrem apenas haplótipos do grupo 1, enquanto no sul ocorrem apenas haplótipos do grupo 2.

Para a espécie *M. scutellaris*, tanto a árvore de Máxima Verossimilhança como a de Inferência Bayesiana apresentam quatro grupos. No entanto, estes grupos não são bem sustentados por altos valores de probabilidade posterior e de *bootstrap* (Fig. 3). A rede de haplótipos para a espécie *M. scutellaris* também recupera quatro grupos, coincidentes com as análises filogenéticas (Fig. 4a). Apesar do baixo suporte estatístico apresentado pelos clados na análise filogenética, os grupos na rede de haplótipos apresentam-se bem estruturados, com os maiores ramos da rede (sete passos mutacionais) separando cada grupo.

Os grupos recuperados tanto na análise filogenética quanto na rede de haplótipos também apresenta estruturação geográfica (Fig. 4b). O grupo 1 apresenta uma distribuição mais litorânea, desde o sul da distribuição (na estado da Bahia) até o norte da distribuição no sul da Paraíba. Uma única exceção é o representante do haplótipo 12/grupo1 amostrado no município de

Andaraí, no interior da Bahia onde, exceto por este haplótipo, é uma região exclusiva de haplótipos do grupo 3. O grupo 2 distribui-se quase que exclusivamente no extremo norte da distribuição da espécie, no estado da Paraíba. Uma única exceção é um representante do haplótipo 43/grupo2 amostrado na Reserva Biológica de Saltinho, município de Tamandaré, litoral sul de Pernambuco. O grupo 3 distribui-se exclusivamente no interior do estado da Bahia, em regiões de altitude acima de 500/600m, em regiões de chapadas. O grupo 4 distribui-se exclusivamente no extremo sul da distribuição geográfica da espécie, no estado da Bahia.

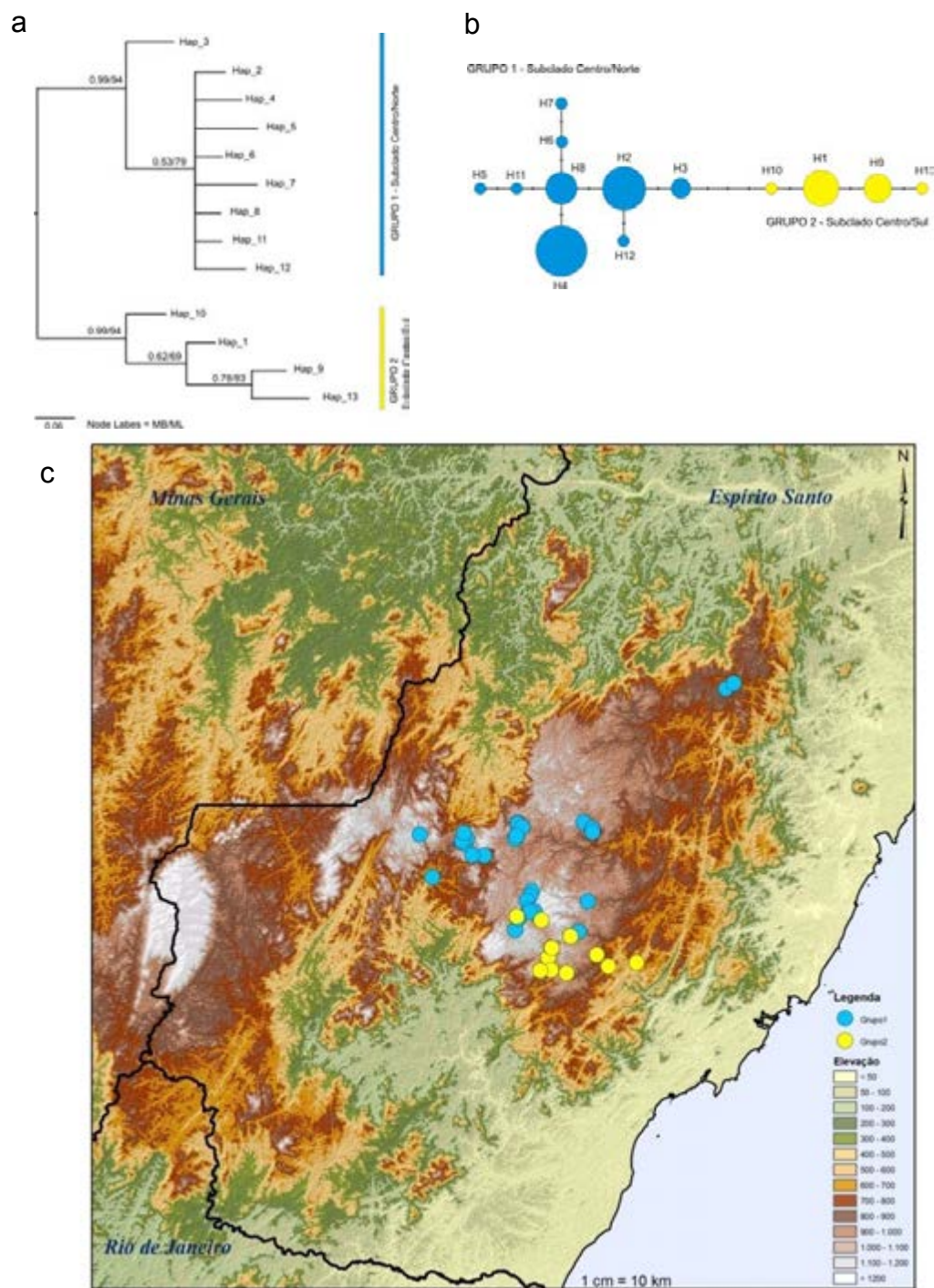


Figura 2. (a) Árvore consenso de duas cadeias, cada uma com 3.000.000 de gerações para MCMC, eliminando-se 25% das árvores iniciais de cada uma, reconstruída por inferência bayesiana a partir de sequências de genes mitocondriais CO1 da espécie *Melipona capixaba*. A árvore reconstruída por Máxima Verossimilhança é compatível com a apresentada. Os números à esquerda dos nós indicam probabilidade posterior e bootstrap respectivamente (MB/ML). Para melhor visualização da árvore foram representados apenas os diferentes haplótipos. (b) Rede de haplótipos obtida por

median-joining network a partir do gene mitocondrial CO1 para a espécie *Melipona capixaba*. O tamanho dos círculos representa a frequência do haplótipo. As cores indicam os grupos considerados. (c) Mapa de distribuição geográfica das 44 colônias amostradas de *M. capixaba*. Os círculos no mapa representam o ponto de amostragem e suas cores se referem aos grupos correspondentes nas análises filogenéticas (a) e na rede de haplótipos (b).

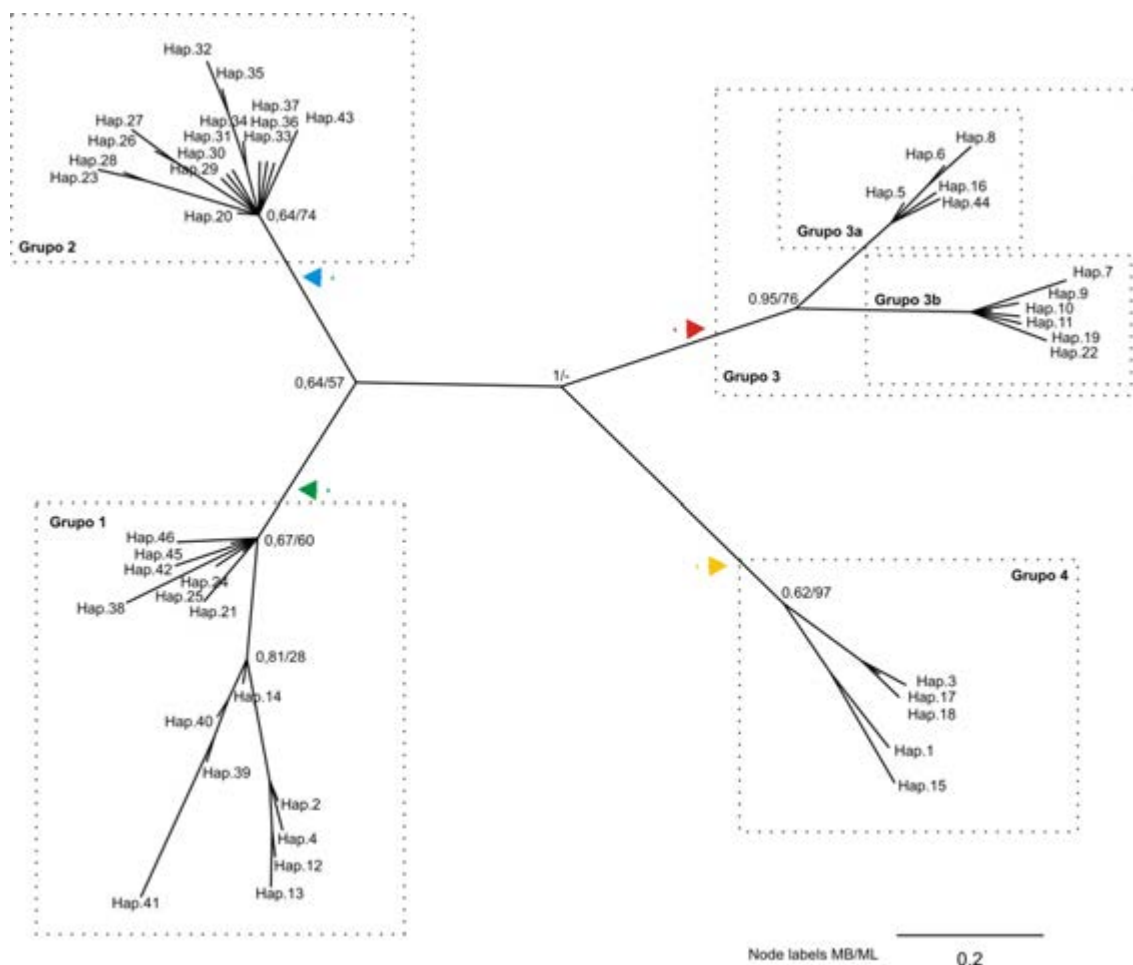


Figura 3. Árvore consenso de duas cadeias, cada uma com 3.000.000 de gerações para MCMC, eliminando-se 25% das árvores iniciais de cada uma, reconstruída por inferência bayesiana, a partir de sequências mitocondriais do gene CO1 da espécie *M. scutellaris*. A árvore reconstruída por Máxima Verossimilhança é compatível com a apresentada. Os números nos nós indicam probabilidade *a posteriori* e bootstrap respectivamente (MB/ML). Para melhor visualização da árvore foram representados apenas os diferentes haplótipos. As pontas de setas e suas respectivas cores fazer referências aos grupos verificados na rede de haplótipos.

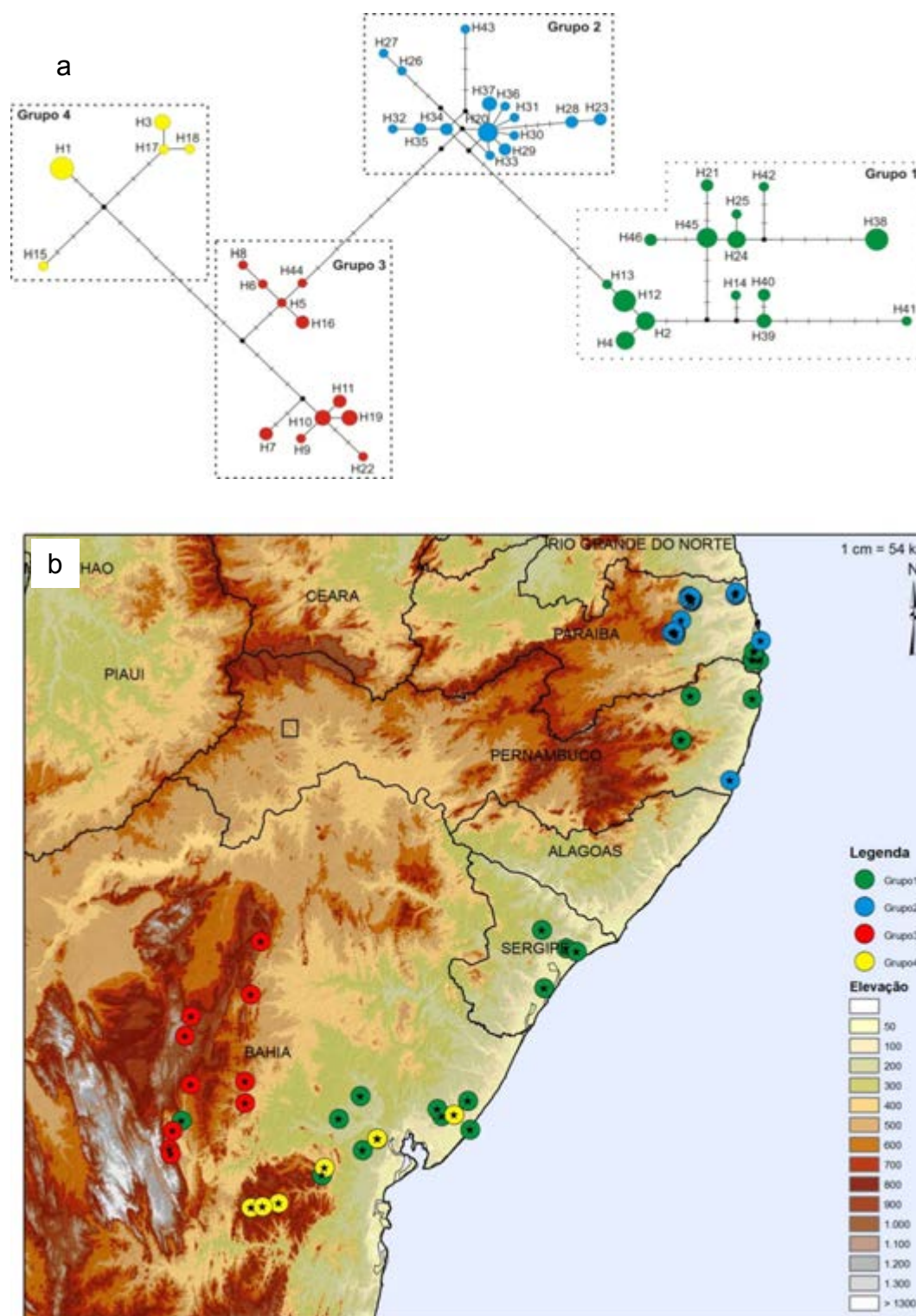


Figura 4. (a) Rede de haplótipos obtida por *median-joining network* a partir de genes mitocondriais CO1 para a espécie *Melipona scutellaris*. O tamanho dos círculos representa a frequência do haplótipo. As cores indicam os grupos considerados. (b) Mapa de distribuição geográfica das 103 colônias amostradas de *M. scutellaris*. Os círculos no mapa representam o ponto de amostragem e suas cores se referem aos grupos correspondentes na rede de haplótipos (a).

4.4. Análises de Variação Molecular AMOVA e índices de fixação

Considerando como populações os grupos de haplótipos formados pelas análises filogenéticas e rede de haplótipos, a análise de variância molecular AMOVA foi conduzida com dois níveis hierárquicos, dentro e entre grupos.

Para a espécie *M. capixaba* a AMOVA indica que a maior parte da variação, 73.31%, é encontrada entre os grupos de haplótipos e 26.6% da variação no DNA mitocondrial de *M. capixaba* é verificada dentro dos grupos de haplótipos propostos. O índice de fixação Φ_{ST} calculado foi de 0.73 reforçando a hipótese de estruturação da população de *M. capixaba* (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância molecular – AMOVA para a espécie *Melipona capixaba*, com dois níveis hierárquicos, considerando os mesmos grupos identificados nas análises filogenéticas e na rede de haplótipos.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Porcentagem de Variação
Entre grupos de haplótipos	1	73.95*
Dentro dos grupos de haplótipos	42	26.05*
Total	43	

* $P < 0,0001$. Teste de significância com 10.000 permutações.
Índice de Fixação $\Phi_{ST} = 0.73$. $P < 0,0001$.

Para a espécie *M. scutellaris*, a AMOVA também indica que a maior parte da variação, 61.42%, se encontra entre os grupos de haplótipos. Ainda, 38.58% da variação mitocondrial observada entre os haplótipos de *M. scutellaris* se encontra dentro dos grupos propostos. O índice de fixação calculado foi de $\Phi_{ST} = 0.61$, também corroborando a estruturação nos grupos de haplótipos propostos (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de variância molecular – AMOVA para a espécie *Melipona scutellaris*, com dois níveis hierárquicos, considerando os mesmos grupos identificados nas análises filogenéticas e na rede de haplótipos.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Porcentagem de Variação
Entre grupos de haplótipos	3	61.42*
Dentro dos grupos de haplótipos	103	38.58*
Total	106	

* $P < 0,0001$. Teste de significância com 10.000 permutações.
Índice de Fixação $\Phi_{ST} = 0.61$. $P < 0,0001$.

A estatística Φ_{ST} é similar à estatística F_{ST} (Wright, 1921) porém estimada para dados moleculares e indica a correlação entre haplótipos escolhidos ao acaso dentro do grupo formado (subpopulações) em relação ao total de haplótipos da espécie (população) (Excoffier *et al.* 1992). Assim, quanto maior o número Φ_{ST} calculado, maior é a estruturação do grupo em relação à diversidade total, isto porque os indivíduos que formam o grupo têm maior correlação entre si do que com o total de indivíduos.

4.5. Estimativas de Diversidade

Para as sequências mitocondriais, foram verificados 13 diferentes haplótipos para as 44 colônias amostradas de *M. capixaba*, com diversidade haplotípica $Hd = 0.8594$ e diversidade nucleotídica $\pi = 0.00317$. Para as 103 colônias amostradas de *M. scutellaris* foram observados 46 diferentes haplótipos mitocondriais, com diversidade haplotípica $Hd = 0.9751$ e $\pi = 0.00976$. As sequências nucleares em *M. capixaba* foram altamente conservadas, com apenas duas mutações em 944 pb e $\pi = 0.000$. Em *M. scutellaris* cinco alelos foram observados, com diversidade nucleotídica $\pi = 0.00143$.

O índice de diversidade haplotípica (H_d) indica a probabilidade de dois haplótipos escolhidos ao acaso no conjunto de amostras serem diferentes (Nei, 1987). O índice de diversidade haplotípica indica uma maior similaridade entre os haplótipos mitocondriais em *M. capixaba* e, sendo assim, uma menor diversidade genética foi verificada nesta espécie, em comparação com a espécie *M. scutellaris*.

O índice de diversidade nucleotídica (π) indica o número médio de diferenças nucleotídicas entre os haplótipos calculados par a par (Nei, 1987). Tanto em *M. capixaba* como em *M. scutellaris* foram verificados baixos índices de variação entre as sequências mitocondriais, com menos de 1% de diferença média entre as sequências comparadas par a par. Em *M. capixaba* a diferença é três vezes menor que em *M. scutellaris*, apenas 0.3% de diferenças nucleotídicas contra, em média, 0.9% de diferença entre as sequências mitocondriais de *M. scutellaris*.

4.6. Datação Molecular e tempo de divergência

As análises de datação molecular indicam que as idades ancestrais comuns mais recentes T_{mrca} para os diferentes clados variam entre idades mais antigas no Mioceno e Plioceno, até datas mais recentes no Pleistoceno (Tabela 4).

Segundo datações obtidas com o R8S, o clado que reúne o gênero *Melipona* foi estimado como tendo T_{mrca} há 16 Milhões de anos atrás (Maa), no Mioceno. Para a espécie *M. capixaba* o T_{mrca} foi estimado em 1,19 Maa, no Pleistoceno. Para os grupos dentro de *M. scutellaris* o T_{mrca} varia entre 650 mil anos a 1,26 Maa. Um único grupo (3a) foi datado de 3.69 Maa. No entanto, esse clado não foi bem sustentado estatisticamente e é provável que essa datação não esteja adequada, exigindo uma melhor amostragem para este grupo.

Uma vez que *M. scutellaris* não forma um grupo monofilético o T_{mrca} para espécie remete ao T_{mrca} do clado Mata Atlântica, que reúne o ancestral comum mais recentes de ambas as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*, com T_{mrca}

estimado em 4,43 Maa. A data do clado América Central foi estimado em 3,47 Maa. Os T_{mrca} calculados pelo BEAST, mostram datas geralmente mais antigas para todos os clados inferidos.

Tabela 4. Tempo até o ancestral comum mais recente (T_{mrca}) em milhões de anos atrás, estimados para cada clado de interesse.

Clado	r8s	<i>Tmrca</i> (Milhões de anos atrás)		
		Beast		
		média	intervalo de confiança	
			95% inferior	95% superior
Gênero <i>Melipona</i>	16,88	16,28	14,86	17,77
<i>Melipona capixaba</i>	1,19	3,43	1,26	6,02
Grupo 1	0,62	2,24	0,2	5,04
Grupo 2	0,6	3,92	1,41	6,93
<i>Melipona scutellaris</i>				
Grupo 1	1,26	3,99	1,93	6,38
Grupo 2	0,85 - 2.89	3,02	1,22	4,95
Grupo 3a	3,69	1,95	0,42	3,98
Grupo 3b	0,64	1,55	0,15	3,67
Grupo 4	0,92	2,15	0,34	4,45
Clado Mata Atlântica	4,43	7,23	4,48	10,08
Clado América Central	3,46	6,77	3,59	10,11

5. DISCUSSÃO

5.1. Relações filogenéticas

A árvore filogenética apresentada confirma a hipótese levantada por Moure e Camargo (1994) sobre a relação de espécies irmãs entre *M. capixaba* e *M. scutellaris* mostrando que além da semelhança morfológica as espécies também são próximas genética e evolutivamente. A possibilidade de intercruzamento entre essas espécies, inclusive gerando descendentes férteis (veja capítulo 3), também confirma tal proximidade filogenética, como sugerido por Nascimento *et al.* (2000)

A não monofilia do grupo *M. scutellaris* mostra a existência de grupos divergentes que devem ser tratados como unidades separadas em programas de conservação da espécie. Os genes nucleares que utilizamos são muito conservados sugerindo um processo de especiação recente do grupo *M. capixaba* e *M. scutellaris*. Mesmo entre *M. capixaba* e *M. scutellaris* há pouca diferença para o gene EF1alfa e nenhuma para o gene POL2. Ainda assim, das cinco variantes alélicas verificadas para o gene EF1a em *M. scutellaris*, pelo menos uma variante alélica é exclusiva do grupo 3 e 4, mostrando um possível isolamento destas populações não só em relação ao mtDNA, mas também no genoma nuclear.

É bastante provável que as populações divergentes das regiões de chapada da Bahia e do extremo sul da Bahia sejam também consideradas como em alto risco de extinção, dadas a reduzida área de ocorrência e reduzido tamanho populacional destes grupos.

5.2. Eventos de especiação

As datações moleculares estimadas para os clados estudados permite reconstruir uma hipótese evolutiva baseada em expansão populacional e vicariância como determinantes nos processos de especiação no grupo *Fasciata*, subgênero *M. Michmelia*.

As abelhas em geral estabeleceram uma relação de interdependência com as plantas fanerógamas para a coleta de recursos tais como pólen, néctar e resinas. Além disso, as abelhas do gênero *Melipona* fundam seus ninhos nos ocos dos troncos das árvores, com exceção de *M. quinquefasciata* que funda ninhos no solo. Desta forma, florestas estáveis onde as árvores são mais velhas oferecem troncos mais adequados para o estabelecimento de novos ninhos, especialmente para as espécies de abelhas mais robustas como a *M. capixaba* e *M. scutellaris*.

Os processos que influenciam na expansão ou redução das áreas ocupadas por florestas vão influenciar diretamente também as populações de abelhas desses ambientes, permitindo sua expansão populacional ou determinando a fragmentação e isolamento das populações.

Nossa datação molecular indica que o ancestral comum mais recente entre as espécies do gênero *Melipona* data de 16 milhões de anos atrás (Maa), coincidente com o estimado por Ramírez *et al* (2010). DaSilva e Pinto-da-Rocha (2011), citando Morley (2000) declaram que o estabelecimento das florestas tropicais na América do Sul se deu especialmente no final do Paleoceno, início do Eoceno (50 Maa) com a predominância de um clima quente e úmido que permitiu a recuperação da biodiversidade das angiospermas depois da grande extinção do fim do Cretáceo. Floresta úmidas na América do Sul ocorriam de forma contínua do Pacífico ao Atlântico e eram ainda mais extensas que as atuais durante o Mioceno Médio (16 - 10 Maa).

Tais florestas extensas e contínuas que ocupavam a América do Sul durante o Mioceno Médio coincidem com o período estimado para o ancestral comum do gênero *Melipona*. Isso permitiu que as linhagens ancestrais se dispersassem também por toda a extensa e contínua floresta deste período.

Ainda citando Morley (2000) e DaSilva e Pinto-da-Rocha (2011), a partir do Plioceno (~5 Maa), o resfriamento e ressecamento global e os ciclos interglaciais causou a redução e fragmentação desta floresta contínua que ocupava a América do Sul, com expansão de áreas abertas savânicas, na América do Sul representadas pela "Diagonal de formações abertas" formadas

pelos biomas da Caatinga, Cerrado e Chaco, separando definitivamente a Mata Atlântica.

Tais eventos que influenciaram a formação e evolução do bioma Mata Atlântica parece ter influenciado diretamente a evolução das linhagens de *M. capixaba* e *M. scutellaris* (Figura 5). A datação para o ancestral comum mais recente entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* sugere que a gênese da Mata Atlântica a partir da expansão da "Diagonal de formações abertas" foi o evento de vicariância que resultou no isolamento da linhagem ancestral dessas espécies.

Neste mesmo período também foi datado o ancestral comum mais recente entre as espécies de Mata Atlântica e as espécies que ocupam a América Central (4 Maa) reforçando a hipótese de isolamento dos grupos nos diferentes ambientes. A partir de 3,5 a 3,0 Maa ocorre a formação do Istmo do Panamá, conectando a América do Sul e América Central, o que permitiu a troca entre a fauna e flora destes ambientes (Coates *et al*, 1992; Burnham e Graham 1999; Lavina e Fauth, 2011). O clado entre as espécies que ocorrem na América Central foi datado em 3.46 Maa.

A partir do Pleistoceno (~2,5 Maa) os ciclos glaciais-interglaciais provocaram diferentes épocas de aquecimento e resfriamento do globo, causando diferentes momentos de expansão e retração das florestas. Nos períodos mais frios e secos, as florestas na Mata Atlântica se reduziam a fragmentos mais ou menos extensos dependendo da região, formando os chamados Refúgios Vegetacionais do Quaternário (Haffer, 1969; Brown Jr. & Ab'Saber, 1979). A teoria dos refúgios pode explicar a divergência genética dos grupos verificados tanto em *M. capixaba* como em *M. scutellaris*. Os grupos verificados nas análises filogenéticas possuem T_{mrca} estimados entre 600 mil anos a 1,26 Maa, coincidindo com os períodos de glaciação do Quaternário.

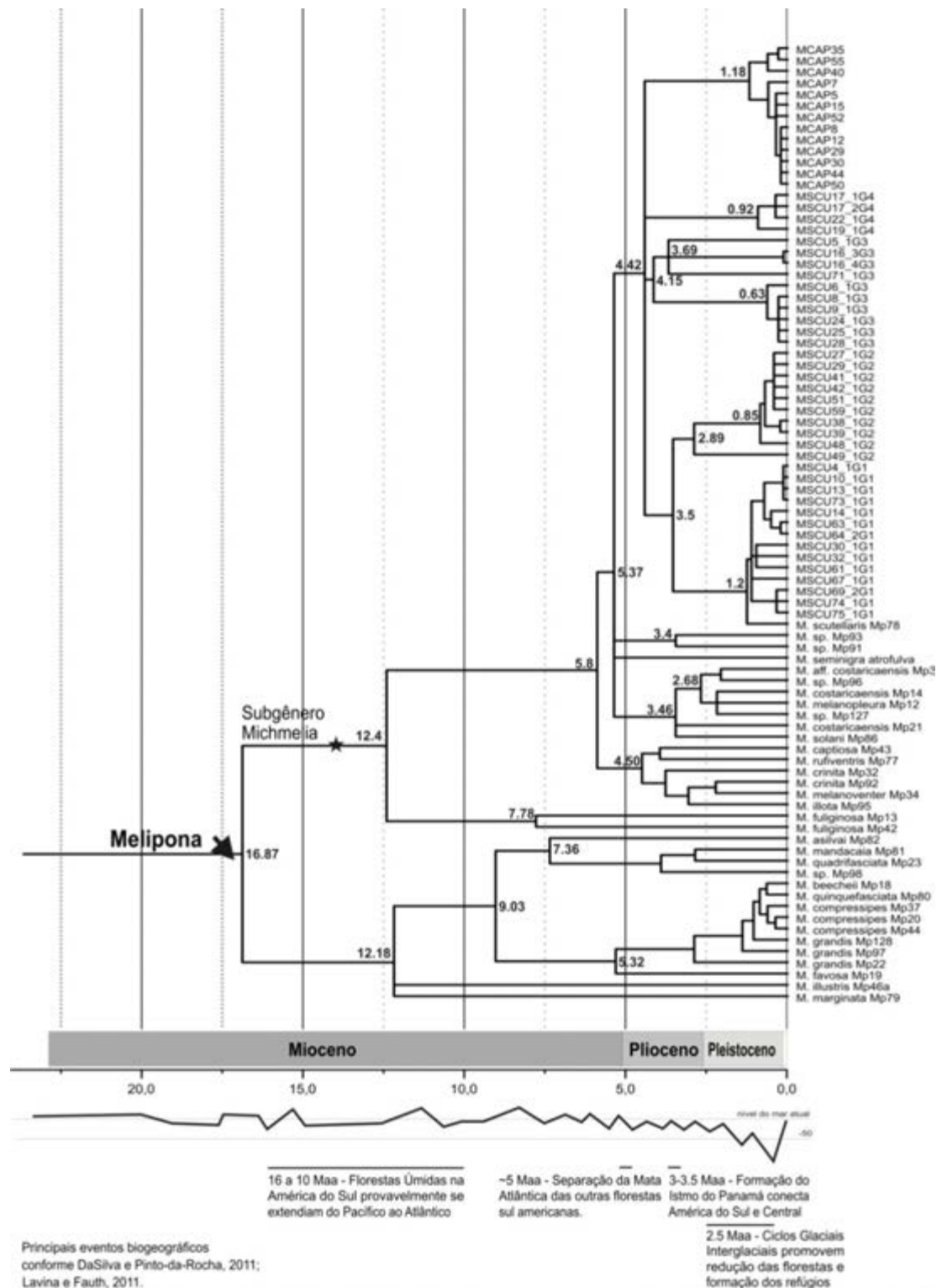


Figura 5. Árvore consenso de maioria de dois conjuntos de cadeias de Markov, cada um com 10.000.000 de gerações para MCMC, eliminando-se 25% das árvores iniciais de cada, reconstruída por inferência bayesiana, a partir de sequências mitocondriais CO1 e nucleares EF1alfa, apresentando a datação molecular estimada com o r8s para os clados de interesse. Os números próximos aos nós indicam tempo de divergência em milhões de anos atrás.

Carnaval *et al.* (2009) predizem a ocorrência de um grande e estável refúgio durante o Pleistoceno, nomeado pelos autores de Refúgio Bahia, e outro refúgio também estável para a região de Pernambuco, isolados um do outro durante os períodos de glaciação. Considerando a espécie *M. scutellaris*, a formação dos grupos 1 e 2 em *M. scutellaris* coincide com o modelo Carnaval-Moritz. O Grupo 1 (1,26 Maa) e o Grupo 2 (850 mil anos) pode ser explicados pela manutenção de populações isoladas nos diferentes refúgios, G1 no refúgio Bahia e G2 no refúgio Pernambuco.

Entretanto, populações que estão hoje mais próximas geograficamente do Grupo 1, como G3 e G4 formam clados isolados geneticamente e, por isso não podem ser explicados pela manutenção de populações no refúgio Bahia, senão, era de se esperar que os haplótipos que formam G1, G2 e G3, fossem relacionados devido à permanência neste refúgio. Assim, o modelo Carnaval-Moritz para o refúgio Bahia não explica a divergência verificada nos grupos 3 e 4 de *M. scutellaris*. É possível que as linhagens ancestrais desses grupos tenham se mantidos em refúgios diferentes, isolados do refúgio Bahia, talvez em áreas mais altas já que hoje as populações ocupam exclusivamente as regiões das chapadas da Bahia.

As linhagens ancestrais que resultaram na especiação de *M. capixaba* também devem ter se refugiado em áreas diferentes destes refúgios centrais da Bahia e norte do Pernambuco. Hoje a espécie é endêmica de regiões de altitude e clima mais frio e é possível que as populações ancestrais ocorreram em refúgios mais próximos à Serra do Mar, na região do sul do Espírito Santo e Norte do Rio de Janeiro. Resende *et al.* (2010) sugere a ocorrência de possíveis pequenos refúgios ocorrendo ao sul do Rio Doce para explicar o isolamento e divergência de linhagens estruturadas da formiga gigante *Dinoponera lucida*. A especiação de *M. capixaba* e a separação em dois grupos G1 (620 mil anos) e G2 (600 mil anos) corrobora essa hipótese de pequenos refúgios isolados ao sul do refúgio Bahia. Apesar de estarem ocorrendo em uma mesma área hoje, é possível que no passado as linhagens tenham se isolado nestes possíveis refúgios, promovendo a estruturação observada em *M. capixaba*.

Assim, uma hipótese de expansão e vicariância para história evolutiva das abelhas endêmicas da Mata Atlântica *M. capixaba* e *M. scutellaris* pode ser traçada em três momentos distintos, **(i)** evento de expansão populacional das linhagens ancestrais durante o Mioceno em áreas com extensas florestas úmidas permitiu a ocupação de diferentes áreas da América do Sul; **(ii)** evento de vicariância do Plioceno (4-5 Maa) que isolou a Mata Atlântica isolou nesse ambiente a linhagem ancestral das espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*, **(iii)** eventos de vicariância durante o Pleistoceno isolou as linhagens ancestrais que divergiram nos atuais grupos de *M. scutellaris* (650 mil a 1,2 Maa) e a na especiação de *M. capixaba* (1,2 Maa).

5.3. Unidades de manejo e populações para conservação.

Tanto os valores de Φ_{ST} calculados como o resultado da AMOVA indicam a necessidade de manejo para a conservação das populações considerando a estruturação das populações. Uma população de conservação que fosse estabelecida apenas com representantes de um dos grupos estaria preservando apenas parte da variação e indivíduos altamente correlacionados. Uma vez que a maior parte da variação foi verificada entre os grupos propostos, populações de conservação devem considerar a preservação do máximo de variabilidade representando todos os grupos de subpopulações.

Uma baixa diversidade genética foi verificada tanto em *M. scutellaris* como em *M. capixaba*, sendo que nesta última a diversidade nucleotídica (π) é três vezes menor, $\pi = 0.00976$ e $\pi = 0.00317$, respectivamente. Valores abaixo de 1% de π no DNA mitocondrial têm sido verificados em diferentes populações de abelhas. Magnus *et al.* (2011) estimou $\pi = 0.00352$ para populações de *Apis mellifera* nos Estados Unidos. Populações de *A. mellifera* da Turquia apresentaram $\pi = 0.01$ (Solorzano *et al.* 2009) e Tan *et al.* (2007) estimou $\pi = 0.0056$ para populações de *Apis cerana* em diferentes localidades da China. Francisco *et al.* (2010) estimou $\pi = 0.00819$ para populações de *Plebeia remota* e Batalha Filho (2010) estimou $\pi = 0.00547$ para populações de *Melipona quadrifasciata* ambos no Brasil.

A diversidade genética mitocondrial em abelhas de um modo geral, e em especial nas espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*, pode ser considerada baixa se considerada a média estimada para os invertebrados, de 7.67% (Bazin *et al.* 2006). No entanto, considerando a classe Insecta, a média estimada por estes autores está entre 0,5% a 1% de diversidade genética mitocondrial, compatível com o observado em abelhas.

Uma comparação interessante é analisar a diversidade encontrada em populações naturais *versus* a verificada em colônias manejadas nos meliponários. Santiago *et al.* (2010) comparou populações de *Tetragonisca angustula* e *T. fiebrigi* em meliponários e na natureza. Eles verificaram que a diversidade nucleotídica mitocondrial dos genes COI e CytB foi de $\pi = 0.00157$ em meliponários, enquanto $\pi = 0.00968$, seis vezes maior em populações naturais.

Em *M. capixaba*, verificamos que a diversidade genética em colônias de meliponários é de $\pi = 0.00317$ enquanto em colônias naturais $\pi = 0.00402$ (1.2 vezes maior), isso considerando a média de todos os meliponários. Quando estimamos a diversidade nucleotídica em um único meliponário, esta pode ser zero, uma vez que as colônias amostradas possuem o mesmo haplótipo mitocondrial. Em *M. scutellaris* não amostramos colônias naturais para a comparação, mas também verificamos a ocorrência do mesmo haplótipo em todas as colônias amostradas em um mesmo meliponário.

A ausência ou reduzida diversidade genética verificada em um mesmo meliponário é resultante do manejo das colônias. É prática comum os meliponicultores obterem uma ou poucas matrizes e aumentar o número de colônias a partir de divisão. Assim, um meliponário pode ter muitas colônias, porém nenhuma ou reduzida diversidade genética entre as suas colônias. Isso reforça a necessidade de formação de populações conservacionistas e da reintrodução de colônias em áreas de proteção ambiental, orientadas por estimativas de diversidade genética que permitam a representação do máximo de diversidade genética disponível.

Populações de uma mesma espécie podem ser substancialmente diferentes, em termos genéticos, a ponto de ser justificável o seu manejo de

forma independente (Galetti Jr. *et al* 2008). Unidades de Manejo podem ser definidas como populações de uma mesma espécie entre as quais o grau de conectividade é suficientemente baixo (reduzido fluxo gênico) de modo que cada população deve ser monitorada e manejada separadamente (Palsbøll *et al.* 2006).

Há controvérsias quanto à definição de unidades de manejo para a conservação. Moritz (1994) sugere a utilização de marcadores moleculares para a definição de "unidades evolutivamente significativas" - ESU, e estabelece como critérios a reciprocidade monofilética para os haplótipos mitocondriais, isto é, não sobreposição entre as populações, e significativa divergência nas frequências dos *loci* nucleares. Moritz ainda considera uma diferença entre Unidades de Manejo (MU) e ESU, sendo que MU podem ser definidas quando populações apresentam significativa diversidade mitocondrial ou nuclear, independentemente de sua distinção filogenética. Neste caso, ESU se refere a populações com isolamento histórico e MU populações com isolamento recente.

Crandall *et al* (2000) consideram que os critérios para se definir uma população como ESU deve levar em consideração não somente dados genéticos, mas também dados ecológicos e seus significados adaptativos. Tal definição de unidades de manejo está baseada na permutabilidade ecológica ou genética das populações, isto é, na possibilidade de substituir uma população por outra. Se duas populações estão adaptadas a ambientes similares, logo elas são permutáveis, se estão adaptadas a ambientes diferentes não são ecologicamente permutáveis (Frankham *et al*, 2008).

Na prática, a definição de unidades de manejo visa concentrar esforços na conservação de populações avaliando os custos, ou seja, se é mais viável conservar duas populações isoladas e manejá-las separadamente não misturando os indivíduos das duas populações, ou se é mais viável conservar uma população que tenha mais chance de se manter em longo prazo, ou mesmo promovendo o contato entre indivíduos de diferentes populações buscando aumentar a variabilidade local com fonte exógena de variabilidade genética.

Para a população de *M. capixaba*, não parece que o isolamento genético verificado entre os grupos possa ser interpretado de modo a considerar os grupos formados como populações suficientemente isoladas para que sejam consideradas como ESU. Ainda que se verifique a formação de grupos reciprocamente monofiléticos considerando os haplótipos mitocondriais, não há divergência nuclear que indique a ausência de fluxo gênico entre as populações. E considerando questões adaptativas, aparentemente não há diferenças ecológicas entre os ambientes ocupados pelas populações de *M. capixaba*.

Para as populações de *M. scutellaris*, especialmente o grupo 3 e 4 ocorrem geograficamente mais isolado dos outros grupos, no interior do estado da Bahia, em regiões de altitudes mais elevadas. Neste caso, é possível que haja adaptações ecológicas diferenciadas em relação aos demais grupos mais litorâneos. Além disso, apesar da pouca variabilidade genética verificada nas sequências nucleares estudadas, pelo menos uma variante alélica é exclusiva dos grupos 3 e 4, mostrando um possível isolamento destas populações também no genoma nuclear.

Estudos com marcadores microssatélites e ISSR com populações de *M. scutellaris* da Bahia indicam a mesma diferenciação entre grupos do litoral e de regiões de altitude do interior da Bahia (dados não publicados de Mara Garcia Tavares e Ana Maria Waldschmidt).

Uma vez que colônias naturais estão cada vez mais escassas, programas de reintrodução em locais protegidos é uma importante estratégia de conservação destas espécies. Neste ponto, as colônias hoje manejadas em meliponários são importante fonte de variabilidade que podem ser aproveitadas como matrizes para a formação de tais populações de conservação.

Considerando a variabilidade haplotípica observada e a correlação dos haplótipos dentro e entre os grupos de haplótipos formados, diferentes populações de conservação podem ser iniciadas em áreas de preservação permanentes dentro da área de ocorrência natural das espécies.

Para a espécie *M. capixaba*, considerando que (i) não há indícios de ausência de fluxo gênico em relação ao DNA nuclear; (ii) não há razões para considerar diferenças adaptativas entre os dois grupos formados; sugere-se que populações de conservação podem ser formadas agrupando em uma mesma população o máximo da variabilidade disponível em colônias manejadas nos meliponários. Esta população deverá se iniciada com pelo menos 13 colônias, uma representante de cada um dos 13 diferentes haplótipos mitocondriais observados. Um local adequado para a instalação desta população de manejo e manutenção da espécie *M. capixaba* seria o Parque Estadual de Pedra Azul, município de Domingos Martins, Espírito Santo. Outros possíveis locais protegidos de conservação da espécie foram sugeridos no capítulo 1.

Para a espécie *M. scutellaris*, considerando que (i) há pelo menos algum indício de reduzido fluxo gênico tanto mitocondrial como nuclear; (ii) a estruturação mitocondrial observada deve ser resultado de isolamento histórico, (iii) considerando as diferenças ecológicas e possíveis adaptações locais especialmente em relação a grupos do interior e grupos litorâneos; sugere-se que se formem diferentes populações de conservação da espécie *M. scutellaris* considerando, pelo menos, os grupos formados nas análises mitocondriais e a diversidade haplotípica dentro de cada grupo.

Algumas áreas interessantes podem ser citadas como possíveis locais para implantação e manejo de populações para a conservação da espécie *M. scutellaris*. Parque Nacional da Serra de Itabaiana - Sergipe, Área de Proteção Ambiental de Murici - Alagoas e Reserva Biológica de Saltinho - Pernambuco, para haplótipos do Grupo 1. Reserva Biológica Guaribas - Paraíba, para haplótipos do Grupo 2. Parque Nacional da Chapada Diamantina, Bahia, especialmente para haplótipos dos Grupos 3 e 4. Dada a grande extensão da área de ocorrência da espécie *M. scutellaris* se faz necessário um estudo mais detalhado sobre áreas de preservação ambiental permanente com potencial para se implantar populações conservacionistas da espécie bem como locais preservados onde ainda possam ser encontradas colônias nativas da espécie.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A área de ocorrência natural das espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* têm sofrido redução contínua nos últimos anos, reduzindo conseqüentemente o número de colônias na natureza. *M. capixaba* ocorre atualmente em área restrita do Espírito santo, estimadas em menos de 5.000 Km² (capítulo 1 desta Tese). *M. scutellaris*, cuja ocorrência já foi verificada em todo o Nordeste brasileiro (Mariano Filho, 1911 *apud* Carvalho, 2000), parece não mais ocorrer no Rio Grande do Norte, e a distribuição geográfica atual está limitada às regiões litorâneas da Bahia à Paraíba e em regiões mais altas como as chapadas da Bahia e brejos de altitude do Pernambuco e Paraíba. Apesar de ser amplamente criada por meliponicultores em diferentes localidades o número de colônias naturais da *M. scutellaris* parece estar drasticamente reduzido.

O intenso desmatamento da Mata Atlântica tem diminuído e fragmentado as populações naturais dessas abelhas. Além disso, tanto nas regiões de ocorrência geográfica natural como em outras regiões há um crescente interesse pela criação destas abelhas, seja devido à sua beleza, seja devido à exploração comercial de colônias e mel, muitas vezes apreciado por seu sabor diferenciado. Com isso, muitas colônias foram retiradas da natureza nos últimos anos e grande parte das colônias remanescentes se encontra nas mãos de criadores.

É senso comum entre os coletores de abelhas que está cada vez mais difícil encontrar colônias naturais tanto da uruçú nordestina quanto da uruçú capixaba. Por outro lado verifica-se o esforço dos criadores mais experientes e das associações de apicultores e meliponicultores em desestimular a prática de retirada de colônias da mata, difundindo técnicas adequadas de manejo e multiplicação das colônias.

Apesar de a criação racional destas abelhas representar um esforço extremamente válido para a conservação das espécies manejadas, nem sempre a criação é praticada adequadamente, colocando em risco a sobrevivência das colônias em seus criadouros. Além disso, normalmente o estabelecimento de criadouros não é acompanhado de estudos das colônias e

sua variabilidade e viabilidade genética, formando assim populações aparentadas fruto da divisão de colônias, o que aumenta os efeitos da endogamia.

Caliman (2008), por exemplo, considerado o maior criador da abelha *M. capixaba*, relatou sua experiência bem sucedida de criação racional em informe intitulado "Está salva, geneticamente, a *M. capixaba*". Conforme ele declara, sua criação começou com três colônias, chegando a 60 colônias oriundas de divisão. Por isso, apesar de reconhecer o positivo esforço de conservação, temos de discordar do Sr. Caliman em considerar que tal população, com tão restrita fonte de variabilidade possa representar a "salvação" genética da espécie.

O estabelecimento de populações conservacionistas deve favorecer a manutenção das espécies em longo prazo, preservando a variabilidade genética e a viabilidade das espécies. Isso só é possível com estudos a respeito da variabilidade genética existente, priorizando a manutenção de populações com o máximo da diversidade disponível. Além disso, a prática pessoal de criação não pode substituir programas mais amplos e duradouros de conservação que priorizem a manutenção e conservação de colônias em suas regiões geográficas de ocorrência natural e em áreas de preservação permanentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16, 37-48.
- Batalha-Filho H, Waldschmidt AM, Campos LAO, Tavares MG, Fernandes-Salomão TM (2010) Phylogeography and historical demography of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie* 41:534-547.
- Bazin E, Glémin S, Galtier N (2006) Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science*, 312: 570-572.
- Brown Jr. KS, Ab'Sáber AN (1979) Ice-age forest refuges and evolution in the neotropics: correlation of paleoclimatological, geomorphological and pedological data with modern biological endemism. *Paleoclimas*, 5, 1-30.
- Burnham RJ, Graham A (1999) The history of Neotropical vegetation: new developments and status. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 86(2):546-589.
- Cabane GS, d'Horta FM, Sari EHR, Santos FR, Miyaky CY (2008) Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49, 760–773.
- Caliman LFF (2008) Está salva, geneticamente, a *Melipona capixaba*. Mensagem Doce, n 96, APACAME, São Paulo.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C (2009) Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science*, 323, 785-789.
- Carvalho GA (2000) Contribuição à reprodução da *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) e suas consequências. 109p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Genética) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Coates AG, Jackson JB, Collins LS, Cronin TM, Dowsett HJ, Bybell LM, Jung P, Obando JA (1992) Closure of the Isthmus of Panama: The near-shore marine record of Costa Rica and western Panama. *Geol. Soc. Amer. Bull.* 104: 814-828.
- Costa LP (2003) The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *J. Biogeogr.* 30:71-86.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne R (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *TREE*: 15(7):290-295.
- Cristiano MP, Fernandes-Salomão TM, Yotoko KSC (2012) Nuclear mitochondrial DNA: an Achilles' heel of molecular systematics, phylogenetics,

and phylogeographic studies of stingless bees. *Apidologie* DOI: 10.1007/s13592-012-0122-4.

DaSilva MB, Pinto-da-Rocha R (2011) História Biogeográfica da Mata Atlântica: Opiliões (Arachnida) como Modelo para a sua Inferência. in Carvalho CJB, Almeida EAB, org. *Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos*. São Paulo, Roca, 2010. pp.221-238.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8, 175–185.

Ewing B, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8: 186–194.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA data. *Genetics*, 131, 479-491.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinf. Online*, 1, 47-50.

Fernandes-Salomão TM, Rocha RB, Campos LAO, Araújo EF (2005) The first internal transcribed spacer (ITS1) of *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis. *Ins. Soc.*, 52, 11-18.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.

Francisco FO, Arias MC (2010) Inferences of evolutionary and ecological events that influenced the population structure of *Plebeia remota*, a stingless bee from Brazil. *Apidologie*, 41:216-224.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2008) Fundamentos de Genética da Conservação. tradução de Francisco MR e Farias IP. Ribeirão Preto, SP Sociedade Brasileira de Genética. 280p.

Fundação SOS Mata Atlântica, INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (2010) Atlas dos Remanescentes de Mata Atlântica - relatório técnico 2008/2010. Disponível em < <http://mapas.sosma.org.br/dados/>>, acesso em 17/02/2012.

Galetti JR PM, Rodrigues FP, Solé-Cava AM, Miyaki CY, Carvalho D, Eizirik E, Veasey EA, Santos FR, Farias IP, Vianna JA, Oliveira LR, Weber LI, Almeida-Toledo LF, Francisco MT, Redondo RAF, Siciliano S, Del Lama SN, Freitas TRO, HrBek T, Molina WF (2008) Genética da conservação da biodiversidade brasileira. pp 199-229. In: Fundamentos de Genética da Conservação. Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. Ribeirão Preto, SP Sociedade Brasileira de Genética. 280p.

Haffer J (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165, 131–137.

Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Acids Res.*, **22**,4673-4680.

Kerr, W.E. (2002) Extinção de espécies: a grande crise biológica do momento e como afeta os meliponíneos. Anais do V Encontro sobre Abelhas. Ribeirão Preto/SP, p. 4.

Lara-Ruiz P, Chiarello AG, Santos FR (2008) Extreme population divergence and conservation implications for the rare endangered Atlantic Forest sloth, *Bradypus torquatus* (Pilosa: Bradypodidae). *Biological Conservation*, **141**, 1332-1342.

Lavina EL, Fauth G (2011) Evolução geológica da América do Sul nos últimos 250 milhões de anos. in Carvalho CJB, Almeida EAB, org. *Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos*. São Paulo, Roca, 2010. pp.221-238.

Magnus RM, Tripodi AD, Szalanski AL (2011) Mitochondrial DNA diversity of honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) from queen breeders in the united states. *Journal of Apicultural Science*, **55**:5-14

Moritz C (1994) Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Trends Ecol. Evol.* **9**:373-375.

Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, USA.

Nylander, J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Palsbøll PJ, Martine B, Allendorf FW (2006) Identification of management units using population genetic data. *Trends Ecol. Evol.* **22**:12-16.

Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite AN, Morando M, Yassuda YY, Sites Jr. JW (2005) Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, **85**, 13–26.

Posada D, Crandall KA (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14** (9): 817-818

Ramírez SR, Nieh JC, Quental TB, Roubik DW, Imperatriz-Fonseca VL, Pierce NE (2010) A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Mol. Phyl. Evol.* **56**, 519-525.

Resende HC, Yotoko KSC, Delabie JHC, Costa MA, Campiolo S, Tavares M, Campos LAO, Fernandes-Salomão (2010) Pliocene and Pleistocene events shaping the genetic diversity within the central corridor of the Brazilian Atlantic Forest. *Biol. J. Linn. Soc.* **101**:949-960.

Ronquist F, Teslenko M, Mark P van der, Ayres D, Darling A, Hohna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian

phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, doi: 10.1093/sysbio/sys029.

Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 2496-2497.

Solorzano CD, Szalanski AL, Kence M, Mckern JA, Austin JW, Kence A (2009) Phylogeography and population genetics of honey bees (*Apis mellifera*) from Turkey based on COI-COII sequence data. *Sociobiology*, **53**:237-246.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.

Taylor BL, Dizon AE (1999) First policy then science: why a management unit based solely on genetic criteria cannot work. *Mol.Ecol.* 8, S11–S16.

Vanzolini PE, WILLIAMS EE (1970) South American anoles: Geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia* **19**: 1-298.

Wright S (1921) Systems of mating. *Genetics* **6**:111-178.

CAPÍTULO 3. NOVO REGISTRO DE HIBRIDAÇÃO ENTRE AS ABELHAS *Melipona capixaba* e *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae)

1. RESUMO

Apresentamos um novo registro de hibridação entre as abelhas brasileiras sem ferrão *Melipona capixaba* e *M. scutellaris*. Uma possível colônia híbrida foi observada no estado de São Paulo, sudeste brasileiro, fora da área de ocorrência das duas espécies. Foram realizadas comparações morfológicas e análises de DNA por sequenciamento parcial dos genes mitocondrial CO1 e nuclear EF1alfa. Os resultados confirmaram a hibridação entre as espécies, indicando que um macho de *M. scutellaris* cruzou com uma rainha de *M. capixaba*. Híbridos de segunda geração foram observados, possivelmente pelo cruzamento entre fêmeas híbridas e machos de *M. scutellaris*, indicando que as fêmeas híbridas são férteis. A hibridação das espécies pode representar um fator de risco a mais para a conservação de populações da *M. capixaba*, espécie ameaçada de extinção.

2. INTRODUÇÃO

A hibridação interespecífica tem sido considerada como um importante mecanismo evolutivo tanto em plantas como em animais (Arnold, 2006). Especialmente em plantas, diferentes casos de especiação por hibridação já foram bem documentados. Tal processo geralmente ocorre com o desenvolvimento de isolamento reprodutivo em simpatria e a especiação por hibridação natural parece ser promovida por evolução cromossômica rápida e disponibilidade de habitat adequado para o híbrido (Rieserberg, 1997).

Se por um lado a hibridação natural ocorre como um mecanismo evolutivo de especiação simpátrica, a hibridação entre espécies alopátricas devido à introdução de espécies exóticas tem sido vista como um potencial risco à manutenção das espécies locais, especialmente nos casos em que envolvem hibridação entre espécies raras e espécies mais amplamente distribuídas. Levin *et al.* (2002) sugerem que a hibridação é uma ameaça crescente e fator de extinção de espécies raras devido à perturbação de barreiras ecológicas por atividades humanas com consequente introdução de espécies congêneras abundantes nos locais de endemismo.

Melipona (Michmelia) capixaba Moure & Camargo (1994), popularmente conhecida como uruçú-preta ou uruçú capixaba, foi incluída como “espécie vulnerável” na Lista de Espécies Ameaçadas de Extinção editada pelo IBAMA em 2003. Nossos dados indicam a sua ocorrência restrita a uma área estimada menor que 5.000 Km² no estado do Espírito Santo, em áreas de Mata Atlântica - Floresta Ombrófila Densa tipo Montana, entre altitudes de 800 e 1200 metros (veja Capítulo 1)

Melipona (Michmelia) scutellaris Latreille, 1811, a uruçú-verdadeira ou uruçú-do-nordeste, originalmente distribuía-se desde a Amazônia até o estado da Bahia (Mariano Filho, 1911 *apud* Carvalho, 2000). No entanto, é possível que colônias de *M. scutellaris* não sejam mais encontradas naturalmente no Rio Grande do Norte, e a distribuição geográfica atual está limitada às regiões litorâneas do nordeste brasileiro, da Bahia à Paraíba e também em regiões mais altas como as chapadas da Bahia e brejos de altitude do Pernambuco e Paraíba.

As duas espécies ocorrem de forma alopátrica em áreas de Mata Atlântica, separadas por mais de 500 km de distância, não havendo zona de contato e, conseqüentemente, não havendo oportunidade de ocorrer hibridação na natureza.

O primeiro e, até então, único registro de ocorrência de hibridação entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* foi relatado por Nascimento *et al.* (2000) tendo ocorrido entre colônias experimentais mantidas em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, fora do local de ocorrência natural de ambas as espécies. O fato foi suspeitado quando operárias de uma das colônias de *M. capixaba* apresentaram listras abdominais brancas semelhantes às encontradas em *M. scutellaris*, em oposição ao abdômen preto brilhante típico de *M. capixaba*. Os autores confirmaram a hibridação comparando os perfis de migração eletroforética de esterases das duas espécies e da colônia suspeita de hibridação e verificaram que a colônia híbrida apresentava perfil eletroforético intermediário entre as espécies.

Um novo caso suspeito de hibridação nos foi informado quando duas colônias de *M. capixaba* foram adquiridas por um criador de abelhas do estado de São Paulo, Brasil. As colônias foram levadas para seu meliponário onde já se encontravam colônias de *M. scutellaris*. Conforme relatado pelo meliponicultor, uma das rainhas morreu durante o transporte das colônias e, após formar uma nova rainha, as operárias nascentes filhas desta nova rainha apresentaram faixas abdominais brancas típicas de *M. scutellaris*. Ao verificar o fato, o meliponicultor sacrificou a rainha da colônia supostamente híbrida na tentativa de recuperar a colônia de *M. capixaba* e uma nova rainha foi formada.

Quando tivemos acesso à colônia, verificamos que todas as operárias apresentavam faixas abdominais brancas e, portanto, não havia operárias morfologicamente típicas de *M. capixaba*. As abelhas variavam no padrão de coloração dos pelos. Algumas operárias, aparentemente mais velhas, apresentavam pilosidade preta e fulvo-clara no mesossoma, característica de *M. capixaba*, apesar das faixas abdominais brancas típicas de *M. scutellaris*. Também observamos abelhas mais jovens com a coloração dos pelos do mesossoma predominantemente fulvo-arruivada e faixas abdominais brancas, padrão de *M. scutellaris* (Figura 1).



Figura 1. Morfologia comparada de operárias das abelhas sem ferrão *Melipona capixaba* (a-d), *M. scutellaris* (e-h) e de operárias da colônia híbrida (i-l). a/e/i apresentam o padrão geral das abelhas; b/f/j apresentam detalhes da pilosidade do mesonoto; c/g/k apresentam detalhes das faixas pré-marginais dos tergos metassomáticos; d/h/l apresentam detalhes da pilosidade e da pigmentação do integumento do mesonoto e do escutelo.

Duas hipóteses foram levantadas com a suspeita de hibridação:

Hipótese1 - a hibridação ocorreu entre as duas espécies sendo que as operárias mais velhas observadas eram híbridas de primeira geração (prole de um cruzamento entre *M. capixaba* e *M. scutellaris*) e as operárias mais jovens eram híbridas de segunda geração (prole de um cruzamento entre rainha híbrida F1 e macho de *M. scutellaris*).

Hipótese 2 - as operárias com pilosidade padrão de *M. capixaba* e faixas abdominais brancas (operárias mais velhas) eram filhas da rainha que supostamente hibridizou e, as operárias com pilosidade fulvo-arruivadas e faixas abdominais brancas (operárias mais jovens) eram abelhas de *M. scutellaris* puras, sugerindo uma possível invasão da colônia por uma rainha de *M. scutellaris*.

Wenseleers *et al.* (2010) demonstraram o parasitismo social em *M. scutellaris*, fornecendo evidências genéticas de que após a perda de uma rainha-mãe, colônias órfãs são invadidas por rainhas independentes que voam nas proximidades a partir de colmeias não relacionadas. Em se confirmando a hipótese 2, teríamos um caso relatado de parasitismo social interespecífico de rainhas de *M. scutellaris* invadindo colônias órfãs de *M. capixaba*.

Para testar as hipóteses levantadas nós comparamos a morfologia externa de operárias de *M. capixaba* e *M. scutellaris* coletadas em áreas de ocorrência natural com as operárias da colônia supostamente híbrida e também comparamos o DNA mitocondrial e nuclear dessas abelhas através de sequenciamento parcial dos genes mitocondrial CO1 e nuclear EF1alfa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico.

Amostras de operárias das espécies *M. capixaba*, *M. scutellaris* e da colônia supostamente híbrida foram coletadas no estado de São Paulo, sendo parte da amostra conservada em álcool absoluto para extração de DNA e parte da amostra sacrificada em câmara mortífera com acetato de etila para fixação. Os testemunhos foram depositados na coleção de abelhas do Museu de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa e os materiais conservados em álcool foram depositados no Laboratório de Biologia Molecular de Insetos do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa. Também foram utilizadas operárias de *M. capixaba* coletadas no estado do Espírito Santo e *M. scutellaris* coletadas nos estados da Bahia, Pernambuco, Sergipe e Paraíba, áreas de ocorrência natural das espécies.

3.2. Dados morfológicos e moleculares

As comparações morfológicas foram realizadas com auxílio de estereomicroscópio.

Para a extração de DNA, operárias de cada espécie e da colônia híbrida foram submetidas individualmente ao protocolo de extração descrito por Fernandes-Salomão *et al.* (2005). Para avaliar a herança dos genes maternos foram amplificados fragmentos do gene Citocromo Oxidase 1 (CO1) utilizando os primers 5'- TATCWACHAATCATAAAAATMTTGG-3', 5'-TAAACT TCWGGATGWCCAAAAAATCA-3' modificados a partir de Folmer *et al.* (1994) e 5'-ATAATTTTTTTTATAGTTATAC-3', 5'-GGAAAAAAGTTATATTAACWC-3' (Ramírez *et al.*, 2010). Para estudar a herança dos genes paternos foram amplificados fragmentos do gene nuclear EF1alfa com os primers 5'-GGGYAAAGGWTCTTCAARTATGC-3' e 5'-AATCAGCACCTTTAGGTGG-3' (Ramírez *et al.*, 2010). As condições de PCR consistiram em um passo inicial de desnaturação de 5min a 94°C, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 49°C a 52°C por 1min para anelamento dos primers, 72°C por 1min e 30s para extensão, com passo final de extensão a 72°C por 5 min. As reações foram conduzidas em placas de 96 poços, cada poço com volume final de 50 µl de PCR mix contendo

50ng/tubo de DNA total, 1X de tampão de reação, 1.5mM de $MgCl_2$, 200 μM da mistura de dNTPs, 0.3 μM da mistura de primers e 1u de Platinum® Taq DNA Polymerase.

As sequências foram obtidas pela empresa Macrogen Inc. Seul, Coréia, em sequenciador automático a partir do produto PCR purificado. Todas as sequências foram analisadas e editadas visualmente e as sequências consenso obtidas com auxílio do pacote phredPhrap/Consed (Ewing *et al.*, 1998; Ewing & Green, 1998). As sequências editadas foram inicialmente alinhadas usando ClustalW (Higgins *et al.*, 1994) com auxílio do MEGA versão 5 (Tamura *et al.* 2011)

3.3. Análises de similaridade

A partir do alinhamento das sequências de CO1 um dendrograma de similaridade foi construído utilizando o algoritmo UPGMA (Sneath e Sokal, 1973; Nei e Kumar, 2000). O algoritmo UPGMA é um método de distância para construção de topologias que se baseia em similaridade total e por isso foi utilizado para comparar a similaridade entre as sequências das amostras da colônia supostamente híbrida e as amostras das espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*. Métodos de Neighbor-Joining e Máxima Verossimilhança também foram aplicados, mas como os resultados foram coincidentes com UPGMA não foram apresentados. As análises foram conduzidas utilizando o MEGA versão 5 (Tamura *et al.* 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Comparações morfológicas

Morfológicamente as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* podem ser facilmente diferenciadas pela cor dos pelos abundantes no mesonoto e pela presença/ausência de faixas abdominais brancas (Figura 1a e 1e). Moure e Camargo (1994) distinguem *M. capixaba* e *M. scutellaris* pelo integumento do mesonoto muito liso e brilhante em *M. capixaba* e mate micro-ruguloso em *M. scutellaris*. Além disso, pela presença de pelos fuscos do mesonoto (Fig. 1b) e pelas faixas pré-marginais dos tergos metassomáticos quase nulas em *M. capixaba* (Fig. 1c), sendo que *M. scutellaris* apresenta pelos do mesonoto fulvo-arruivados (Fig. 1f) e as faixas pré-marginais dos tergos são largas, brancas e contrastantes (Fig. 1g).

As operárias da colônia supostamente híbrida (Fig. 1i) apresentam características em parte de *M. capixaba* e em parte de *M. scutellaris*. Em relação à cor dos pelos do mesonoto (Fig. 1j) apresentam tanto pelos fuscos quanto pelos fulvo-arruivados. Tal característica é bastante notória na cor dos pelos do escutelo que em *M. capixaba* são pretos (Fig. 1d), em *M. scutellaris* são fulvo-arruivados (Fig. 1h) e as operárias da colônia supostamente híbrida apresentam no escutelo uma mistura de pelos de cor preta e fulvo-arruivada (Fig. 1l). Além disso, a pigmentação do integumento do escutelo é marrom em *M. capixaba* e nas operárias da colônia suspeita de hibridação, sendo que em *M. scutellaris*. a pigmentação do integumento do escutelo é esbranquiçada (Fig. 1 d,h,l)

A característica mais sugestiva de hibridação é a presença de faixas abdominais nos tergos metassomáticos em operárias nascentes de uma colônia de *M. capixaba*. A exemplo do que relataram Nascimento *et al.* (2000), operárias suspeitas de hibridação perderam a característica típica de *M. capixaba* de um metassoma quase que completamente negro (Fig. 1c) e apresentam faixas pré-marginais dos tergos metassomáticos brancos e contrastantes típicas de *M. scutellaris* (Fig. 1k).

4.2. Evidências moleculares - DNA mitocondrial

Os dados moleculares em conjunto com as comparações morfológicas confirmam a hibridação das espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*. Foram obtidos 1180pb do gene mitocondrial CO1. Das 13 operárias genotipadas da colônia suspeita de hibridação todas apresentaram haplótipo mitocondrial que se agrupa exclusivamente com *M. capixaba* nas análises realizadas.

O dendrograma de similaridade UPGMA (Fig. 2) separa *M. capixaba* e *M. scutellaris* em dois agrupamentos bem sustentados por altos valores de *bootstrap*. As operárias da colônia híbrida, apesar de apresentarem faixas terciais brancas típicas de *scutellaris* possuem DNA mitocondrial exclusivo de *M. capixaba*. O haplótipo mitocondrial da colônia híbrida é idêntico ao haplótipo mitocondrial de *M. capixaba* encontrado em dois locais diferentes em áreas de ocorrência natural da espécie.

Uma vez que todas as operárias amostradas da colônia híbrida apresentaram o mesmo haplótipo mitocondrial deduz-se que as operárias são filhas de uma mesma rainha ou filhas de rainhas diferentes de uma mesma linhagem materna. Sendo assim, a hipótese de invasão de colônia por uma rainha de *M. scutellaris* para explicar a ocorrência de operárias com faixas terciais brancas (hipótese 2) foi descartada e as operárias observadas devem ser híbridos de primeira e/ou de segunda geração de hibridação (hipótese 1).

Considerando que a linhagem materna das operárias híbridas é de *M. capixaba*, comprovada pelo haplótipo mitocondrial do gene CO1, deduz-se que a hibridação ocorreu com o cruzamento de uma rainha virgem de *M. capixaba* com um macho de *M. scutellaris*.

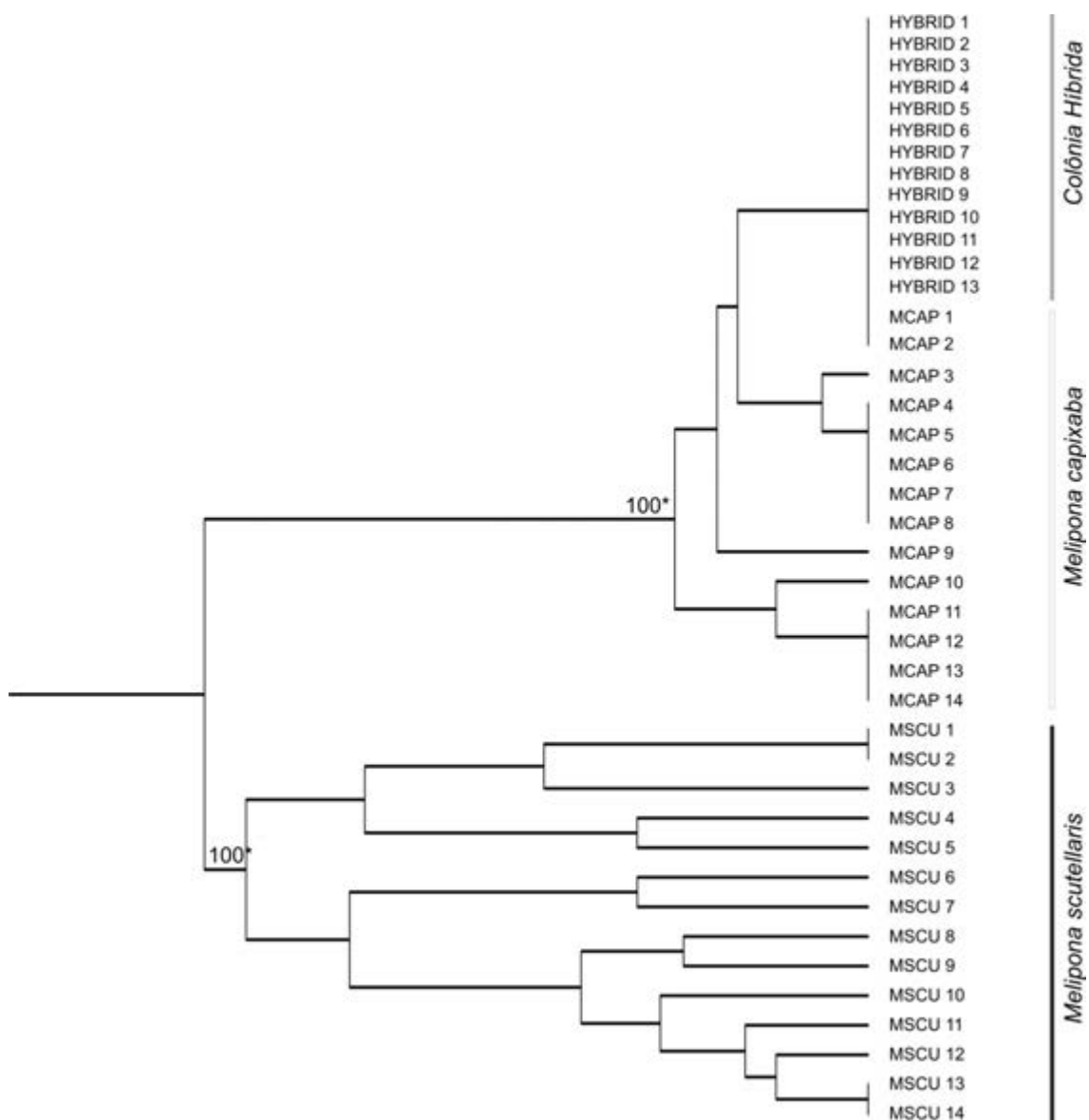


Figura 2. Dendrograma de similaridade obtido por UPGMA com base em alinhamento de 1180pb do gene mitocondrial CO1 de operárias das espécies *M. capixaba* (MCAP), *M. scutellaris* (MSCU) e da colônia híbrida (HYBRID). OTUs unidas por uma mesma linha vertical nos nós terminais do dendrograma representam um único haplótipo mitocondrial. *Os números se referem à porcentagem de bootstrap com 1000 replicações.

4.3. Evidências moleculares - DNA nuclear

Os dados moleculares obtidos com o sequenciamento parcial do gene nuclear EF1alfa também confirmam a hibridação entre uma fêmea de *M. capixaba* e um macho de *M. scutellaris*. Foram obtidos 900pb do gene nuclear EF1alfa. O gene é bastante conservado sendo que dos 900 sítios apenas dois se apresentam variáveis entre as espécies havendo assim um alelo único em *M. capixaba*, não polimórfico, e outro alelo único em *M. scutellaris*, não polimórfico para os indivíduos amostrados.

Apenas dois sítios diferentes entre as espécies foram detectados na posição 485 e 851, em referência aos 900pb de base obtidos neste estudo para o gene EF1alfa. *M. capixaba* apresenta a base Guanina (G) na posição 485 e a base Adenina (A) na posição 851(Fig. 3a). *M. scutellaris* apresenta o nucleotídeo Adenina na posição 485 e Guanina na posição 851(Fig. 3b). As operárias da colônia híbrida apresentam os dois alelos, tanto de *M. capixaba* quanto de *M. scutellaris*, sendo que os alelos EF1alfa se apresentam tanto heterozigoto como homozigoto nas operárias híbridas (Fig. 3c e 3d).

As operárias híbridas amostradas podem ser agrupadas em pelo menos duas classes distintas em relação à cor dos pelos do mesonoto. Das 13 operárias híbridas genotipadas, cinco operárias, aparentemente mais velhas na colônia, apresentavam morfologia híbrida com pelos do mesonoto mais escuros, típicos de *M. capixaba* (Classe I). As demais oito amostras, aparentemente mais jovens, apresentavam pelos do mesonoto predominantemente fulvo-arruivados, se aproximando mais das características de *M. scutellaris* (Classe II). A hipótese de substituição da rainha de *M. capixaba* por uma rainha de *scutellaris* foi descartada porque todas as operárias híbridas, de ambas as classes, apresentaram haplótipo mitocondrial de *M. capixaba*. A hipótese alternativa é que as operárias da classe I (heterozigotas para os alelos EF1alpha) sejam híbridas de primeira geração de hibridação e as operárias da classe II (algumas das quais homozigotas para os alelos EF1alpha) sejam híbridas de segunda geração.

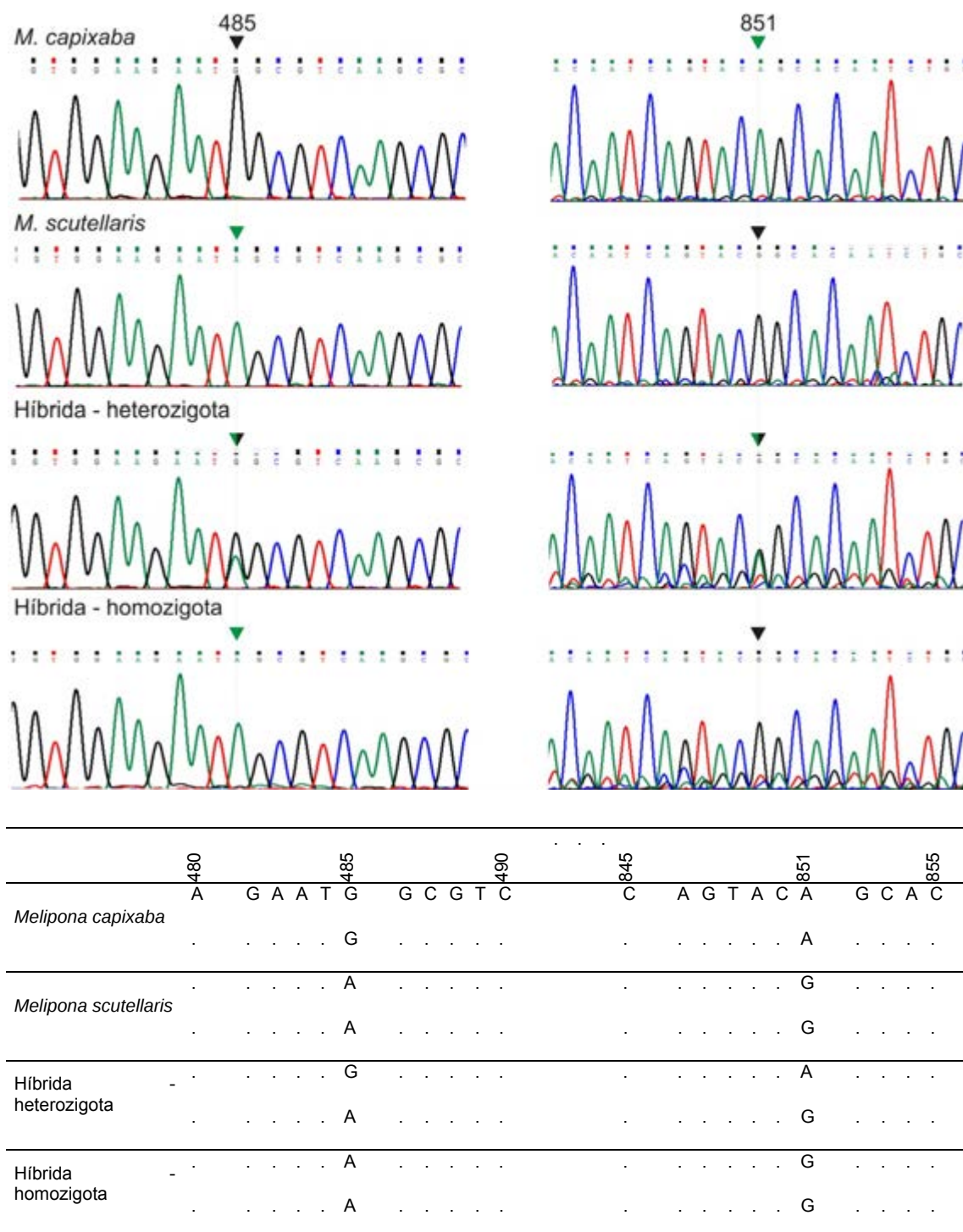


Figura 3. Parte do cromatograma do gene nuclear EF1alfa das espécies *M. capixaba* (a), *M. scutellaris* (b) e da colônia híbrida (c,d) mostrando as duas regiões de sítios variáveis entre as espécies, nas posições 485 e 851. As setas indicam o sítio variável e a cor das setas a base nitrogenada referente (verde=Adenina e preta=Guanina).

Uma vez que *M. capixaba* e *M. scutellaris* apresentam alelos únicos e exclusivos de cada espécie, a F1 resultante do cruzamento de uma fêmea de *M. capixaba* com um macho de *M. scutellaris* resulta em prole híbrida heterozigota para o gene nuclear EF1alfa, como confirmam os nossos dados. Todas as operárias da classe I apresentam-se heterozigotas para o *locus* EF1alfa. Uma segunda geração de hibridação, desta vez com uma rainha híbrida filha da primeira geração de hibridação com um macho de *M. scutellaris*, resultaria em uma F2 em média com 50% da prole homozigota e 50% da prole heterozigota para esse *locus*, segundo proporções mendelianas (Fig. 4).

Pelo menos uma operária da classe II apresentou o *locus* EF1alfa em homozigose com alelo de *M. scutellaris* e DNA mitocondrial de *M. capixaba*, o que se espera somente a partir de um cruzamento entre um macho de *M. scutellaris* e uma rainha híbrida F1. Sendo assim deduz-se que a hibridação ocorreu e, com o sacrifício da rainha havia cruzado com macho de *M. scutellaris*, uma nova rainha se formou na colônia híbrida. Essa rainha híbrida, F1 da hibridação, cruzou com um macho de *M. scutellaris*, gerando uma prole F2 de hibridação (Fig. 4).

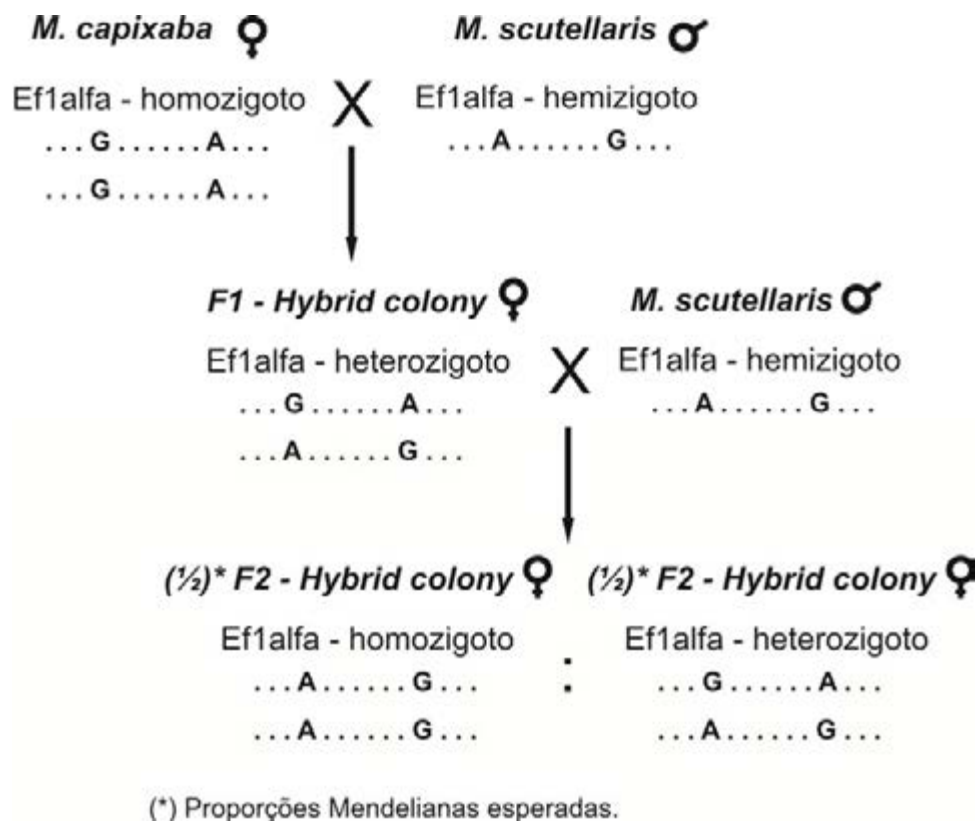


Figura 4. Esquema do possível cruzamento entre machos de *M. scutellaris* hemizogotos para o gene nuclear EF1alfa, fêmeas de *M. capixaba* e fêmeas híbridas que explica os resultados observados. As bases G e A se referem aos sítios variáveis nas posições 485 e 581 detalhados na Figura 3 em seus respectivos cromossomos diploides nas fêmeas e haploides nos machos.

4.4. Consequências para a conservação de *M. capixaba*.

M. capixaba é a única espécie de abelha social da fauna brasileira considerada como ameaçada de extinção. A população remanescente está restrita a uma pequena área montanhosa de clima frio da mata atlântica do estado do Espírito Santo. A redução da população devido à degradação do seu habitat natural e a utilização não sustentável das colônias dessas abelhas são consideradas as principais ameaças à sobrevivência da espécie. Não há até o momento nenhum programa efetivo de preservação da *M. capixaba*. O fato novamente confirmado da hibridação entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* acrescenta mais um fator de risco à manutenção da espécie ameaçada *M. capixaba*.

Não há nenhum relato de hibridação nas áreas de ocorrência natural, ou que uma espécie tenha sido introduzida da área de ocorrência natural da outra. No entanto, se a hibridação ocorreu em duas situações em que as espécies foram colocadas em um mesmo local, ambos os casos poucos meses após serem colocadas juntas, não há porque duvidar que a hibridação também ocorrerá na natureza, caso colônias de *M. scutellaris* sejam introduzidas na área de ocorrência de *M. capixaba* ou vice-versa. O interesse em colecionar diferentes abelhas sem ferrão em meliponários particulares é bastante difundido no Brasil. No entanto, a presença de *M. scutellaris* em áreas de ocorrência natural de *M. capixaba* pode ter consequências imprevisíveis para a sobrevivência da espécie.

Barton (2001) argumenta que a hibridação pode influenciar a evolução das espécies em diferentes caminhos. Se os híbridos são menos aptos que seus parentais, a distribuição geográfica das populações pode ser limitada com reforço do isolamento reprodutivo pré-zigótico; mas se alguns genótipos híbridos são mais aptos do que um ou ambos os pais, poderá haver a substituição de uma ou de ambas as espécies parentais pelo híbrido.

Pelo menos para a evolução das plantas, a hibridação tem sido considerada como tendo um papel criativo na evolução de adaptações e especiação (Rieseberg, 1997; Arnould, 2006). Por outro lado, dados de simulação de hibridação entre espécies nativas e invasoras de plantas

sugerem que a hibridação é talvez o mais rápido fator de extinção de espécies nativas ameaçadas, com a extinção ocorrendo em menos que cinco gerações, segundo os dados simulados (Wolf, 2001). Segundo estes autores, o estabelecimento de zonas híbridas só foi possível quando a diferenciação de habitat foi incluída no modelo. Quando não há diferenciação de habitat espera-se a substituição dos táxons ou por uma das espécies parentais ou pelos híbridos.

No Brasil temos pelo menos um caso bastante conhecido de hibridação entre as abelhas introduzidas *Apis mellifera* europeia e africana, gerando a hoje amplamente distribuída abelha melífera africanizada. Os genótipos híbridos se mostraram mais aptos que os genótipos genitores com substituição total das linhagens originais pela linhagem híbrida. Neste caso, não temos um cruzamento interespecífico, mas entre subespécies.

Não é possível prever se os híbridos *M. capixaba*/*M. scutellaris* se apresentarão como genótipos mais ou menos aptos que os genótipos parentais, e em quais ambientes a adaptação ocorreria. Mas é possível argumentar que em qualquer situação a hibridação não deverá ser favorável à espécie *M. capixaba*. Uma vez que os machos de *M. scutellaris* são capazes de cruzar com rainhas de *M. capixaba*, uma única colônia de *scutellaris* introduzida em área de ocorrência natural de *capixaba* é capaz de produzir centenas de machos anualmente, cada indivíduo com potencial de hibridizar com uma rainha de *M. capixaba*, dando origem a colônias híbridas.

Além disso, Wenseleers *et al.* (2010) demonstraram o parasitismo social na espécie *M. scutellaris*, onde rainhas virgens de colônias não aparentadas invadem colônias órfãs, estabelecendo-se como nova rainha da colônia. Isso demonstra que *M. scutellaris* pode fundar uma nova colônia infiltrando-se em colônias alheias. Estes autores argumentam que as razões para a ocorrência deste parasitismo social pode estar ligado ao fato de que em *Melipona* há produção em excesso de novas rainhas, 5 a 25% da cria (Kerr, 1950; Santos-Filho *et al.*, 2006). Apesar de não termos observado invasão da colônia neste estudo, não podemos descartar a hipótese de que colônias introduzidas em

áreas de ocorrência de *M. capixaba* pode oferecer oportunidade para que o parasitismo social ocorra também entre as espécies.

Mesmo considerando a hipótese de que os híbridos sejam menos aptos, uma única colônia de *M. capixaba* que for substituída por uma linhagem híbrida é menos uma colônia de uma espécie já ameaçada de extinção devido ao seu reduzido número populacional. Em sendo os híbridos mais aptos, a não ser que estes ocupem uma zona ecológica diferente da espécie *M. capixaba* com o estabelecimento de uma zona de hibridação, a competição poderá levar à extinção da espécie com substituição total por seus descendentes híbridos caso estes ocupem o mesmo nicho que a espécie parental. Sendo assim, programas de preservação da espécie devem levar em consideração esses fatos, impedindo que colônias de *M. scutellaris* sejam introduzidas na área de ocorrência natural de *M. capixaba*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnold ML (2006) *Evolution through genetic exchange*. Oxford University Press, New York. 252p.
- Barton NH (2001) The role of hybridization in evolution. *Mol. Ecol.* **10**: 551-568.
- Carvalho GA (2000) Contribuição à reprodução da *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) e suas consequências. 109p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Genética) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* **8**:175–185.
- Ewing B, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* **8**: 186–194.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **3**: 294-297.
- Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Kerr WE (1950) Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. *Genetics* **35**:143–152
- Kerr WE (2002) Extinção de espécies: a grande crise biológica do momento e como afeta os meliponíneos. Anais do V Encontro sobre Abelhas. Ribeirão Preto/SP, p. 4.
- Levin DA, Francisco-Ortega J, Jansen RK (2002) Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conserv. Biol.* **10**(1):10-16
- Moure JS, Camargo JMF (1994) *Melipona (Michmelia) capixaba*, uma nova espécie de Meliponinae (Hymenoptera, apidae) do sudestes do Brasil. *Rev. Bras. Zool.* **11**(2): 289-296.
- Melo GAR (1996) Notes on the nesting biology of *Melipona capixaba* (Hymenoptera, Apidae). *J. Kans. Entomol. Soc.* **69**:207-210.
- Nascimento VA, Matusita SH, Kerr WE (2000) Evidence of hybridization between two species of *Melipona* bees. *Gen. Mol. Biol.* **23**(1): 79-81.
- Nei M, Kumar S (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Ramírez SR, Nieh JC, Quental TB, Roubik DW, Imperatriz-Fonseca VL, Pierce NE (2010) A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Mol. Phylog. Evol.* **56**: 519-525.

Santos-Filho, PS, Alves DA, Eterovic A, Imperatriz-Fonseca VL, Kleinert AMP (2006) Numerical investment in sex and caste by stingless bees (Apidae: Meliponini): a comparative analysis. *Apidologie* **37**:207–221.

Sneath PHA, Sokal RR (1973) *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman, San Francisco.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 2731-2739.

Wenseleers T, Alves DA, Franco TM, Billen J, Imperatriz-Fonseca VL (2010). Intraspecific queen parasitism in a highly eusocial bee. *Biol. Lett.* doi: 10.1098/rsbl.2010.0819

Wolf DE, Takebayashi N, Rieseberg LH (2001) Predicting the risk of extinction through hybridization. *Conserv. Biol.* **15**(4): 1039-1053.

CAPÍTULO 4. História biogeográfica do gênero *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera:Apidae): expansão e vicariância na América do Sul e América Central.

1. RESUMO

O gênero *Melipona* Illiger, 1806, reúne 69 espécies com distribuição exclusivamente Neotropical ocorrendo desde o México até Missiones na Argentina. Estas abelhas ocuparam praticamente todos os ambientes da América do Sul, incluindo a Amazônia, o Cerrado, a Caatinga, a Mata Atlântica, e também a América Central. Os processos históricos que determinaram o atual padrão de distribuição geográfica dos táxons ainda não foram discutidos. Apresentamos um esboço sobre a história biogeográfica do gênero *Melipona*, baseada em hipótese filogenética reconstruída a partir de genes mitocondrial e nucleares, como um esforço inicial para o entendimento da evolução do grupo. A árvore filogenética apresentada recupera o monofiletismo do gênero *Melipona* e de três dos quatro subgêneros (*Michmelia*, *Melikerria* e *Melipona*). O subgênero *Eomelipona* mostra-se polifilético. Considerando as relações filogenéticas entre os clados e o ambiente onde as espécies estão distribuídas verifica-se uma complexa relação entre os diferentes ambientes. Dois padrões mais ou menos gerais foram percebidos. O primeiro é que espécies filogeneticamente próximas ocupam o mesmo ambiente e as relações entre as espécies aparentadas de um mesmo ambiente são geralmente mais recentes. O segundo é que um mesmo ambiente é ocupado por espécies filogeneticamente distantes, isto porque espécies de linhagens ancestrais diferentes ocuparam o mesmo espaço geográfico e as relações entre espécies não aparentadas de um mesmo ambiente são geralmente mais antigas. O ancestral comum mais recente para o gênero *Melipona* foi datado em ~16 Maa e para os subgêneros entre ~9-10 Maa. Processos biogeográficos de expansão e vicariância determinaram as relações filogenéticas e o atual padrão de distribuição geográfica das espécies.

2. INTRODUÇÃO

No Brasil, o principal grupo de abelhas sociais nativas são as pertencentes à tribo Meliponini, popularmente conhecidas como “abelhas indígenas sem ferrão” (Kerr *et al.*, 1996; Velthuis, 1997). Estas abelhas desempenham papel chave na manutenção da biodiversidade, já que constituem o principal grupo de polinizadores em diversos ecossistemas, sendo importantes para a reprodução e fluxo gênico das populações de muitas espécies vegetais nativas. Em Meliponini destaca-se como o maior gênero em número de espécie *Melipona* Illiger, 1806, com distribuição exclusivamente Neotropical ocorrendo desde o México até Missiones na Argentina (Camargo e Pedro, 2007; Michener, 2007; Silveira *et al.*, 2002).

A primeira chave taxonômica para o gênero *Melipona* foi apresentada por Schwarz (1932) que elaborou a sua classificação baseada em caracteres morfológicos. Kerr *et al.* (1967), por meio de taxonomia numérica, propuseram que as espécies deveriam ser agrupadas em pelo menos dois subgêneros distintos: *Melipona* (*Melipona*) e *Melipona* (*Micheneria*). Este último foi modificado para *Melipona* (*Michmelia*) por Moure (1975) devido à existência de *Micheneria* Orfila, 1956 na ordem Lepidoptera. Moure (1992) revisou os grupos de *Melipona* propostos por Schwarz (1932) e por Kerr *et al.* (1967) propondo a divisão do gênero em quatro subgêneros: *Melipona* (*Eomelipona*), *Melipona* (*Melikerria*), *Melipona* (*Michmelia*) e *Melipona* (*Melipona*). Entretanto, Michener (2007) não reconhece os subgêneros devido à semelhança morfológica dos grupos.

A classificação em subgêneros com base em caracteres morfológicos tem sido confirmada, pelo menos em parte, por recentes filogenias moleculares. Rasmussen e Cameron (2010) apresentaram um filogenia molecular para a tribo Meliponini, incluindo representantes de todo o mundo. Tal filogenia incluiu representantes de 18 espécies do gênero *Melipona*, confirmando o monofiletismo do grupo, bem como o monofiletismo em três dos subgêneros propostos com base em caracteres morfológicos (*Melipona*, *Melikerria* e *Michmelia*). A exceção foi o subgênero *Melipona* (*Eomelipona*) que

mostrou-se polifilético. A datação feita por aqueles autores sugere a origem do gênero no Mioceno (24 milhões de anos antes do presente).

Ramírez *et al.* (2010) apresentaram uma nova filogenia molecular focando o gênero *Melipona*, com 51 indivíduos representantes de 35 espécies. Estes autores também confirmaram a monofilia do gênero e dos três subgêneros (*Melipona*, *Melikerria* e *Michmelia*). *Eomelipona* também aparece como subgênero polifilético e o ancestral comum mais recente para o gênero foi datado também no Mioceno, mas entre 14-17 milhões de anos.

Camargo e Pedro (2007) reconhece 69 nomes específicos aceitos para os quatro subgêneros. O subgênero *Melipona* (*Eomelipona*) reúne 15 espécies com distribuição desde a região amazônica até Misiones na Argentina. A distribuição do subgênero *Melipona* (*Melikerria*) abrange toda a região neotropical, desde o sul do México até o norte da Argentina, sendo reconhecidas oito espécies neste grupo. O subgênero *Melipona* (*Melipona*) distribui-se desde a Península Yucatan no México até o noroeste da Argentina e reúne 13 espécies. O subgênero *Melipona* (*Michmelia*) distribui-se desde o sul do México até o litoral do estado de Santa Catarina no Brasil e reúne 33 espécies reconhecidas.

A distribuição geográfica ocorre de tal forma que, geralmente, uma espécie é encontrada exclusivamente em determinado ambiente, mostrando uma adaptação às condições locais. Tal é o caso de *M. (Michmelia) capixaba*, endêmica da Mata Atlântica, *M. (Melikerria) quinquefasciata* endêmica de formações abertas secas (Cerrado, Caatinga), *M. eburnea*, endêmica da Floresta Amazônica e espécies exclusivas da América Central, tais como *M. (Melikerria) beecheii* e *M. (Michmelia) costaricensis*, apenas para citar alguns exemplos. Em outros casos, *M. flavolienata* pode ser encontrada tanto em regiões amazônicas como no Cerrado.

A filogenia apresentada para o gênero por Ramírez *et al.* (2010) revela aspectos interessantes sobre as relações filogenéticas entre as espécies e os ambientes que elas ocupam. *M. scutellaris*, por exemplo, é filogeneticamente mais próxima da apifauna amazônica e da América Central do que com abelhas que ocorrem em simpatria com esta, tal como *M. quadrifasciata*. Isso

deve ocorrer também para outras espécies uma vez que grupos monofiléticos da árvore de *Melipona* reúnem espécies que ocorrem de forma isolada em diferentes ambientes. No entanto, Ramírez *et al.* (2010) não fizeram considerações acerca da história biogeográfica do gênero, limitando seu trabalho em descrever as relações filogenéticas entre os clados. Assim, o atual padrão de distribuição geográfica dos táxons e os eventos que determinaram tal distribuição, bem como as relações entre as apifaunas dos diferentes ambientes permanecem como interessantes problemas biogeográficos a serem esclarecidos.

Um importante texto sobre a biogeografia da América do Sul foi recentemente organizado por Carvalho e Almeida (2011) apresentando as principais hipóteses biogeográficas para explicar a evolução e a história da região. Três capítulos deste livro merecem destaque no escopo de nosso trabalho.

Silva e Garda (2011) resumem os padrões e processos biogeográficos para a região Amazônica, indicando dois padrões biogeográficos básicos. O primeiro padrão é que as espécies não estão distribuídas de forma homogênea na região e a maioria das espécies possui distribuição restrita, definindo áreas de endemismo. O segundo padrão é a relação entre as diferentes áreas de endemismos, com substituição das espécies endêmicas de uma região por espécies aparentadas nas regiões de endemismo adjacentes.

Zanella (2011) discorre sobre a biogeografia da Diagonal de Formações Abertas Secas da América do Sul, considerando as três províncias da Caatinga, Cerrado e Chaco. Segundo este autor, a história da região é complexa e carece de dados mais amplos que permitam generalizações. Os estudos existentes mostram as relações entre Chaco e Cerrado e entre Cerrado e Caatinga em diferentes épocas, tanto no Terciário como no Quaternário. Por outro lado, a expansão das florestas úmidas sobre o espaço geográfico da Caatinga e do Cerrado, bem como a expansão da vegetação aberta sobre a região Amazônica representam importantes eventos contribuindo para a diversificação da biota desses ambientes.

DaSilva e Pinto-da-Rocha (2011) apresentam uma compilação das hipóteses biogeográficas para a Mata Atlântica. Estes autores apresentam quatro principais divisões biogeográficas da Mata Atlântica com relação às áreas de endemismo de diversos grupos: (i) Pernambuco, (ii) Sul da Bahia, (iii) Serra do Mar e (iv) Florestas de Araucária, sendo que os principais eventos influenciando a diversificação da biota estão relacionados com Quaternário e o modelo de refúgios. Além disso, em geral a biodiversidade da Mata Atlântica é relacionada com a biodiversidade da Floresta Amazônica, em particular a porção sudeste deste bioma (Bates *et al.* 1998; Eberhard e Mermingham, 2005). Costa (2003) por sua vez destaca as relações da Mata Atlântica e da Amazônia com áreas do Cerrado e Caatinga.

Assim, nota-se que a história biogeográfica da América do Sul é rica em diversidade tanto pelas relações internas, isto é entre as diferentes áreas de endemismo de cada bioma, como pelas relações entre os biomas e suas faunas associadas. No caso específico do gênero *Melipona*, há espécies filogeneticamente relacionadas ocorrendo tanto entre as áreas de endemismo de um mesmo bioma como em diferentes biomas. Assim, hipóteses biogeográficas baseadas em hipóteses filogenéticas do grupo podem oferecer novas contribuições para a reconstrução da história passada e para o entendimento dos atuais padrões de distribuição geográfica das espécies.

Nosso objetivo com o presente trabalho foi traçar um esboço sobre a história biogeográfica do gênero *Melipona* Illiger, 1806, baseada em hipótese filogenética reconstruída a partir de genes mitocondriais e nucleares, como um esforço inicial para o entendimento da evolução do grupo. Com isso, pretendemos oferecer contribuição ao entendimento das relações histórico evolutivas entre as diferentes regiões biogeográficas da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e América Central.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

Foram avaliadas 104 amostras de espécimes representantes do gênero *Melipona* incluindo sequências obtidas neste trabalho e sequências disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). Também utilizamos 29 amostras como grupos externos para enraizamento da árvore filogenética e para a datação molecular, totalizando 133 OTUs avaliadas (Tabelas 4 e 5 do Anexo), já consideradas as exclusões de possíveis *numts*.

Para as nossas amostras a localização geográfica de coleta foi identificada por meio do sistema de posicionamento global (GPS) utilizando-se o aparelho GPS Garmim® GPSMAP 76CSX. Para as sequências obtidas no GenBank utilizamos como referências geográficas as informações disponíveis para cada amostra em seu trabalho original. Os dados de localização geográfica foram utilizados para a produção dos mapas de distribuição no software ARCGis ESRI® 9.3. Para as colônias onde não foi possível a obtenção do exato ponto de coleta, utilizaram-se as localizações geográficas aproximadas.

3.2. Dados moleculares

Para as análises moleculares o DNA total de uma operária de cada colônia foi extraído segundo protocolo descrito por Fernandes-Salomão *et al.* (2005) e o DNA total de cada indivíduo foi utilizado nas reações de amplificação em cadeia de polimerase (PCR) em termociclador automático.

As soluções de reação continham um volume total de 50µL, sendo as concentrações finais de 50ng de DNA total, 1X de tampão de reação, 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM da mistura de dNTPs, 0,15mM de cada primer e 1u de Platinum® *Taq* Polimerase, *Invitrogen*TM. Os tubos contendo a reação de amplificação foram incubados em termociclador a 94°C por 2min para completa desnaturação das fitas, seguidos de 35 ciclos de amplificações PCR, cada ciclo com passo de desnaturação a 94°C por 45s, passo de anelamento do primer a 51°C por 1min, passo de extensão das fitas a 72°C por 1min 30s, e passo final de extensão a 72°C por 5min.

Para amplificação do fragmento correspondente ao gene citocromo oxidase I (CO1) foram utilizados os primers LCOdeg: 5'- TATCWACHAATCATA AAAATMTTGG -3', HC0deg: 5'- TAAACTTCWGGATGWCCAAAAAATCA -3', modificados dos primers universais LCO1490 e HC02198 propostos por Folmer *et al.* (1994). Para a amplificação dos fragmentos correspondentes ao gene nuclear EF1 α foram utilizados os *primers* EF1- α (long) *forward* 5'- GGGYAAAGGWTCTTCAARTATGC-3' e *reverse* 5'-AATCAGCACCTT TAGGTGG-3' e para o gene referente a RNA Polimerase II (POL2) os *primers* Pol-II *forward* 5'-AAYAARCCVGTATGGGTATTGTRCA-3' e *reverse* 5'- AG RTANGARTTCTCRACGAA TCCTCT-3' (Ramírez *et al.* 2010). Os produtos da amplificação via PCR foram purificados e diretamente sequenciados em sequenciadores automáticos pela empresa MacroGen Inc. Coréia do Sul.

Os cromatogramas resultantes das reações de sequenciamento foram avaliados e as sequências consenso foram obtidas utilizando os programas phredPhrap e Consed (Ewing *et al.*, 1998; Ewing & Green, 1998). Todas as sequências consenso foram visualmente inspecionadas e, quando necessário, editadas. Os alinhamentos das sequências foram realizados com ClustalW (Higgins *et al.*, 1994) implementados no MEGA versão 5 (Tamura *et al.* 2011).

Cristiano *et al.* (2012) demonstraram a existência de *numts* trabalhando com o gene CO1 em diferentes espécies de *Melipona*. Uma vez que trabalhamos com essa mesma região gênica, avaliamos todas as sequências CO1 obtidas, conforme sugerido por estes autores. Para reduzir a possibilidade de ocorrência de *numts* em nosso conjunto de dados finais, as sequências foram obtidas por sequenciamento direto do produto PCR. Todas as sequências foram traduzidas para a sequência de aminoácidos e a presença de códons de parada no frame de leitura foi verificada. Qualquer sequência detectada como possível *numt* foi excluída do alinhamento.

3.3. Análises filogenéticas, rede de haplótipos e datação molecular

Para a reconstrução filogenética foram realizadas análises Bayesianas implementadas no MrBayes versão 3.2/64bits (Ronquist *et al.* 2011) com modelos definidos pelo mrModelTest versão 2 (Nylander, 2004). Modelos diferentes foram estimados para cada conjunto de dados (CO1, Ef1a e Pol2) e

as árvores foram reconstruídas com os dados concatenados. Foram realizadas 10.000.000 de gerações para as cadeias markovianas MCMC com eliminação de 25% das gerações iniciais. Cada rodada de análises foi repetida três vezes para verificar a convergências dos conjuntos de cadeias markovianas. A convergência foi verificada graficamente no programa *Tracer - MCMC Trace Analysis Tool*, versão 1.5 (Rambaut e Drummont, 2009).

A datação molecular foi realizada no programa *R8s* (Sanderson, 2003) que estima o tempo de divergência entre os clados a partir de uma árvore filogenética com tamanho de ramos estimados. Para as estimativas de tempo de divergência foi utilizada a mesma árvore filogenética obtida por inferência bayesiana. Como critério foram utilizados relógio molecular relaxado, com método *PL (Penalized likelihood)* (Sanderson, 2002) e algoritmo TN, que considera taxas de substituição diferentes em cada ramo da árvore.

Para calibrar o relógio molecular foram considerados múltiplos pontos de calibração, sendo a idade máxima da raiz da árvore estimada entre 80-100 milhões de anos - Ma (estimativa baseada em Cardinal *et al.* 2010 para o tempo de divergência entre corbiculados); como calibração para os Meliponini utilizou-se a datação fóssil para *Cretotrigona prisca* entre 65-70 Ma (Michener & Grimaldi, 1988a e b; Engel, 2000); como calibração para os Apini a datação fóssil para *Apis lithohermaea* entre 14-16 Ma (Engel, 2006); para a idade do gênero *Melipona* a data estimada entre 14-17 Ma (Ramírez *et al.*, 2010; Rasmussen & Cameron, 2010).

4. RESULTADOS

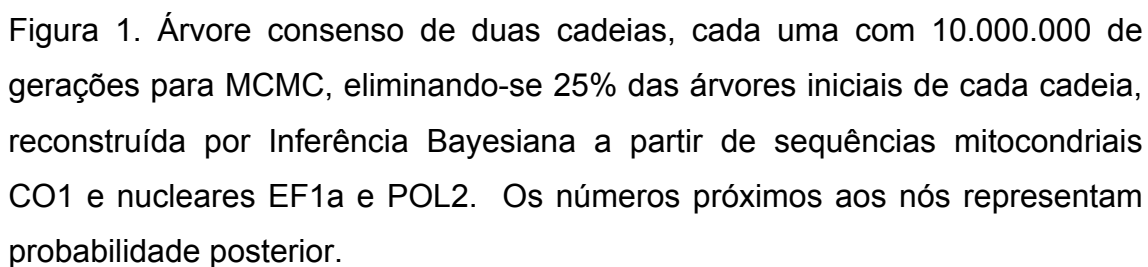
O alinhamento final foi composto por 458 pb referentes ao gene mitocondrial CO1, 785pb para o gene EF1a e 627 pb referentes ao gene RNA Polimerase II (POL2), totalizando 1870 pb com as sequências concatenadas. Os modelos escolhidos pelo MrModelTest foram GTR+I+G para CO1, GTR+G para EF1a e HKY+I para POL2. O alinhamento total foi particionado em três conjuntos referentes a cada gene e o modelo específico foi aplicado a cada partição para as inferências bayesianas.

A avaliação das sequências referentes ao CO1 sugeriram a ocorrência de *numts* para todas as seis sequências obtidas para a espécie *M. mondury*, para três das seis sequências obtidas para a espécie *M. rufiventris* e para uma das quatro sequências obtidas para *M. flavolineata*. O aspecto mais relevante para a detecção da presença de *numts* foi que os cromatogramas para essas sequências mostravam picos duplos em alta frequência, como se a região fosse heterozigota, o que não é de se esperar para haplótipos mitocondriais. Todas as OTUs com suspeita de *numts* foram excluídas das análises.

Em nosso estudo a presença de *numts* mostrou-se bastante comum para o Grupo *rufiventris*, enquanto para Cristiano *et al.* (2012) foi mais comum em *M. capixaba* e *M. scutellaris*. Estes autores também sugerem a presença de *numts* em sequências tanto de *M. rufiventris*, como em *M. flavolineata* utilizadas por Ramírez *et al.* (2010). O grupo *rufiventris* aparece como monofilético em nossa árvore, pelo menos quando excluímos os possíveis *numts*. No entanto, quando essas sequências são incluídas, *M. rufiventris* aparece como grupo polifilético

4.1. Hipótese filogenética e datação molecular.

A figura 1 apresenta a árvore consenso de duas cadeias, cada uma com 10.000.000 de gerações para MCMC, eliminando-se 25% das árvores iniciais de cada cadeia, reconstruída por Inferência Bayesiana. As demais rodadas de análises produziram resultados convergentes.



A árvore filogenética apresentada foi similar à de Ramírez *et al.* (2010), mostrando o gênero *Melipona* como grupo monofilético e três dos quatro subgêneros também monofiléticos (*Michmelia*, *Melikerria* e *Melipona*), bem como o subgênero *Eomelipona* como grupo polifilético, todos sustentados por altos valores de probabilidade posterior (0.99-1PP). A árvore apresentada resolve algumas inconsistências observadas na árvore de Ramírez *et al.*, como a polifilia de *M. rufiventris* que em nossa proposta apresenta-se monofilética, após a exclusão de possíveis sequências *numts* no conjunto de dados utilizados por estes autores.

Com a parafilia do subgênero *Eomelipona*, a espécie *M. (Eomelipona) asilvai* ficou incluída no clado do subgênero *Melipona* e *M. (Eomelipona) illustris*¹ não se agrupa em nenhum dos subgêneros, apresentando um ramo à parte e causando uma politomia no clado do gênero. As outras espécies do subgênero *Eomelipona* formam um clado irmão com o subgênero *Michmelia* enquanto o subgênero *Melikerria* forma um clado irmão com *Melipona*.

Também foi recuperada a monofilia dos três grupos propostos para o subgênero *Michmelia* (Camargo e Pedro, 2007), os grupos Fasciata, Rufiventris e Melanoventer, mostrando uma relação mais próxima entre esses dois últimos que formam um clado irmão. O grupo Fasciata é sustentado por altos valores de probabilidade posterior (0.99PP), enquanto os grupos Melanoventer (0.89PP) e Rufiventris (0.72PP) formam um clado melhor sustentado quando considerados como um grupo único (Melanoventer, Rufiventris – 1PP). A espécie *M. (Michmelia) fuliginosa*, considerada como “*unplace species*” dentro desse subgênero (Camargo e Pedro 2007) não foi alocada em nenhum dos grupos, mas como espécie irmã de todos os grupos dentro de *Michmelia* (*M. fuliginosa* (Fasciata (Melanoventer, Rufiventris)).

A árvore filogenética datada a partir da calibração do relógio molecular mostra datações similares às verificadas por Ramírez *et al.* (2010) (Figura 2).

¹ Esta amostra foi obtida a partir de sequências depositadas no GenBank por Ramírez *et al.* 2010, voucher MP46a. No entanto o específico *M. (Eomelipona) illustris* não é reconhecido na revisão de Camargo e Pedro (2007). O nome *M. marginata illustris* Schwars (1932) foi sinonimizado por *M. (Eomelipona) bradleyi* Schwars, 1932.

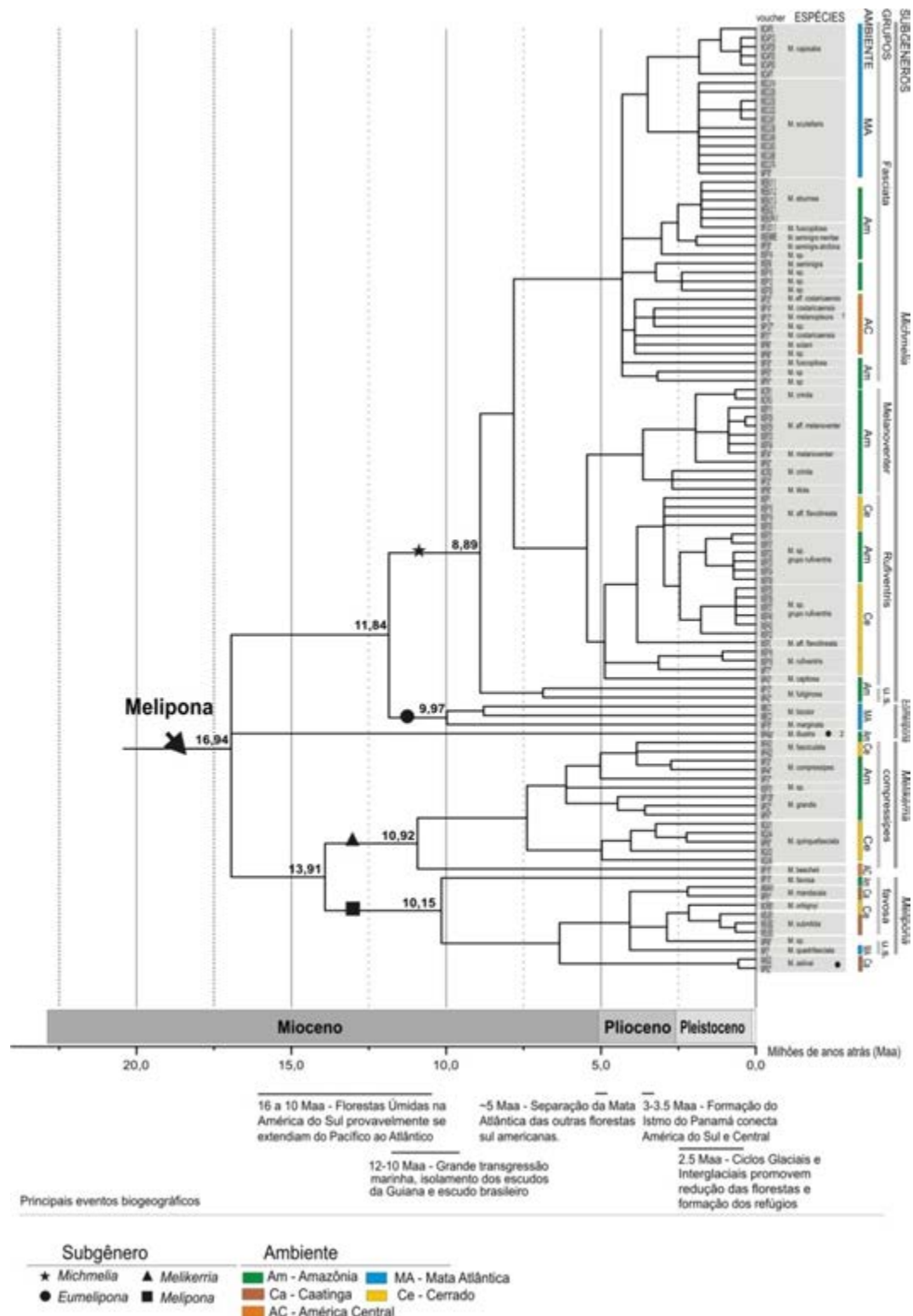


Figura 2. Árvore consenso de duas cadeias, cada uma com 10.000.000 de gerações para MCMC, eliminando-se 25% das árvores iniciais de cada cadeia, reconstruída por Inferência Bayesiana a partir de sequências mitocondriais CO1 e nucleares EF1a e POL2. Números próximos aos nós representam datação molecular em milhões de anos.

4.2. Relações filogenéticas, datação molecular e distribuição geográfica das espécies

4.2.1. Subgênero *Michmelia*, grupos *Fasciata*, *Melanoventer* e *Rufiventris*

Foram avaliadas espécies do subgênero *Michmelia* grupo *Fasciata* de ocorrência restrita à Mata Atlântica (*M. capixaba* e *M. scutellaris*), espécies de distribuição na região da Amazônia (*M. ebúrnea*, *M. fuscopilosa*, *M. seminigra seminigra*, *M. seminigra atrofulva*, *M. seminigra merrillae*) e espécies de ocorrência restrita à América Central (*M. costaricensis*, *M. melanopleura*, *M. solani*).

As espécies de Mata Atlântica *M. capixaba* e *M. scutellaris* formam um clado, datado de 3,49 Maa. As espécies da América Central também formam um clado, datado de 3,90 Maa. As espécies amazônicas estão separadas em pelo menos dois clados, um clado reúne espécies coletadas ao leste da Região Amazônica, datado de 3,23 Maa, e outro mais a oeste da Região Amazônica, datado de 3,04 Maa. *M. fuscopilosa* não forma um grupo monofilético e um terceiro clado foi formado com espécies não identificadas, amostradas por Ramírez *et al* (2010), mas não há referências sobre o local da coleta dessas amostras (Figura 3).

Para o grupo *Melanoventer*, foram avaliadas espécies de ocorrência apenas na região Amazônica. Pelo menos três clados foram formados. Um clado reúne *M. melanoventer* e espécimes não identificados coletados em Belém, Pará. Este clado foi datado de 0,88 Maa. Um segundo clado reúne tanto as espécies do clado *melanoventer* e espécimes de *M. crinita* coletadas no Acre, com datação em 1,94 Ma. A espécie *M. crinita* não se mostra monofilética, pois parte das amostras se agrupa com *M. illota*, amostrada no Equador, com clado datado em 2,69 Maa (Figura 4).

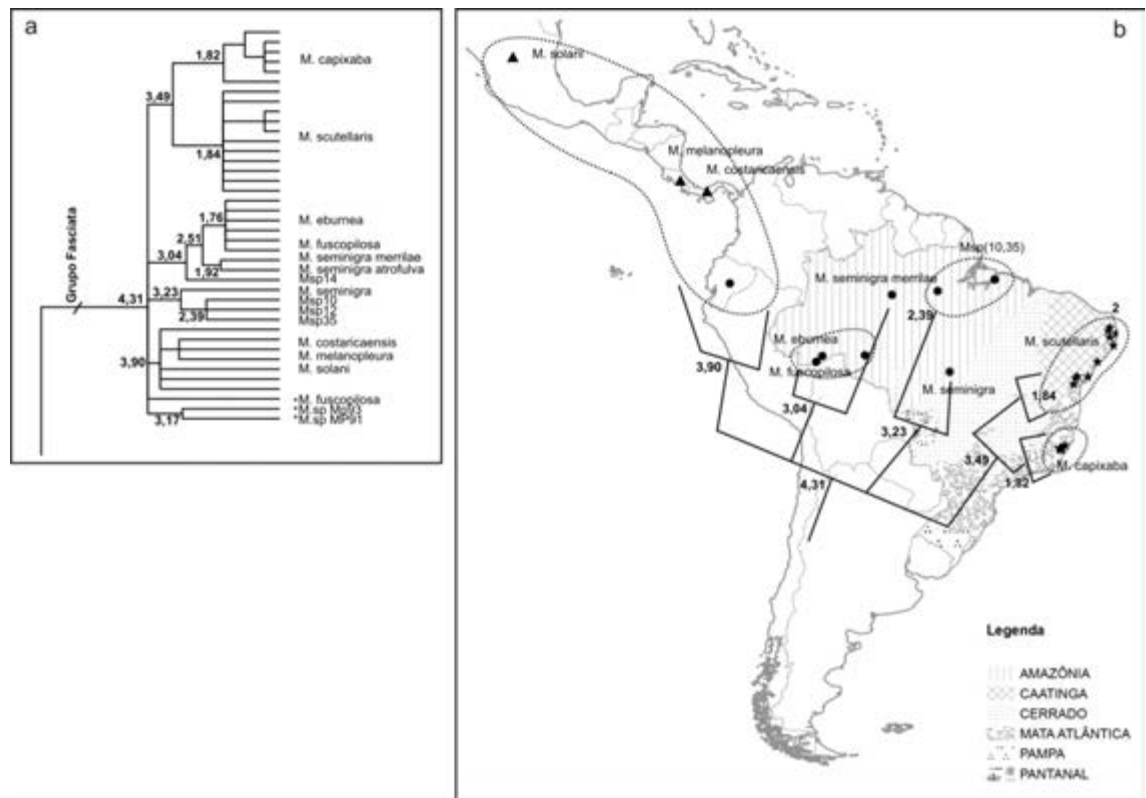


Figura 3. Mapa indicando a posição geográfica dos espécimes amostrados para o subgênero *Michmelia*, Grupo Fasciata, utilizadas neste estudo. (a) Cladograma referente ao Grupo Fasciata, seção retirada da Figura 2, com tamanhos de ramos proporcionais ao tempo em milhões de anos. (b) Mapa de biomas, indicando a localização geográfica dos locais de amostras e seus respectivos biomas brasileiros. Os ramos de um mesmo táxon, quando formam um clado, foram simplificados num único ramo e tais grupos são representados por uma linha pontilhada. Os números próximos aos nós representam datação molecular em milhões de anos, estimadas no r8s.

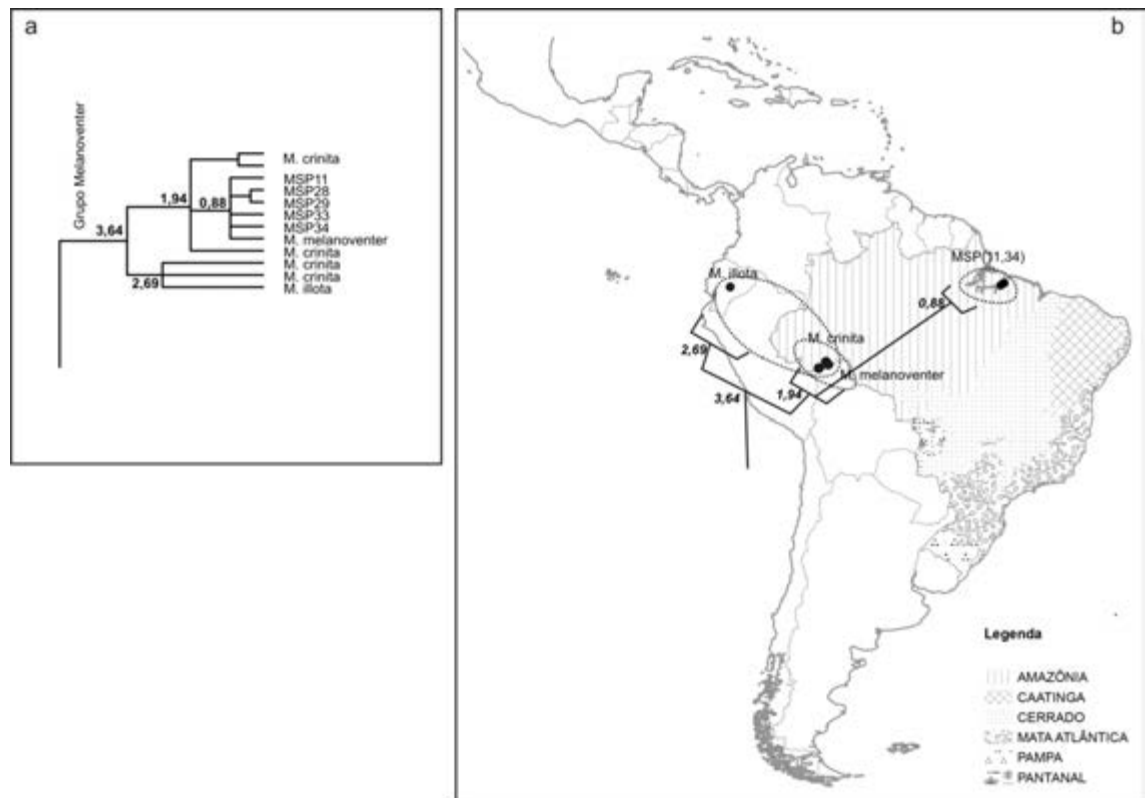


Figura 4. Mapa indicando a posição geográfica dos espécimes amostrados para o subgênero *Michmelia*, grupo Melanoventer, utilizadas neste estudo. (a) Cladograma referente ao Grupo Fasciata, seção retirada da Figura 2, com tamanhos de ramos proporcionais ao tempo em milhões de anos. (b) Mapa de biomas, indicando a localização geográfica dos locais de amostras e seus respectivos biomas brasileiros. Os ramos de um mesmo táxon, quando formam um clado, foram simplificados num único ramo e tais grupos são representados por uma linha pontilhada. Os números próximos aos nós representam datação molecular em milhões de anos, estimadas no r8s.

Para o grupo *Rufiventris* foram amostradas espécies de ocorrência no Cerrado, desde o estado de Minas Gerais até o Maranhão, e também espécies da região amazônica. Três clados principais foram formados. Um clado formado por um único representante de *M. captiosa*, coletado na Guiana Francesa. Um segundo clado (3,13 Maa) reúne a espécie *M. rufiventris* com indivíduos coletados nos Cerrados de Minas Gerais e Goiás. Um terceiro clado (3,83 Maa) reúne espécie de *M. flavolineata* e espécimes não identificadas do grupo *rufiventris* (Tavares *et al*, 2007) coletadas no norte de Minas Gerais. Este clado divide-se em dois subclados, o primeiro, datado de 1,61 Maa, reúne as uruçú amarelas coletadas no Pará e o segundo, datado de 1,77 Maa reúne as uruçú amarelas coletadas no norte de Minas Gerais com *M. flavolineata* coletada no Tocantins (Figura 5).

4.2.2. Subgênero *Melikerria*

As espécies amostradas que compõem o subgênero *Melikerria* distribuem-se na região do Cerrado (*M. quinquefasciata* e *M. fasciculata*), na região amazônica (*M. compressipes compressipes*, *M. compressipes interrupta*, *M. grandis*) e na América Central (*M. beecheii*). Dois clados principais são formados. O primeiro (datado em 6,12 Maa) reúne as espécies da região amazônica e *M. fasciculata*, coletada no cerrado maranhense. O segundo clado (4,97 Maa) reúne a espécie do Cerrado *M. quinquefasciata*, coletada em Minas Gerais, Bahia e Ceará. *M. beecheii*, de ocorrência no México, aparece como espécie irmã de todas as outras *M. Melikerria*, com datação do ancestral comum em 10,92 Maa para o subgênero (Figura 6).

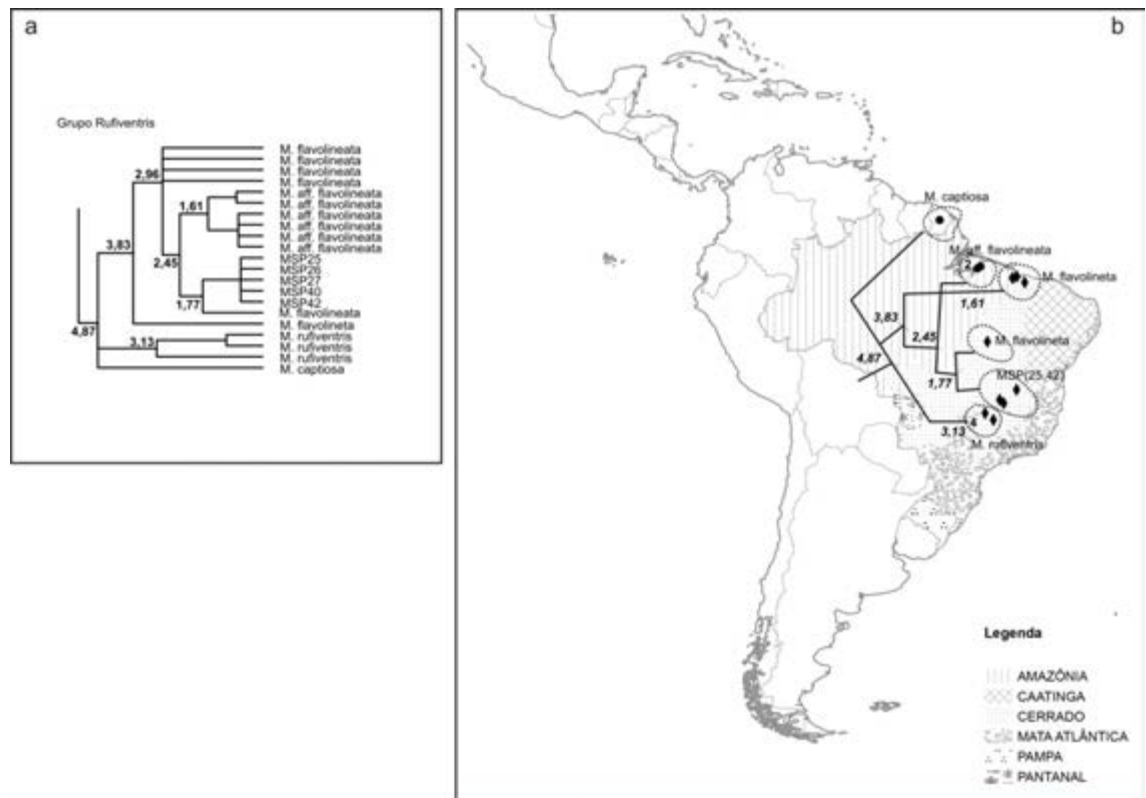


Figura 5. Mapa indicando a posição geográfica dos espécimes amostrados para o subgênero *Michmelia*, grupo *Rufiventris*, utilizadas neste estudo. (a) Cladograma referente ao Grupo *Fasciata*, seção retirada da Figura 2, com tamanhos de ramos proporcionais ao tempo em milhões de anos. (b) Mapa de biomas, indicando a localização geográfica dos locais de amostras e seus respectivos biomas brasileiros. Os ramos de um mesmo táxon, quando formam um clado, foram simplificados num único ramo e tais grupos são representados por uma linha pontilhada. Os números próximos aos nós representam datação molecular em milhões de anos, estimadas no r8s.

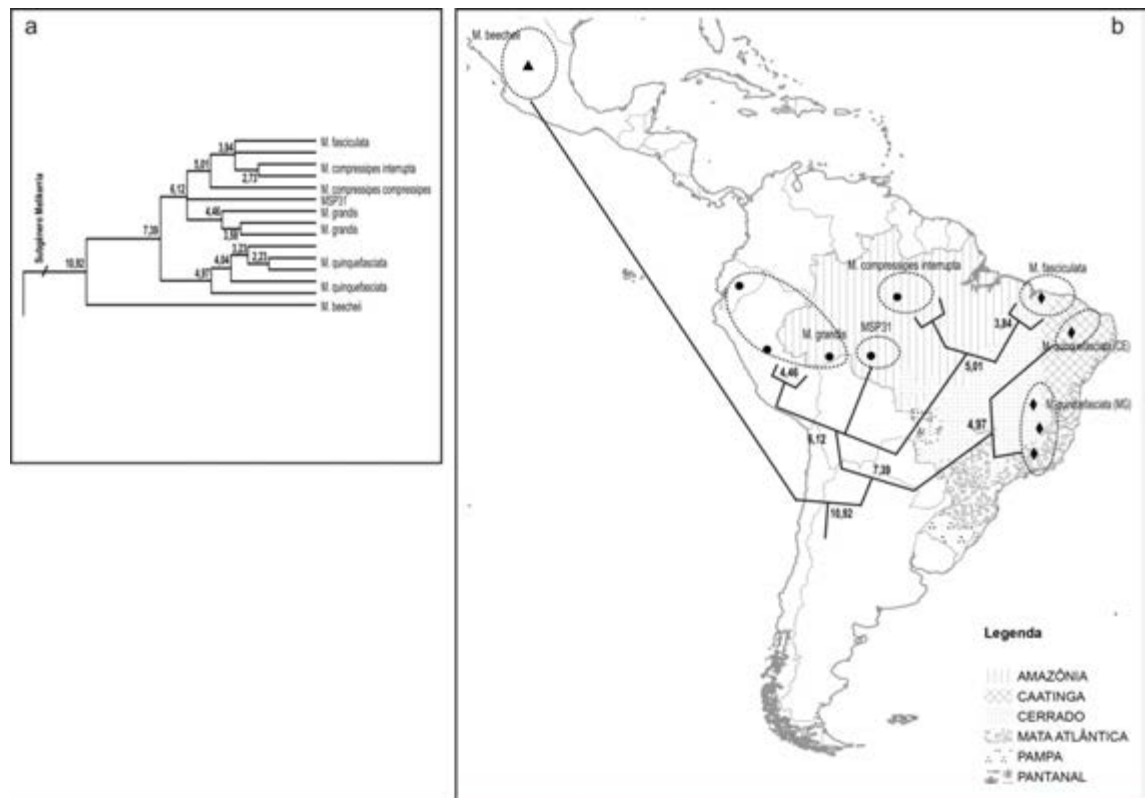


Figura 6. Mapa indicando a posição geográfica dos espécimes amostrados para o subgênero *Melikerria* utilizadas neste estudo. (a) Cladograma referente ao Grupo Fasciata, seção retirada da Figura 2, com tamanhos de ramos proporcionais ao tempo em milhões de anos. (b) Mapa de biomas, indicando a localização geográfica dos locais de amostras e seus respectivos biomas brasileiros. Os ramos de um mesmo táxon, quando formam um clado, foram simplificados num único ramo e tais grupos são representados por uma linha pontilhada. Os números próximos aos nós representam datação molecular em milhões de anos, estimadas no r8s.

4.2.3. Subgênero *Melipona*

As espécies amostradas do subgênero *Melipona* estão distribuídas nas regiões de Mata Atlântica (*M. quadrifasciata*), nas regiões de Cerrado (*M. orbignyi*), na Caatinga (*M. mandacaiá* e *M. subnitida*). *M. favosa* de ocorrência na região amazônica (Guiana Francesa) aparece como grupo irmão de todas as outras *M. Melipona*, com datação em 10,15 Ma. Neste grupo também se inclui *M. (Eomelipona) asilvai*, amostrada na região da Caatinga do Rio Grande do Norte (Figura 7).

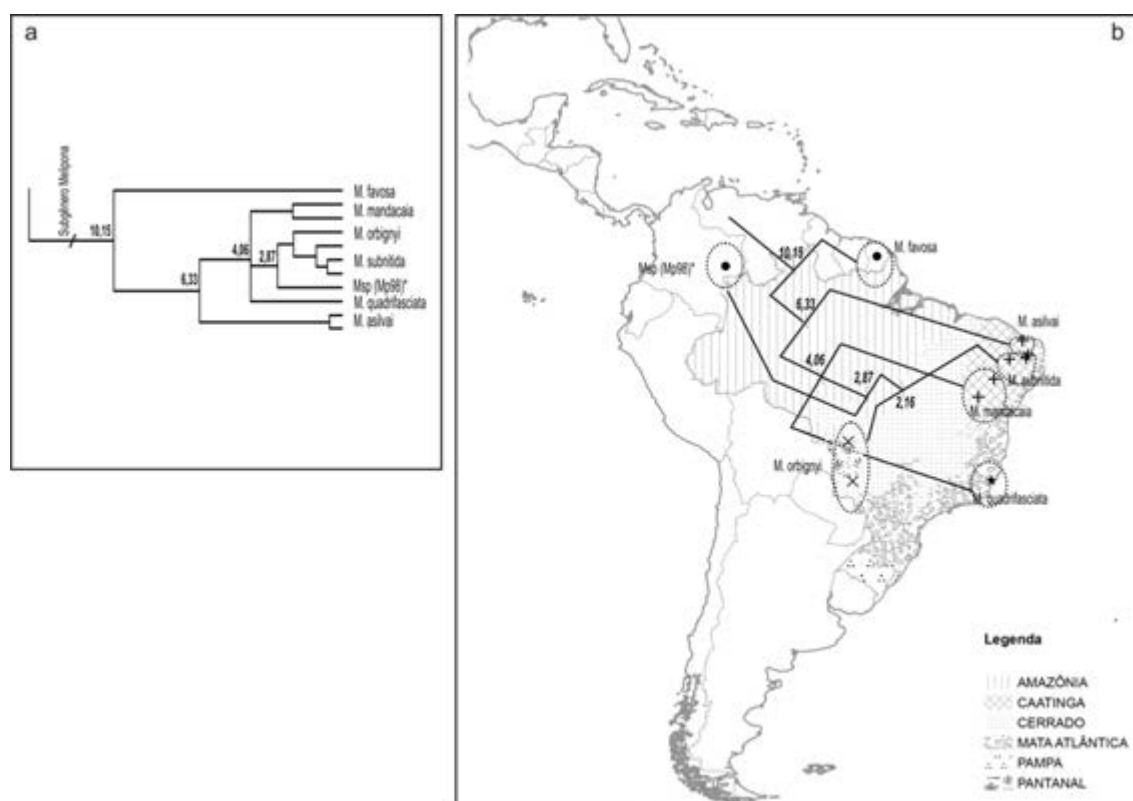


Figura 7. Mapa indicando a posição geográfica dos espécimes amostrados para o subgênero *Melipona* utilizadas neste estudo. (a) Cladograma referente ao Grupo Fasciata, seção retirada da Figura 2, com tamanhos de ramos proporcionais ao tempo em milhões de anos. (b) Mapa de biomas, indicando a localização geográfica dos locais de amostras e seus respectivos biomas brasileiros. Os ramos de um mesmo táxon, quando formam um clado, foram simplificados num único ramo e tais grupos são representados por uma linha pontilhada. Os números próximos aos nós representam datação molecular em milhões de anos, estimadas no r8s.

5. DISCUSSÃO

A proposta filogenética apresentada foi similar àquela apresentada por Ramírez *et al.* (2010), mesmo porque utilizamos as mesmas espécies (com alguns acréscimos), parte das sequências que estes autores utilizaram e também os mesmos genes, com exceção de 16S e ArgK. Incluímos *M. (Michmelia) capixaba*, *M. (Michmelia) eburnea*, *M. (Michmelia) seminigra seminigra*, *M. (Michmelia) seminigra merrillae*, *M. (Melikerria) fasciculata*, *M. (Melipona) orbigny* e *M. (Melipona) subnitida*. Desconsideramos algumas das espécies utilizadas por Ramírez *et al.* (2010), ou por apresentarem sequências suspeitas de *numts*, ou por não apresentarem sequências disponíveis para algum dos genes analisados.

A principal contribuição da hipótese apresentada é uma maior amostragem em termos de distribuição geográfica. Procuramos tanto quanto possível amostrar diferentes locais de ocorrência de uma mesma espécie, o que nos permitiu uma interpretação das relações filogenéticas do gênero *Melipona* associando-a à história biogeográfica da América do Sul e América Central, assunto não discutido por Ramírez *et al.* (2010).

A história biogeográfica do gênero *Melipona* é bastante complexa. Não há um clado único para as espécies da Amazônia, outro para as espécies do Cerrado ou da Mata Atlântica. As espécies filogeneticamente próximas, isto é de um mesmo subgênero, ocorrem em diferentes ambientes. Isto mostra que os eventos de cladogênese que deram origem aos diferentes subgêneros são anteriores à formação dos biomas atuais, ou pelo menos anteriores à configuração geográfica que eles apresentam atualmente. De fato, os eventos de cladogênese dos subgêneros foram datados entre ~9 Maa a ~10 Maa, e o ambiente sul americano passou por muitas mudanças desse período até os tempos atuais.

5.1. Processos biogeográficos na Região Amazônica

Silva e Garda (2011) destacam que um padrão biogeográfico básico na Amazônia é que as espécies não estão distribuídas de forma homogênea na região, mas a maioria das espécies estudadas possui distribuição restrita,

definindo áreas de endemismo. Esses autores citam pelo menos sete áreas de endemismo mais ou menos comum aos diferentes táxons, Belém, Xingu, Tapajós, Rondônia, Inambari, Napo, Imeri, Guiana.

Embora tenhamos uma amostragem bastante restrita considerando a extensão da Amazônia e o grande número de espécies que ocorrem nessa região, é possível perceber que esse padrão observado por Silva e Garda (2011) também é verdadeiro para o gênero *Melipona*. As espécies *M. eburnea* e *M. fuscopilosa* aparecem como espécies irmãs dentro do grupo *Michmelia* Fasciata, com ancestral comum mais recente datado em 1,76 Maa (Figura 4, grupo 3a). Ambas as espécies ocorrem no Acre, dentro da área de endemismo conhecida como Inambari. Outros exemplos podem ser citados como *M. melanoventer* na região de Belém, *M. siminigra* na área de endemismo Xingu, *M. grandis* na área Inambari. Em geral os clados para cada área de endemismo são mais recentes que 2,5 a 3 Maa.

Um segundo padrão destacado por Silva e Garda (2011) para a região Amazônica é o da substituição das espécies endêmicas em uma região por espécies aparentadas nas áreas de endemismo adjacentes. Isto também foi verificado em *Melipona*. Por exemplo, *M. seminigra seminigra* (coletada em Nova Xavantina, MT) na região de endemismo entre Xingu e Tapajós, forma grupo irmão com espécies coletadas em Belém/PA, na área de endemismo Belém, adjacente àquelas (Figura 4, grupos 4a e 4b). *M. eburnea* e *M. fuscopilosa* (coletadas no Acre) área de endemismo Inambari formam grupo irmão com *M. seminigra merrillae* (coletada em Manaus/AM) área de endemismo adjacente Imeri / Guiana (Figura 3)

5.2. Processos biogeográficos na Mata Atlântica

DaSilva e Pinto-da-Rocha apresentam quatro principais divisões biogeográficas da Mata Atlântica com relação às áreas de endemismo: (i) Pernambuco, (ii) Sul da Bahia, (iii) Serra do Mar e (iv) Florestas de Araucária. A maioria dos estudos a respeito dos processos históricos da diversificação da fauna da Mata Atlântica propõe que a diversificação está relacionada com os processos de vicariância relacionados ao modelo de refúgios vegetacionais

durante as mudanças climáticas do Quaternário (por exemplo: Cabanne *et al.*, 2008; Lara-Ruiz *et al.*, 2008; Carnaval *et al.*, 2009).

Nossa amostragem mais adequada de espécies da Mata Atlântica foram as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris*. Parte da história biogeográfica de fato coincide com o modelo de refúgios do Quaternário, e tal história já foi discutida em detalhes no capítulo 2. As relações entre as espécies de *Melipona* amostradas na Mata Atlântica podem, de fato, serem explicadas por eventos de vicariância no Quaternário, coincidindo com a teoria dos refúgios. Batalha-Filho *et al.*, (2010) estudaram a filogeografia da espécie *M. quadrifasciata* amostrando as duas subespécies *M. quadrifasciata quadrifasciata* e *M. quadrifasciata anthidioides* em toda a área de ocorrência da espécie, na Mata Atlântica da Bahia até São Paulo. A datação molecular realizada com base em sequências CO1 também indicaram tempos de divergência entre essas subespécies entre 0,23 – 0,84 Maa, coincidindo com eventos de glaciação do Pleistoceno.

Nossas amostras também contém *M. bicolor* e *M. marginata*, ambas de ocorrência na Mata Atlântica. No entanto, a datação para o ancestral comum mais recente para essas espécies foi de 9,97 Maa, anterior mesmo à datação para a Mata Atlântica (~5,0 Maa, segundo DaSilva e Pinto-da-Rocha, 2011). Uma amostragem mais ampla dessas espécies deve oferecer melhores interpretações uma vez que *M. marginata* é politípica, com as subespécies *M. marginata marginata* e *M. marginata carioca* ocorrendo de São Paulo até o Ceará. A espécie *M. bicolor* também é politípica, com as subespécies *M. bicolor bicolor* e *M. bicolor schencki* ocorrendo da Bahia até a Argentina e Paraguai (Camargo e Pedro, 2007).

5.3. Processos biogeográficos em ambientes de formações abertas

As formações vegetacionais abertas, tipo savana, formam uma unidade biogeográfica bem definida na América do Sul, conhecida como “Diagonal de formações abertas secas da América do Sul” (Zanella, 2011), composta pelo Chaco ao sul, Cerrado ao centro-oeste e Caatinga a nordeste. Diferentes espécies do gênero *Melipona* possuem ocorrência restrita a esses ambientes e

a divergência entre essas espécies parecem estar relacionadas tanto a eventos mais recentes, no Pleistoceno, como mais antigos no Plioceno.

No subgênero *Michmelia* amostramos as espécies *M. flavolineata*, *M. rufiventris* e uma possível nova espécie do Grupo *rufiventris* (Tavares *et al.* 2007), ainda sem identificação, de ocorrência no norte de Minas Gerais. *M. flavolineata* (coletadas em Tocantins) forma um grupo irmão com *M. sp* (coletadas no norte de Minas Gerais) datado em 1,77 Maa, formando um clado separado das *M. flavolineata* coletadas no Maranhão. Espécimes coletados no Pará (identificadas como *M. aff. flavolineata*) formam clado irmão com o grupo do Tocantins e norte de Minas (datado em 2,45 Maa), mais próximas do que *M. flavolineata* coletadas no Maranhão (Figura 5). É possível que a divergência desses grupos tenha se dado por eventos de vicariância e expansão durante os períodos glaciais e interglaciais onde houve expansão de áreas abertas sobre a região amazônica e de áreas úmidas sobre o Cerrado (Zanella, 2011).

No subgênero *Melikerria* espécimes de *M. quinquefasciata* coletadas em Minas Gerais e Ceará formam dois clados com separação datada em 4,97 Maa (Figura 6). Essa divergência não pode ser explicada por eventos no Pleistoceno. Zanella (2011) citando Silva (1995) discute a importância do soerguimento do Planalto Central Brasileiro ocorrido entre o Plioceno e Pleistoceno como eventos de vicariância influenciando a divergência de grupos do Cerrado e Chaco, aventando a possibilidade de que tal evento possa também ter influenciado a divergência entre a biota do Cerrado e da Caatinga. Zanella (2002) apresentou estudo sobre a biogeografia de abelhas do gênero *Caenonomada* (Apidae: Tapinotaspini) que reúne espécies de ambientes xéricos, incluindo o Brasil central, a Caatinga nordestina e o Chaco na Argentina. O autor sugere eventos de vicariância anteriores ao Pleistoceno separando as espécies de ocorrência na Caatinga daquelas ocorrendo mais ao sul.

No subgênero *Melipona* as espécies *M. subnitida* (caatinga do Rio Grande do Norte e Paraíba) e *M. orbigny* (Cerrado do Mato Grosso do Sul) formam um clado irmão datado em 2,16 Maa, coincidente com eventos de vicariância do Pleistoceno (Figura 7). Uma relação interessante foi observada

neste grupo. Uma espécie não identificada (*M. sp.*, voucher MP98 – Ramírez *et al.*, 2010) coletada na Colômbia posiciona-se como grupo irmão de *M. orbigny* e *M. subnitida*, datado em 2,87 Maa. Na região noroeste da América do Sul há regiões de vegetação seca, os Llanos, na Venezuela. Não temos uma informação precisa sobre o local de ocorrência deste espécime (MP98), mas se for oriunda de formações secas, há aqui uma interessante ligação entre as faunas de ambientes do Cerrado e Caatinga, com áreas ao norte da região amazônica. Zanella (2011) cita diferentes casos semelhantes incluindo abelhas e escorpiões, de faunas relacionadas entre essas áreas, sugerindo corredores de ambientes secos durante os períodos glaciais que poderiam explicar a expansão de faunas associadas a ambientes secos para dentro da região amazônica.

Assim, a história biogeográfica nos ambientes de formações abertas da América do Sul parece ser bastante complexa, como destacado por Zanella (2011) e merecem estudos mais abrangentes que permitam traçar os diferentes eventos biogeográficos determinantes da diferenciação da biota destes ambientes. Mas é possível destacar que eventos de expansão e de vicariância do Plioceno e Pleistocenos devem ser responsáveis pela diferenciação na apifauna do gênero *Melipona* de ocorrência nos ambientes xéricos da América do Sul.

5.4. Ocupação da América Central e México

Várias espécies de *Melipona* estão distribuídas na América Central, desde o Panamá até o México. Antes de ~3,5 Maa o nível do mar estava acima do atual, e o istmo do Panamá estava submerso, isolando a América do Sul da porção Norte Americana (Coates *et al.*, 1992). Com a diminuição do nível do mar devido ao resfriamento do planeta, no Plioceno superior ocorre a formação do istmo do Panamá, isolando o oceano atlântico do pacífico e conectando a América do Sul e América Central, permitindo a troca entre fauna e flora destes ambientes (Burnham e Graham, 1999).

Amostramos dois grupos de abelhas distribuídas geograficamente na América Central e México. No subgênero *Michmelia* as espécies *M. costaricensis*, *M. melanopleura*, *M. solani* coalescem em um tempo de

divergência datado molecularmente em 3,90 Maa relacionadas com espécime coletadas no Equador (Figura 3). Isso sugere que a apifauna da América Central está relacionada com a apifauna da amazônia, em sua porção andina, e que a ocupação da América Central se deu por expansão da fauna amazônica para a América Central e México, através do Istmo do Panamá.

No subgênero *Melikerria* também foi analisado um espécime de *M. beecheii* de ocorrência no México (Figura 6). Entretanto, uma única espécie não permite estimar o tempo de isolamento desta linhagem e o tempo de coalescência fica sendo a raiz do subgênero.

5.5. Relações entre os diferentes ambientes

Considerando as relações filogenéticas entre os clados e o ambiente onde as espécies estão distribuídas atualmente verifica-se uma complexa relação entre os diferentes ambientes. Apresentamos na Figura 8 um cronograma que mostra essas relações para os subgêneros estudados. É possível observar que as diferentes linhagens estão representadas em quase todos os ambientes.

Espécies do subgênero *Michmelia* são encontradas na Amazônia, na Mata Atlântica no Cerrado e na América Central. As espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* (Mata Atlântica) estão relacionadas com espécies amazônicas como *M. eburnea*, *M. fuscopilosa* e *M. seminigra*, bem como com espécies da América Central, e a datação molecular indica a divergência dessas linhagens em 4,31 Maa (Plioceno) (Figura 3). *M. rufiventris* e *M. flavolineata* (Cerrado) formam grupo irmão com *M. captiosa* de ocorrência na Amazônia, com datação em 4,87 Maa (Plioceno) (Figura 5).

No subgênero *Melikerria*, a espécie *M. quinquefasciata* (Cerrado) forma grupo irmão com *M. grandis* e *M. compressipes* (Amazônia) com datação em 7,39 Maa (Mioceno). *M. fasciculata* do Maranhão (Cerrado), forma grupo irmão com *M. compressipes* (Amazônia) datado em 3,84 Maa (Plioceno) (Figura 6). No subgênero *Melipona*, a espécie *M. quadrifasciata* (Mata Atlântica) forma grupo irmão com *M. mandacaia* (Caatinga) em clado datado em 4,06 Maa (Plioceno) (Figura 7).

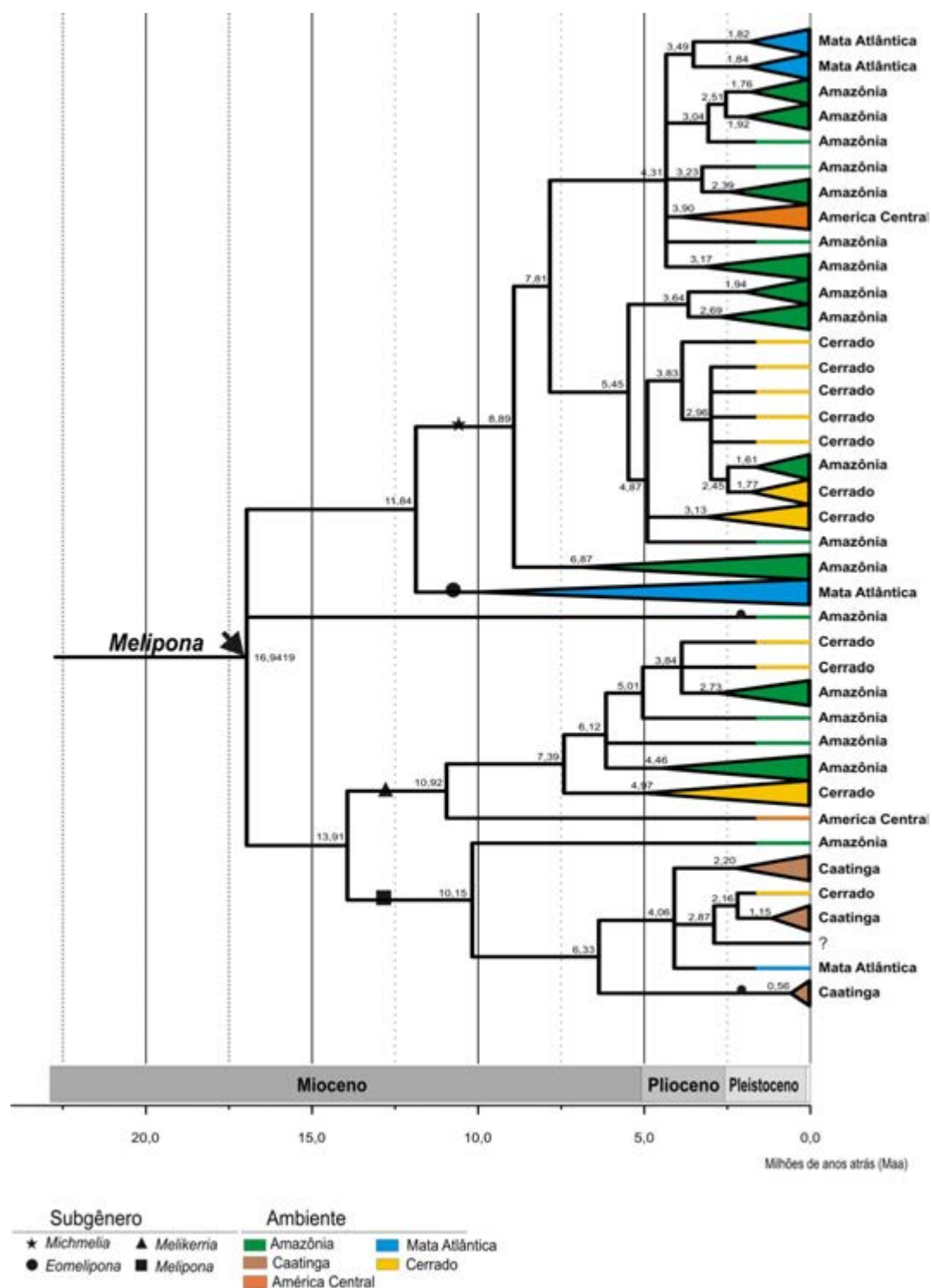


Figura 8. Cronograma mostrando a relação entre os táxons e suas áreas de ocorrência natural. Os táxons não foram apresentados mas a árvore filogenética corresponde com a hipótese apresentada na Figura 2. O comprimento de ramos é proporcional ao tempo de divergência. Os números próximos aos nós representam tempo em milhões de anos, estimados por datação molecular no r8s.

Assim percebe-se que, enquanto as relações entre espécies correlatas de um mesmo ambiente foram datadas geralmente no Pleistoceno e Plioceno superior (antes de 3,5 Maa), as relações entre espécies correlatas de diferentes ambientes são mais antigas, datadas no Plioceno e Mioceno.

Dois padrões mais ou menos gerais podem ser percebidos.

1. Espécies filogeneticamente próximas ocupam o mesmo ambiente e as relações entre as espécies aparentadas de um mesmo ambiente são geralmente mais recentes;
2. O mesmo ambiente é ocupado por espécies filogeneticamente distantes, isto porque espécies de linhagens ancestrais diferentes ocuparam o mesmo espaço geográfico e as relações entre espécies não aparentadas de um mesmo ambiente são geralmente mais antigas.

Podemos generalizar que inicialmente eventos de expansão populacional resultaram na ocupação dos diferentes ambientes por diferentes linhagens ancestrais e, posteriormente eventos de vicariância isolaram essas linhagens ancestrais em seus ambientes atuais, com eventos de especiação por vicariância dentro de um mesmo ambiente.

5.6. Esboço sobre a história biogeográfica do gênero *Melipona*

Rasmussen e Cameron (2010) concluem que a principal divisão entre os Meliponini Neotropicais e os Afrotropicais se deu em torno de 80 Maa (Gondwana) e essa separação determinou a evolução isolada dos grupos neotropicais. Michener (2007) afirma que o gênero *Melipona* é claramente relacionado com abelhas africanas. Assim, a história do grupo se deu a partir de linhagens ancestrais isoladas na América do Sul.

A história biogeográfica do gênero *Melipona* Illiger, 1806 parece ter se iniciado na América do Sul em torno de 16 Maa. Entre 16 a 10 Maa, extensas

florestas úmidas cobriam a América do Sul de forma contínua do Atlântico ao Pacífico (Morley, 2000 - citado por DaSilva e Pinto-da-Rocha, 2011). Isto permitiu que as linhagens ancestrais ocupassem toda a extensão das florestas úmidas, em um evento inicial de expansão populacional da linhagem ancestral.

Em torno de 12 a 10 Maa (no Mioceno Médio) ocorre intensa transgressão marinha na América do Sul formando um grande mar que se estendeu de norte a sul do continente sul americano, isolado a oeste pela Cordilheira dos Andes e separando a América do Sul em duas grandes ilhas, o escudo das Guianas (a noroeste da região Amazônica) e o escudo brasileiro (no centro e leste do Brasil) (Webb, 1995). Esse evento deve ter determinado processos vicariantes na linhagem ancestral, determinando a cladogênese dos diferentes subgêneros de *Melipona*, datados entre 8,89 – 10,92 Maa.

Durante o Mioceno Superior, o mar regrediu permitindo a reconstituição das florestas sul-americanas, que deve ter sido acompanhada por novos eventos de expansão populacional das linhagens ancestrais, agora já diferenciadas em subgêneros, que ocuparam os diferentes ambientes onde hoje se encontram. Por volta de 5 Maa, no Plioceno, iniciam os ciclos glaciais com resfriamento do globo e as florestas úmidas diminuem em extensão e avançam as formações abertas. Com a elevação do Planalto Central brasileiro, datado entre o Plioceno e Plesitoceno, a “Diagonal de formações abertas secas” se estende para a sua configuração atual, isolando definitivamente a Mata Atlântica da Amazônia pelo Cerrado e Caatinga.

Estes eventos determinaram a vicariância dos diferentes grupos dentro de seus ambientes iniciando o processo evolutivo das linhagens isoladas em cada ambiente. Em ~3,5 Maa a formação do Istmo do Panamá conectou por terra a América do Sul e América Central, permitindo a troca florística e faunística entre as regiões, permitindo a ocupação da América Central por linhagens relacionadas à apifauna amazônica.

Durante o Pleistoceno (2,5 Maa), as linhagens internas a cada ambiente sofreram novos processos de vicariância devido aos eventos glaciais-interglaciais que promoveram ciclos de expansão e retração das formações vegetais. Na Mata Atlântica e Amazônia, grupos foram isolados nos diferentes

refúgios vegetacionais do Quaternário, culminando em eventos de especiação nas diferentes áreas de endemismo. No Cerrado e Caatinga, a expansão ora de formações úmidas para as áreas de Cerrado, ora de formações secas para as áreas amazônicas promoveu a diferenciação entre as linhagens no Cerrado e na Caatinga.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16, 37-48.
- Batalha-Filho H, Waldschmidt AM, Campos LAO, Tavares MG, Fernandes-Salomão TM. Phylogeography and historical demography of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie*, **41**(5): 534-547.
- Bates JM, Hackett SJ, Cracraft J (1998) Area-relationships in the neotropical lowlands: an hypothesis based on raw distributions of Passerinae birds. *J. Biogeogr.* **25**:783-793.
- Burnham RJ, Graham A (1999) The history of neotropical vegetation: new developments and status. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **86**(2):546-589.
- Cabane GS, d'Horta FM, Sari EHR, Santos FR, Miyaky CY (2008) Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **49**, 760–773.
- Camargo JMF, Pedro SEM (2007) Meliponini Lepeletier, 1836. In: *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region*. Moure JS, Urban D, Melo GAR (Orgs.). Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia. 1058 p.
- Cardinal S, Straka J, Danforth BN (2010) Comprehensive phylogeny of Apidae bees reveals the evolutionary origins and antiquity of cleptoparasitism. *PNAS - Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**:16207-16211.
- Carvalho CJB, Almeida EAB, org. (2011) *Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos*. São Paulo, Roca. 306 p.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C (2009) Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science*, **323**, 785-789.
- Coates AG, Jackson JB, Collins LS, Cronin TM, Dowsett HJ, Bybell LM, Jung P, Obando JA (1992) Closure of the Isthmus of Panama: The near-shore marine record of Costa Rica and western Panama. *Geol. Soc. Amer. Bull.* **104**: 814-828.
- Costa LP (2003) The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *J. Biogeogr.* **30**:71-86.
- Cristiano MP, Fernandes-Salomão TM, Yotoko KSC (2012) Nuclear mitochondrial DNA: an Achilles' heel of molecular systematics, phylogenetics, and phylogeographic studies of stingless bees. *Apidologie* DOI: 10.1007/s13592-012-0122-4.
- DaSilva MB, Pinto-da-Rocha R (2011) História Biogeográfica da Mata Atlântica: Opiliões (Arachnida) como Modelo para a sua Inferência. in Carvalho CJB,

Almeida EAB. *Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos*. org. São Paulo, Roca, 2010. pp.221-238.

Drummond AJ, Suchard MA, Xie D & Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7". *Molecular Biology and Evolution*. "in press"

Eberhard JR, Bermingham E (2005) Phylogeny and comparative biogeography of *Pionopsitta* parrots and *Pteroglossus* toucans. *Mol. Phylogenet. Evol.* **36**: 288-304.

Engel MS (2000) A new interpretation of the oldest fossil bee (Hymenoptera: Apidae). *Am. Mus. Novit.* **3296**: 1–11.

Engel, MS (2006) A giant honey bee from the middle Miocene of Japan (Hymenoptera: Apidae). *Am. Mus. Novit.* **3504**:1–12.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* **8**, 175–185.

Ewing B, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* **8**: 186–194.

Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Acids Res.*, **22**,4673-4680.

Kerr WE, Pizani JF, Aily D (1967) Aplicação de princípios modernos à sistemática do gênero *Melipona*, Illiger, com a divisão em dois subgêneros (Hymenoptera, Apoidea). *Pap. Avulsos Zool.*, **20**, 135-145.

Kerr WE, Carvalho GA, Nascimento VA (1996) Abelha Uruçu: Biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte: Acangaú, 144p.

Lara-Ruiz P, Chiarello AG, Santos FR (2008) Extreme population divergence and conservation implications for the rare endangered Atlantic Forest sloth, *Bradypus torquatus* (Pilosa: Bradypodidae). *Biological Conservation*, **141**, 1332-1342.

Michener, C.D., Grimaldi, D., 1988a. The oldest fossil bee: apoid history, evolutionary stasis, and the antiquity of social behavior. *PNAS - Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 6424–6426.

Michener CD, Grimaldi DA. 1988b. A *Trigona* from late Cretaceous amber of New Jersey (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *Am. Mus. Novit.* **2917**:1–10.

Michener CD (2007) The bees of the world. 2ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD. 992p.

Moure JS (1975) Notas sobre as espécies de *Melipona* descritas por Lepeletier em 1836 (Hymenoptera-Apidae). *Rev. Brasil. Biol.*, **35**, 615-623.

Moure JS (1992) *Melikerria* e *Eomelipona*, dois subgêneros novos em *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera, Apidae). *Naturalia* (edição especial) 62-66.

Moure JS, Camargo JMF (1994). *Melipona*(*Michmelia*) *capixaba*, uma nova espécie de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) do sudeste do Brasil. *Rev. Bras. Zool.* **11** (2): 289-296.

Nascimento VA, Matusita SH, Kerr WE (2000) Evidence of hybridization between two species of *Melipona* bees. *Gen. Mol. Biol.* 23(1): 79-81.

Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Rambaut A, Drummond AJ (2009) Tracer v1.5, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

Ramírez SR, Nieh James C, Quental TB, Roubik DW, Imperatriz-Fonseca VL, Pierce NE (2010) A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Mol. Phyl. Evol.* **56**:519-525.

Rasmussen C, Cameron SA (2010) Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biol. J. Linn. Soc.* **99**:206-232.

Ronquist F, Teslenko M, Mark P van der, Ayres D, Darling A, Hohna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, doi: 10.1093/sysbio/sys029.

Sanderson MJ (2002) Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: A penalized likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 101-109.

Sanderson MJ (2003) r8s: inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of a molecular clock. *Bioinformatics*, 19, 301-302.

Shwarz HF (1932) The genus *Melipona*. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, **63**, 231-460.

Silva JMC, Garda AA (2011) Padrões e processos biogeográficos na Amazônia. in Carvalho CJB, Almeida EAB. *Biogeografia da América do Sul: padrões e processos*. org. São Paulo, Roca, 2010. pp.221-238.

Silveira FA, Melo GAR, Almeida EAB (2002) *Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação*. Belo Horizonte.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.

Tavares MG, Dias LAS, Borges AA, Lopes DM, Busse AHP, Costa RG, Fernandes-Salomão TM, Campos LAO (2007) Genetic divergence between populations of the stingless bee uruçú amarela (*Melipona rufiventris* group,

Hymenoptera, Meliponini): Is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais? *Genet. Mol. Biol.* **30**(3):667-675.

Velthuis HW (1997) Biologia das abelhas sem ferrão. Ed. USP e Universiteit Utrecht. 33p.

Webb SD (1995) Biological implications of the Middle Miocene Amazon Seaway. *Science* **(269)**: 361-362.

Zanella FCV (2011) Evolução da biota da diagonal de formações abertas secas da América do Sul. in Carvalho CJB, Almeida EAB. *Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos*. org. São Paulo, Roca, 2010.

CONCLUSÕES GERAIS

- *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1994, a "uruçu capixaba", é considerada como ameaçada de extinção e seu atual status de ameaça pode ser modificado para a categoria **Em Perigo EN-B1ab(iii)**, segundo os critérios adotados na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas, uma vez que a área de ocorrência da espécie foi estimada em menos de 5.000Km².
- A maioria das colônias remanescentes parece estar atualmente em posse de meliponicultores. No entanto, a atividade de criação carece de amparo legal. Os órgãos de controle e fiscalização devem levar em consideração esse fato, para que não haja prejuízo para a manutenção das colônias remanescentes.
- A hibridação entre as espécies *M. capixaba* e *M. scutellaris* é fato confirmado e parece ocorrer em poucos meses após o contato entre as colônias. As consequências da hibridação são imprevisíveis, mas provavelmente trará impactos negativos para a espécie *M. capixaba*. Por isso, a introdução de colônias de *M. scutellaris* no Espírito Santo deve ser fortemente evitada.
- O gênero *Melipona* Illiger, 1806 é interessante grupo de estudo para o entendimento dos padrões e processos biogeográficos que atuaram na formação e diversificação da biodiversidade Neotropical. Contribui para isso a sua distribuição em quase toda a América do Sul, América Central e México, a antiguidade de sua história evolutiva, datada em aproximadamente 16 Milhões de anos e a diversidade de táxons com ocorrência exclusiva em diferentes ambientes.

ANEXOS

Tabela 1. Latitude sul, longitude oeste, município de origem, altitude do ponto (em metros) e número amostral de colônias em cada um dos 58 pontos de coleta de colônias da abelha *Melipona capixaba* amostradas e utilizadas para os trabalhos do capítulo 1.

PONTO	LATITUDE	LONGITUDE	MUNICIPIO	ALTITUDE	N AMOSTRAL
1	S20°14'42,0"	W41°03'32,4"	Afonso Cláudio	920	1
2	S20°14'45,6"	W41°04'48,0"	Afonso Cláudio	922	2
3	S20°33'25,2"	W40°51'43,2"	Alfredo Chaves	612	1
4	S20°32'56,4"	W40°48'03,6"	Alfredo Chaves	636	7
5	S20°31'55,2"	W40°53'13,2"	Alfredo Chaves	760	3
6	S20°30'21,6"	W40°53'09,6"	Alfredo Chaves	882	1
7	S20°16'22,8"	W41°03'39,6"	Alfredo Chaves	913	2
8	S20°28'55,2"	W40°55'33,6"	Alfredo Chaves	954	2
9	S20°29'31,2"	W40°56'38,4"	Alfredo Chaves	1008	6
10	S20°14'13,2"	W41°18'54,0"	Brejetuba	1041	2
11	S20°21'46,8"	W41°14'42,0"	Conceição	620	3
12	S20°17'13,2"	W41°10'51,6"	Conceição do Castelo	879	1
13	S20°17'02,4"	W41°10'48,0"	Conceição do Castelo	883	1
14	S20°16'44,4"	W41°10'12,0"	Conceição do Castelo	952	3
15	S20°16'01,2"	W41°10'33,6"	Conceição do Castelo	972	2
16	S20°17'24,0"	W41°10'22,8"	Conceição do Castelo	1007	2
17	S20°16'19,2"	W41°16'15,6"	Conceição do Castelo	1087	3
18	S20°16'12,0"	W41°16'19,2"	Conceição do Castelo	1090	2
19	S20°37'13,0"	W41°41'08,0"	Divino de São Lourenço	730	7
20	S20°15'54,0"	W40°53'45,6"	Domingos Martins	866	3
21	S20°15'28,8"	W40°53'45,6"	Domingos Martins	892	5
22	S20°18'36,0"	W41°01'48,0"	Domingos Martins	920	7
23	S20°15'14,4"	W41°02'56,4"	Domingos Martins	939	2
24	S20°15'07,2"	W41°03'32,4"	Domingos Martins	940	2
25	S20°14'34,8"	W40°54'57,6"	Domingos Martins	944	13
26	S20°26'20,4"	W41°01'55,2"	Domingos Martins	969	1
27	S20°26'24,0"	W41°01'55,2"	Domingos Martins	969	1
28	S20°16'48,0"	W41°03'54,0"	Domingos Martins	984	3
29	S20°26'24,0"	W41°01'58,8"	Domingos Martins	993	2

Continuação tabela 1.

31	S20°25'58,8"	W41°02'02,4"	Domingos Martins	998	4
32	S20°27'57,6"	W41°00'10,8"	Domingos Martins	1002	1
33	S20°14'45,6"	W41°03'32,4"	Domingos Martins	1006	1
34	S20°26'42,0"	W41°04'19,2"	Domingos Martins	1020	7
35	S20°26'38,4"	W41°04'22,8"	Domingos Martins	1024	6
36	S20°26'13,2"	W41°01'22,8"	Domingos Martins	1028	3
37	S20°14'49,2"	W41°03'25,2"	Domingos Martins	1037	3
38	S20°24'50,4"	W41°02'20,4"	Domingos Martins	1045	3
39	S20°27'21,6"	W41°00'28,8"	Domingos Martins	1060	2
40	S20°28'40,8"	W41°03'50,4"	Domingos Martins	1078	11
41	S20°23'34,8"	W41°01'40,8"	Domingos Martins	1155	2
42	S20°24'14,4"	W41°01'55,2"	Domingos Martins	1180	2
43	S20°25'25,7"	W40°53'20,6"	Marechal Floriano	882	5
44	S20°10'33,6"	W40°52'58,8"	Santa Maria de Jetibá	994	1
45	S19°56'27,6"	W40°35'20,4"	Santa Teresa	816	2
46	S19°57' 10,8"	W40°36'21,6"	Santa Teresa	852	2
47	S20°33' 54,0"	W40°59'13,2"	Vargem Alta	780	3
48	S20°33' 57,6"	W41°00'36,0"	Vargem Alta	911	1
49	S20°32' 42,0"	W40°59'49,2"	Vargem Alta	913	5
50	S20°32' 13,2"	W40°59'34,8"	Vargem Alta	932	5
51	S20°30' 57,6"	W40°59'13,2"	Vargem Alta	937	3
52	S20°34' 19,2"	W40°57'10,8"	Vargem Alta	942	1
53	S20°31' 01,2"	W40°59'06,0"	Vargem Alta	944	1
54	S20°26' 56,4"	W41°03'39,6"	Venda Nova	1058	3
55	S20°27' 10,8"	W41°03'28,8"	Venda Nova	1060	2
56	S20°18' 57,6"	W41°07'55,2"	Venda Nova do Imigrante	731	3
57	S20°19' 01,2"	W41°09'21,6"	Venda Nova do Imigrante	866	1
58	S20°18' 54,0"	W41°09'28,8"	Venda Nova do Imigrante	898	3
NÚMERO TOTAL DE COLÔNIAS AMOSTRADAS					177

Tabela 2. Referências geográficas dos pontos amostrais das colônias de *Melipona capixaba*, código dos haplótipos e seus respectivos grupos de haplótipos para cada um dos espécimes analisados no capítulo 2.

Grupo	VOUCHER	LAT	LONG	MUNICIPIO*	Haplótipo
1	Mcap05	-20.243	-40.916	Domingos Martins	2
1	Mcap06	-19.953	-40.606	Santa Teresa	2
1	Mcap07	-19.941	-40.589	Santa Teresa	3
1	Mcap08	-20.404	-41.032	Domingos Martins	4
1	Mcap09	-20.414	-41.039	Domingos Martins	4
1	Mcap10	-20.433	-41.034	Domingos Martins	4
1	Mcap11	-20.439	-41.029	Domingos Martins	4
1	Mcap12	-20.437	-41.023	Domingos Martins	4
1	Mcap13	-20.439	-41.032	Domingos Martins	4
1	Mcap14	-20.28	-41.065	Domingos Martins	2
1	Mcap15	-20.393	-41.028	Domingos Martins	2
1	Mcap16	-20.247	-41.057	Domingos Martins	2
1	Mcap17	-20.246	-41.059	Domingos Martins	4
1	Mcap19	-20.245	-41.059	Afonso Cláudio	2
1	Mcap20	-20.252	-41.059	Domingos Martins	2
1	Mcap21	-20.254	-41.049	Domingos Martins	4
1	Mcap24	-20.478	-41.064	Domingos Martins	4
1	Mcap26	-20.27	-41.272	Conceição do Castelo	5
1	Mcap27	-20.316	-41.132	Venda Nova do Imigrante	4
1	Mcap29	-20.363	-41.245	Conceição	6
1	Mcap30	-20.273	-41.061	Alfredo Chaves	7
1	Mcap32	-20.416	-40.907	Marechal Floriano	4
1	Mcap33	-20.482	-40.926	Alfredo Chaves	8
1	Mcap42	-20.453	-41.058	Venda Nova	4
1	Mcap44	-20.29	-41.173	Conceição do Castelo	8
1	Mcap45	-20.287	-41.181	Conceição do Castelo	2
1	Mcap46	-20.284	-41.18	Conceição do Castelo	11
1	Mcap47	-20.279	-41.17	Conceição do Castelo	8
1	Mcap49	-20.267	-41.176	Conceição do Castelo	12
1	Mcap50	-20.315	-41.158	Venda Nova do Imigrante	8
1	Mcap52	-20.258	-40.896	Domingos Martins	2
1	Mcap53	-20.265	-40.896	Domingos Martins	3
2	Mcap01	-20.549	-40.801	Alfredo Chaves	1
2	Mcap02	-20.557	-40.862	Alfredo Chaves	1
2	Mcap04	-20.532	-40.887	Alfredo Chaves	1
2	Mcap34	-20.492	-40.944	Alfredo Chaves	1
2	Mcap35	-20.516	-40.987	Vargem Alta	9
2	Mcap36	-20.517	-40.985	Vargem Alta	9
2	Mcap37	-20.537	-40.993	Vargem Alta	1

Continuação tabela 2.

2	Mcap39	-20.565	-40.987	Vargem Alta	1
2	Mcap40	-20.572	-40.953	Vargem Alta	1
2	Mcap41	-20.566	-41.01	Vargem Alta	10
2	Mcap43	-20.449	-41.061	Venda Nova	9
2	Mcap55	-20.456	-41.008	Domingos Martins	13

* Todos municípios do estado do Espírito Santo

Tabela 3. Referências geográficas dos pontos amostrais das colônias de *Melipona scutellaris*, código dos haplótipos e seus respectivos grupos de haplótipos para cada um dos espécimes analisados no capítulo 2.

GRUPO	VOUCHER	LAT	LONG	MUNICIPIO - ESTADO	HAPLÓTIPO
1	Mscu2	-12.678	-39.04	Cruz das Almas - BA	2
1	Mscu4	-13.084	-39.649	Amargosa - BA	4
1	Mscu10	-12.263	-38.042	Itanagra- BA	12
1	Mscu11	-12.581	-38.015	Praia do Forte - BA	13
1	Mscu12	-12.483	-41.195	Andaraí- BA	12
1	Mscu13	-12.462	-39.462	Santa Terezinha BA	4
1	Mscu14	-12.211	-39.224	Catu BA	14
1	Mscu15	-12.415	-38.193	Camaçari BA	2,12
1	Mscu18	-12.431	-38.328	Pojuca BA	2,12
1	Mscu23	-12.353	-38.379	Catú - BA	12
1	Mscu30	-7.413	-34.833	Pitimbu - PB	24
1	Mscu32	-7.399	-34.911	Alhandra - PB	25
1	Mscu33	-7.413	-34.902	Alhandra - PB	24
1	Mscu34	-7.318	-34.886	Conde - PB	24
1	Mscu35	-7.31	-34.895	Conde - PB	24
1	Mscu61	-8.285	-35.697	Sairé - PE	38
1	Mscu62	-8.288	-35.687	Sairé - PE	38
1	Mscu63	-10.582	-36.96	Japaratuba - SE	40
1	Mscu64	-11.021	-37.202	São Cristóvão - SE	39
1	Mscu66	-10.382	-37.224	N. Sra. Das Dores - SE	41
1	Mscu67	-10.619	-36.841	São Cristóvão - SE	41,42
1	Mscu69	-7.835	-34.905	Igarassu-PE	21
1	Mscu73	-12.809	-39.199	Conceição do Almeida - BA	2
1	Mscu74	-7.8	-35.591	Bom Jardim - PE	45
1	Mscu75	-7.8	-35.591	Bom Jardim - PE	46
1	Mscu76	-7.8	-35.591	Bom Jardim - PE	45
2	Mscu27	-6.967	-35.692	Areia - PB	20
2	Mscu29	-6.7	-35.615	Pilões - PB	23
2	Mscu38	-7.195	-34.816	João Pessoa - PB	26
2	Mscu39	-6.69	-35.091	Rio Tinto - PB	27
2	Mscu40	-6.681	-35.097	Rio Tinto - PB	28
2	Mscu41	-6.657	-35.087	Rio Tinto - PB	28, 29
2	Mscu42	-7.104	-35.799	Matinhas - PB	30
2	Mscu43	-7.134	-35.756	Matinhas - PB	31
2	Mscu44	-7.101	-35.755	Alagoa Nova - PB	32
2	Mscu46	-7.106	-35.766	Alagoa Nova - PB	33
2	Mscu47	-7.108	-35.76	Alagoa Nova - PB	34

Continuação da tabela 3.

2	Mscu48	-7.109	-35.76	Matinhas - PB	34
2	Mscu49	-7.093	-35.772	Alagoa Nova - PB	35
2	Mscu50	-7.094	-35.773	Alagoa Nova - PB	35
2	Mscu51	-6.759	-35.585	Bananeiras - PB	20
2	Mscu52	-6.761	-35.585	Bananeiras - PB	23
2	Mscu53	-6.75	-35.571	Bananeiras - PB	36
2	Mscu54	-6.734	-35.573	Bananeiras - PB	20
2	Mscu55	-6.735	-35.57	Bananeiras - PB	20
2	Mscu56	-6.744	-35.581	Lagoa do Matias - PB	20
2	Mscu57	-6.743	-35.591	Estivas - PB	37
2	Mscu59	-6.726	-35.617	Bananeiras - PB	37
2	Mscu60	-6.713	-35.586	Bananeiras - PB	37
2	Mscu68	-8.73	-35.154	Tamandaré - PE	43
3	Mscu5	-12.798	-41.328	Andaraí - BA	5,6
3	Mscu6	-12.852	-41.313	Andaraí - BA	8
3	Mscu16	-11.33	-41.092	Morro do Chapéu - BA	7,16
3	Mscu71	-12.594	-41.294	Chapada Diamantina - BA	44
3	Mscu7	-12.289	-40.495	Rui Barbosa - BA	9,10
3	Mscu8	-12.082	-41.094	Utinga - BA	11
3	Mscu9	-12.051	-40.495	Jequitibá - BA	10
3	Mscu24	-10.508	-40.321	Campo Formoso - BA	19
3	Mscu25	-11.091	-40.435	Caem - BA	19
3	Mscu28	-11.55	-41.156	Morro do Chapéu - BA	22
4	Mscu1	-12.682	-39.036	São Felix - BA	1
4	Mscu3	-13.001	-39.619	Amargosa - BA	3
4	Mscu17	-13.392	-40.125	Lafaiete Coutinho - BA	17,18
4	Mscu19	-13.441	-40.431	Maracás - BA	1
4	Mscu20	-13.441	-40.431	Maracás - BA	3
4	Mscu21	-13.441	-40.431	Maracás - BA	1
4	Mscu22	-13.426	-40.302	Lajedo do Tabocal - BA	3

Tabela 4. Referências de acessos no GenBank para as espécies de *Melipona* e outras abelhas utilizadas para o enraizamento da árvore filogenética e para a datação molecular – referentes aos capítulos 2 e 4.

Voucher	Espécie	Acessos GenBank			Local (País) de coleta
		CO1	EF1 alpha	POL 2	
MP78	<i>M. scutellaris</i>	EU163152	EU163239	EU162907	Brasil
MP33	<i>M. aff. costaricaensis</i>	EU163134	EU163221	EU162890	Panamá
MP14	<i>M. costaricaensis</i>	EU163121	EU163207	EU162876	Costa Rica
MP21	<i>M. costaricaensis</i>	EU163129	EU163216	EU162885	Panamá
MP1	<i>M. panamica</i>	EU163096	EU163179	EU162848	Panamá
MP86	<i>M. solani</i>	EU163160	EU163247	EU162915	México
MP93	<i>M. sp.</i>	EU163165	EU163252	EU162920	Peru
MP38	<i>M. seminigra atrofulva</i>	EU163138	EU163225	EU162894	Brasil
MP85	<i>M. sp.</i>	EU163159	EU163246	EU162914	Colômbia
MP42	<i>M. fuliginosa</i>	EU163141	EU163228	EU162897	Guiana Francesa
MP32	<i>M. crinita</i>	EU163133	EU163220	EU162889	Panamá
MP92	<i>M. aff. crinita</i>	EU163164	EU163251	EU162919	Peru
MP128	<i>M. grandis</i>	EU163117	EU163203	EU162872	Peru
MP22	<i>M. grandis</i>	EU163130	EU163217	EU162886	Equador
MP97	<i>M. grandis</i>	EU163169	EU163256	EU162933	Peru
MP95	<i>M. illota</i>	EU163167	EU163254	EU162921	Equador
MP34	<i>M. melanoventer</i>	EU163135	EU163222	EU162891	Brasil
MP43	<i>M. captiosa</i>	EU163142	EU163229	EU162898	Guiana Francesa
MP72	<i>M. flavolineata</i>	EU163149	EU163236	EU162904	Bolívia
MP77	<i>M. rufiventris</i>	EU163151	EU163238	EU162906	Brasil
MP15	<i>M. fulva</i>	EU163125	EU163212	EU162881	Guiana Francesa
MP104	<i>Nannotrigona perilampoides</i>	EU163100	EU163184	EU162853	Panamá
MP101	<i>Plebeia frankii</i>	EU163098	EU163181	EU162850	Panamá
MP105	<i>Scaptotrigona polysticta</i>	EU163101	EU163185	EU162854	Brasil
MP100	<i>Tetragonisca angustula</i>	EU163097	EU163180	EU162849	Panamá
MP109	<i>Trigona sp.</i>	EU163105	EU163189	EU162858	Equador
EU53a	<i>Aglae caerulea</i>	EU163091	EU163173	EU162842	Colombia
MP145	<i>Apis andreniformis</i>	EU163123	EU163210	EU162879	China
MP110	<i>Apis cerana</i>	EU163106	EU163190	EU162859	Tailândia
MP112	<i>Apis cerana</i>	EU163108	EU163192	EU162861	Tailândia
MP111	<i>Apis dorsata</i>	EU163107	EU163191	EU162860	Tailândia
MP143	<i>Apis florea</i>	EU163122	EU163209	EU162878	China
MP113	<i>Apis koschevnikovi</i>	EU163109	EU163193	EU162862	Tailândia
MP114	<i>Apis koschevnikovi</i>	EU163110	EU163209	EU162878	Tailândia

Continuação da tabela 4.

MP147	<i>Apis mellifera</i>	AY114457.1	AF015267.1	DQ069332.1	USA
MP146	<i>Bombus transversalis</i>	EU163124	EU163211	EU162880	Peru
MP138	<i>Bombus vagans</i>	EU163120	EU163206	EU162875	USA
MP106	<i>Cephalotrigona zexmeniae</i>	EU163102	EU163186	EU162855	Panamá
MP89	<i>Cephalotrigona</i>	EU163105	EU163189	EU162858	Equador
MP125	<i>Epicharis sp.</i>	EU163161	EU163248	EU162916	Colombia
EU99	<i>Eufriesea caerulea</i>	EU163095	EU163178	EU162847	México
EU15b	<i>Euglossa asarophora</i>	EU163090	EU163171	EU162840	Costa Rica
EU8	<i>Euglossa mixta</i>	EU163094	EU163177	EU162846	Costa Rica
EU70	<i>Euglossa villosa</i>	EU163092	EU163175	EU162844	Guatemala
EU71	<i>Exaerete azteca</i>	EU163093	EU163176	EU162845	México
MP107	<i>Friesella schrottkyi</i>	EU163103	EU163187	EU162856	Brasil
MP108	<i>Frieseomelitta silvestrii</i>	EU163104	EU163188	EU162857	Brasil
MP115	<i>Lestrimelitta danuncia</i>	EU163111	EU163195	EU162864	Panamá

Tabela 5. Referências geográficas das espécies de *Melipona* utilizadas para as interpretações biogeográficas referentes aos capítulos 4.

VOUCHER	Espécie	Localidade de coleta		Coletor
MASI2	<i>M. (Eomelipona) asilvai</i>	Santana do Seridó	RN	Ezequiel
MBIC1	<i>M. (Eomelipona) bicolor</i>	Cataguases	MG	Hugo Werneck
MBIC2	<i>M. (Eomelipona) bicolor</i>	Criciúma	SC	-
MCAP	<i>M. (Michmelia) capixaba</i>	Domingos Martins	ES	Helder Resende
MCRI1	<i>M. (Michmelia) crinita</i>	Embrapa	AC	Rui Peruqueti
MCRI2	<i>M. (Michmelia) crinita</i>	Ramal Nabor Junior	AC	Rui Peruqueti
MCRI3	<i>M. (Michmelia) crinita</i>	Xapuri	AC	Rui Peruqueti
MEBU1	<i>M. (Michmelia) eburnea</i>	Alcobrás	AC	Rui Peruqueti
MEBU2	<i>M. (Michmelia) eburnea</i>	Alcobrás	AC	Rui Peruqueti
MEBU4	<i>M. (Michmelia) eburnea</i>	Xapuri	AC	Rui Peruqueti
MFAS1	<i>M. (Melikerria) fasciculata</i>	Urbano Santos	MA	Helder Resende
MFAS2	<i>M. (Melikerria) fasciculata</i>	Urbano Santos	MA	Helder Resende
MFUS1	<i>M. (Michmelia) fuscopilosa</i>	Xapuri	AC	Rui Peruqueti Antônio
MMAND	<i>M. (Melipona) mandacaia</i>	Juazeiro	BA	Nogueira
MORB1	<i>M. (Melipona) orbigny</i>	Aquidauana	MS	Davi Aidar
MQUI1	<i>M. (Melikerria) quinquefasciata</i>	Diamantina	MG	Flávio
MQUI3	<i>M. (Melikerria) quinquefasciata</i>	Januária	MG	-
MQUI4	<i>M. (Melikerria) quinquefasciata</i>	São João Del Rey	MG	-
MQUI6	<i>M. (Melikerria) quinquefasciata</i>	Chapada do Araripe	CE	Lucio Campos
MSEM	<i>M. (Michmelia) seminigra</i>	Nova Xavantiva	MT	E.F. Lima
MSEMME	<i>M. (Michmelia) seminigra merrillae</i>	Manaus	AM	-
MSP1	<i>M. (Michmelia) flavolineta</i>	São Luis	MA	M. Drummond
MSP2	<i>M. (Michmelia) flavolineta</i>	São Bento	MA	M. Drummond
MSP10	<i>M. sp.</i>	Belém	PA	Josemar Ramos
MSP11	<i>M. sp.</i>	Belém	PA	Josemar Ramos
MSP12	<i>M. sp.</i>	Belterra	PA	Josemar Ramos
MSP14	<i>M. sp.</i>	Ariquemes	RO	Francisco Lisboa
MSP15	<i>M. (Michmelia) flavolineta</i>	Urbano Santos	MA	Helder Resende
MSP16	<i>M. (Michmelia) rufiventris</i>	Catalão	GO	José Eustáquio Jr
MSP18	<i>M. (Michmelia) rufiventris</i>	Catalão	GO	José Eustáquio Jr
MSP19	<i>M. (Michmelia) flavolineta</i>	Urbano Santos	MA	Helder Resende
MSP20	<i>M. (Michmelia) flavolineta</i>	Urbano Santos	MA	Helder Resende
MSP21	<i>M. sp.</i>	Abaetetuba	PA	Josemar Ramos
MSP22	<i>M. sp.</i>	Abaetetuba	PA	Josemar Ramos
MSP23	<i>M. sp.</i>	Abaetetuba	PA	Josemar Ramos
MSP24	<i>M. sp.</i>	Belém	PA	Josemar Ramos
MSP25	<i>M. sp. Grupo rufiventris</i>	Januária	MG	Íris Stanciola
MSP26	<i>M. sp. Grupo rufiventris</i>	Januária	MG	Íris Stanciola
MSP27	<i>M. sp. Grupo rufiventris</i>	Januária	MG	Íris Stanciola

Continuação da tabela 5.

MSP28	<i>M. sp.</i>	Abaetetuba	PA	Josemar Ramos
MSP29	<i>M. sp.</i>	Abaetetuba	PA	Josemar Ramos Francisco
MSP31	<i>M. sp.</i>	Ariquemes	RO	Lisboa
MSP32	<i>M. aff. flavolineata</i>	Novo Acordo	TO	-
MSP33	<i>M. sp.</i>	Belém	PA	Josemar Ramos
MSP34	<i>M. sp.</i>	Belém	PA	Josemar Ramos
MSP35	<i>M. sp.</i>	Belém	PA	Josemar Ramos
MSP37	<i>M. sp.</i>	Belém	PA	Josemar Ramos
MSP38	<i>M. sp.</i>	Belém	PA	Josemar Ramos
MSP40	<i>M. sp. Grupo rufiventris</i>	Dom Bosco I Brasilândia de	MG	Íris Stanciola
MSP42	<i>M. sp. Grupo rufiventris</i>	Minas	MG	Íris Stanciola
MSUB1	<i>M. (Melipona) subnitida</i>	Mossoró	RN	Paulo Menezes
MSUB2	<i>M. (Melipona) subnitida</i>	sertão da Ceará	CE	-
MSUB3	<i>M. (Melipona) subnitida</i>	sertão da Paraíba	PA	Helder Resende