

HENRIQUE BATALHA FILHO

**Distribuição geográfica, filogeografia e história evolutiva da
abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera,
Apidae)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

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

T

B328d
2008

Batalha Filho, Henrique, 1982-

Distribuição geográfica, filogeografia e história evolutiva da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae) / Henrique Batalha Filho. – Viçosa, MG, 2008. ix, 56f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Tânia Maria Fernandes Salomão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Melipona quadrifasciata* - Genética molecular.
 2. Filogeografia. 3. Biogeografia. 4. Marcadores genéticos.
- I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 595.799

HENRIQUE BATALHA FILHO

**Distribuição geográfica, filogeografia e história evolutiva da
abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera,
Apidae)**

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

APROVADA: 29 de julho de 2008

Prof. Ana Maria Waldschmidt
(Co-orientadora)

Prof. Lucio Antonio de Oliveira Campos
(Co-orientador)

Prof. Jorge Abdala Dergam dos Santos

Prof. Fabrício Rodrigues dos Santos

Prof. Tânia Maria Fernandes Salomão
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A orientadora Prof^ª. Tânia Maria Fernandes-Salomão pela orientação, amizade e confiança, em mim depositada, para execução deste estudo.

Ao Prof. Lucio Campos pela orientação, ensinamentos, amizade e conselhos nesta jornada acadêmica.

A Prof^ª. Ana Maria Waldschmidt pela orientação, amizade, conselhos e ensinamentos que vem caminhado desde a minha graduação na UESB.

Ao Prof. Gabriel Melo pela parceria e auxílio na discussão sobre a história evolutiva de *M. quadrifasciata*.

Ao Prof. Jorge Dergam pela amizade e pelas inúmeras sugestões e conselhos acerca deste estudo.

A Prof^ª. Karla Yotoko pelo auxílio na análise de estimativa da coalescência e pelos comentários sobre o estudo.

Aos meus pais pelos ensinamentos, lições de vida e motivação para sempre caminhar buscando alcançar os objetivos.

A minha namorada Edenise pelo companheirismo, incentivo e paciência durante a execução deste trabalho.

Ao meu amigo e irmão Uedson Jacobina pela amizade, acima de tudo, e por fazer parte desta jornada de dois anos em Viçosa, tornando o convívio mais descontraído e menos estressante.

Aos colegas do BIOMOL, sem citar nomes em especial, pelo ótimo convívio, descontração e ajuda durante as inúmeras horas de trabalho.

As inúmeras pessoas que forneceram e/ou coletaram amostras utilizadas neste estudo: Margarete Werneck, Íris, Cabrito, Lorena Nunes, Rogério Alves, Maykon Cristiano, Jorge Verson, Cassius, Marcos Torres, Roberto Cavalcante Paz, Vitor, Uedson Jacobina, Helder Canto, Sebastião Gonzaga e algum outro que eu tenha omitido. Valeu mesmo, sem essas amostras o trabalho não teria o mesmo valor.

Aos amigos de república Hilton, Luiz, Fred, Tião e Edson por tornar melhor o convívio em Viçosa.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

A UFV e ao curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de cursar o mestrado.

Ao PROBIO e FAPEMIG pelo suporte financeiro deste estudo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para execução deste trabalho.

BIOGRAFIA

HENRIQUE BATALHA FILHO, filho de Henrique Barbosa Batalha e Leila Lazarina Machado Fernandes Batalha, nasceu em 28 de novembro de 1982, em Caratinga-MG.

Residente em Governador Valadares, leste de Minas Gerais, concluiu o ensino médio na Escola Estadual Professor Darcy Ribeiro em 1999.

Em abril de 2002, ingressou no curso de bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Genética da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) campus de Jequié, concluindo-o em agosto de 2006.

Em outubro de 2006 ingressou no curso de mestrado do programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa (UFV), concentrando seus estudos em genética de populações e evolução de meliponíneos.

SUMÁRIO

	pág.
RESUMO -----	vi
ABSTRACT -----	viii
INTRODUÇÃO -----	1
REFERÊNCIAS -----	4
OBJETIVOS -----	6
CAPÍTULO 1 -----	7
<i>Abstract</i> -----	9
1. Introduction -----	10
2. Material and Methods -----	11
3. Results -----	13
4. Discussion -----	16
5. Acknowledgments -----	18
6. References -----	19
<i>Legends to Figures</i> -----	21
<i>Figures</i> -----	22
CAPÍTULO 2 -----	25
<i>Resumo</i> -----	26
1. Introdução -----	28
2. Material e Métodos -----	30
3. Resultados -----	36
4. Discussão -----	46
5. Referências -----	51
CONCLUSÕES -----	56

RESUMO

BATALHA-FILHO, Henrique. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2008. **Distribuição geográfica, filogeografia e história evolutiva da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae).** Orientadora: Tânia Maria Fernandes Salomão. Co-orientadores: Ana Maria Waldschmidt e Lucio Antonio de Oliveira Campos.

A abelha *Melipona quadrifasciata*, conhecida popularmente como mandaçaia, apresenta duas subespécies: *M. q. anthidioides* e *M. q. quadrifasciata*. A principal diferença entre as subespécies são as faixas terçais amarelas, que são contínuas em *M. q. quadrifasciata* e descontínuas em *M. q. anthidioides*. A correlação entre a distribuição geográfica e a coloração metassomal e os sítios de restrição do DNA mitocondrial foi caracterizado de ambos morfotipos de *M. quadrifasciata*, como determinado pelos padrões de faixas terçais. Foram examinados exemplares provenientes de um total de 198 localidades no Brasil, e com base na variação observada os exemplares foram distribuídos em quatro classes. A distribuição geográfica de *M. quadrifasciata* observada mostra *M. q. quadrifasciata*, uma forma com faixas terçais contínuas, ocupando a porção sul da distribuição, do Rio Grande do Sul até a metade sul de São Paulo, indo a oeste até a província de Misiones, na Argentina e porção sudeste do Paraguai. A forma com faixas interrompidas, *M. q. anthidioides*, distribuiu-se da metade nordeste de São Paulo até o extremo norte da região da Chapada Diamantina, na Bahia, estendendo-se a oeste pelo Triângulo Mineiro e região central do estado de Goiás. Dois padrões RFLP foram identificados, sendo um presente em *M. q. quadrifasciata*, e o outro em *M. q. anthidioides* e nas populações com padrão de faixas terçais contínuo do norte de Minas Gerais e Sergipe e nordeste da Bahia. Avaliou-se também o padrão filogeográfico das populações de *M. quadrifasciata* ao longo de sua área de distribuição. Para análise filogeográfica foram utilizados 852 pb referentes a parte do gene COI do mtDNA de 145 indivíduos de *M. quadrifasciata* provenientes de 56 localidades dos estados do RS, SC, PR, SP, RJ, MG, ES, BA e SE. Foram identificados 50 haplótipos, com uma diversidade nucleotídica (π) de 0,0055 e uma diversidade haplotípica (H_d) de 0,957. Foi evidenciado, na inferência filogenética e na rede de haplótipos, a presença de

dois clados: o clado sul compreendendo à subespécie *M. q. quadrifasciata*, e o clado norte formado pela subespécie *M. q. anthidioides* e as populações de faixa tergal contínua do norte de Minas Gerais e do Sergipe e nordeste da Bahia. A AMOVA mostrou um percentual de variação entre os clados de 68,56% e um Φ_{ST} de 0,905. A barreira de fluxo gênico, estimada pela SAMOVA, foi localizada próxima ao Vale do Ribeira do Iguape no sul do estado de São Paulo, concordando também com a separação dos clados. A *mismatch distribution* evidenciou gargalos populacionais em ambos clados por meio de distribuição unimodal. O tempo de divergência estimado pela análise de coalescência foi entre 490.000 e 390.000 anos A.P. Outras espécies de abelhas, *M. bicolor* e *M. marginata*, exibem diferenciação morfológica que recebe o status de subespécies, apresentando zona de separação entre as subespécies concordante com *M. quadrifasciata*. Padrões filogeográficos com vicariância semelhante foram reportados para pássaros (*Xiphorhynchus fuscus*) e serpentes (*Bothrops jararaca*).

ABSTRACT

BATALHA-FILHO, Henrique. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2008.

Geographic distribution, phylogeography and evolutionary history of stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). Adviser: Tânia Maria Fernandes Salomão. Co-advisers: Ana Maria Waldschmidt and Lucio Antonio de Oliveira Campos.

Melipona quadrifasciata, regionally known as “mandaçaia”, presents two distinct subspecies: *M. quadrifasciata anthidioides* and *M. quadrifasciata quadrifasciata*. They differ in the yellow tergal stripes, which are continuous in *M. q. quadrifasciata* and discontinuous in *M. q. anthidioides*. The correlation between geographic distribution and metasomal coloration was investigated and characterized the restriction sites in the mtDNA of both morphotypes of *M. quadrifasciata*, as determined by the tergal stripes patterns. Specimens from 198 localities were examined, and the variation observed in the pattern of tergal stripes was grouped into four distinct classes. The distribution pattern of *M. quadrifasciata* found in the present work agrees with the previously reported pattern for this species, i.e., *M. q. quadrifasciata*, a form characterized by continuous tergal stripes, inhabits the southern portion of the distribution, from Rio Grande do Sul to southern São Paulo, including Misiones, in Argentina, and southeastern Paraguay to the west, whereas *M. q. anthidioides*, a form with interrupted stripes, occurs from northeastern São Paulo to the northern portion of Diamantina Plateau, in Bahia, and westwards to the western tip of Minas Gerais and central portion of the Goiás State. The data of RFLP showed two restriction patterns, one present in *M. q. quadrifasciata*, and another in *M. q. anthidioides* and in populations with continuous tergal stripes from northern Minas Gerais and northeastern Bahia and Sergipe. The phylogeography was evaluated across its range of *M. quadrifasciata* populations. Using 852 bp of mtDNA COI gene of 145 individuals from 56 localities of RS, SC, PR, SP, RJ, MG, ES, BA and SE states in Brazil. Fifty haplotypes were identified with a nucleotide diversity (π) of 0,0055 and a haplotypic diversity (H_d) of 0,957. The phylogenetic analysis showed the presence of two clades: the south clade comprising the subspecies *M. q. quadrifasciata*, and the north clade formed by the subspecies *M. q. anthidioides* and the populations with continuous tergal

stripes from northern Minas Gerais and northeastern Bahia and Sergipe. AMOVA showed a percentage of variation between the clades of 68,56% and a Φ_{ST} 0,905. The barrier of gene flow, estimated with SAMOVA, was located close to Ribeira do Iguape River Valley in the south of the State of São Paulo. The unimodal mismatch distribution suggested bottleneck events affecting both clades. Coalescence analysis estimated time of divergence estimated between 490.000 and 390.000 years B.P. Other species of *Melipona* of the Atlantic forest, *M. bicolor* and *M. marginata*, also present subspecies that display morphological differences along north-south ranges that match the distribution of *M. q. quadrifasciata* and *M. q. anthidioides*. Concordant phylogeographic patterns have been reported for other animal groups, as birds (*Xiphorhynchus fuscus*) and serpents (*Bothrops jararaca*).

INTRODUÇÃO

O maior grupo da ordem Hymenoptera é o Aculeata, que inclui as vespas, abelhas e formigas. As abelhas e as vespas esfecídeas constituem a superfamília Apoidea, que se divide em dois grupos, sendo um deles o Apiformes que compreende as abelhas. Os Apiformes, em sua grande maioria, têm como característica a dependência da coleta de pólen nas flores como uma fonte de proteína para alimentar suas larvas (Michener, 2000).

As abelhas constituem os agentes polinizadores mais adaptados à visita das flores das Angiospermas. Suas relações baseiam-se em um sistema de dependência recíproca, onde as plantas fornecem o alimento para as abelhas, principalmente pólen e néctar, e em troca recebem os benefícios da transferência de pólen (Kevan & Baker, 1983; Proctor et al., 1996).

A tribo Meliponini, que inclui todas as “abelhas indígenas sem ferrão”, apresentam uma ampla distribuição nas regiões tropicais do mundo, bem como nas regiões subtropicais do hemisfério sul e todas as espécies são eussociais (Michener, 2000). Segundo Michener (2000) foram descritas cerca de 375 espécies dentro de 23 gêneros, embora o autor relate a existência de mais espécies, sendo o Brasil um dos principais locais de ocorrência dessas abelhas. Dentre os meliponíneos *Melipona* é o gênero com maior número de espécies, cerca de 69, e ocorre em toda a região neotropical, distribuindo-se desde o México até Misiones na Argentina sendo mais diversificado na bacia amazônica (Silveira et al., 2002; Camargo & Pedro, 2007).

Os meliponíneos são muito frágeis quando expostos à destruição de seus habitats, pelo fato da maioria das espécies nidificarem em ocos de árvores que vêm sendo intensamente derrubadas. Estes insetos também são muito suscetíveis à redução do tamanho populacional, no sentido de que processos endogâmicos podem levar a conseqüências danosas, como o aumento na produção de machos diplóides por meio de cruzamentos endogâmicos (Kerr et al., 1996).

Melipona quadrifasciata, popularmente conhecida como mandaçaia, é descrita como distribuindo-se ao longo da costa leste brasileira, indo do Rio Grande do Sul até a Paraíba (Moure & Kerr, 1950). Tradicionalmente, duas subespécies distintas são reconhecidas, *M. quadrifasciata anthidioides* e *M.*

quadrifasciata quadrifasciata. A principal diferença entre elas são as bandas terçais amarelas do 2º ao 5º segmento, que são contínuas em *M. q. quadrifasciata* e descontínuas em *M. q. anthidioides* (Schwarz, 1932).

A existência de colônias com padrão de faixas abdominais contínuas, semelhantes a *M. q. quadrifasciata*, em regiões fora da área de ocorrência da subespécie do sul do Brasil tem sido relatada. Nogueira-Neto (1970) relata ter recebido exemplares de manducaia oriundos de Carira, no Sergipe, que apresentam padrão de faixas terçais semelhantes a *M. q. quadrifasciata*. Melo & Campos (1987) relataram a ocorrência de colônias com padrão de faixas terçais contínuo semelhante a subespécie do sul do Brasil na região de Januária, no norte do Estado de Minas Gerais, em regiões com clima semi-árido. Esses relatos mostram a possível existência de populações com faixas terçais contínuas, disjuntas das populações de *M. q. quadrifasciata* do sul do Brasil.

Poucos estudos moleculares têm sido documentados para *M. quadrifasciata*. Waldschmidt et al. (2000), estudando as subespécies de *M. quadrifasciata*, detectaram um marcador PCR-RAPD presente *M. q. quadrifasciata* e ausente em *M. q. anthidioides*. Waldschmidt et al. (2002), ainda analisando populações de *M. quadrifasciata* utilizando marcadores PCR-RAPD, observaram a formação de dois grupos geneticamente distintos, sendo um composto por *M. q. quadrifasciata* e o outro por *M. q. anthidioides*. Moretto & Arias (2005) detectaram padrões de restrição do mtDNA distintos entre as duas subespécies. Souza et al. (2008) analisaram 155 colônias de *M. quadrifasciata* distribuídas entre as duas subespécies por meio de padrões RFLP do gene citocromo b e encontrou associação entre os padrões RFLP e a diferença das faixas terçais entre as subespécies.

Nos estudos de Waldschmidt et al. (2000, 2002) duas colônias de Januária com padrão de faixas terçais contínuo foram analisadas e apresentaram similaridade genética com *M. q. anthidioides*. Entretanto, nestes estudos a relação entre o padrão de faixas terçais e similaridade genética não foi explorada, e a amostragem foi reduzida. Assim, estudos populacionais mais detalhados sobre a espécie se fazem necessários.

A determinação de padrões biogeográficos permite formular hipóteses sobre como a distribuição dos organismos se alterou à medida que as histórias

evolutivas das linhagens ocorriam sobre a superfície da terra em constante mudança.

A determinação da distribuição geográfica de espécies é importante, pois os limites de sua ocorrência e o panorama de sua distribuição podem ser utilizados como subsídios para implementação de programas de manejo e conservação das espécies. Além disso, o entendimento do tamanho da área de distribuição, a localização de seus limites e a mudança dos padrões de abundância dentro dos limites reflete a dinâmica das populações, bem como a influência das condições do ambiente na sobrevivência, na reprodução e na dispersão dos indivíduos, constituem características úteis para o estabelecimento de programas de conservação da espécie (Brown & Lomolino, 2006).

A filogeografia é a ciência que estuda a distribuição de linhagens evolutivas para o entendimento evolucionário de um táxon (Avice et al., 1987). Vários estudos com enfoque filogeográfico têm explicado princípios e processos determinantes da distribuição geográfica de linhagens geneticamente relacionadas, especialmente as relacionadas ao nível intraespecífico como dispersão e vicariância. Populações isoladas são grandes candidatas a adaptações genéticas diferentes, pois cada uma pode ter estado submetida a pressões de seleção divergentes sem influência homogenizante do fluxo gênico (Avice et al., 1987; Avice, 2000).

O DNA mitocondrial tem-se mostrado muito útil para estudos de filogeografia com animais pelo fato de ser uma herança exclusivamente materna, apresentar um modo de herança sem recombinação, evoluir rapidamente, e possuir um extensivo polimorfismo intraespecífico (Avice et al., 1987).

Nesse contexto, propõe-se estudar com base em seqüências do DNA mitocondrial o padrão filogeográfico das populações de *Melipona quadrifasciata* ao longo de sua área de distribuição, com intuito de compreender os padrões biogeográficos e evolutivos deste importante polinizador.

REFERÊNCIAS

- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 489–522.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University press, Cambridge, Massachusetts.
- Brown JH, Lomolino MV (2006) *Biogeografia*. 2ª ed. Trad: Iulo Feliciano Afonso. FUNPEC Editora, São Paulo, Ribeirão Preto.
- Camargo JMF, Pedro SMR (2007) Meliponini. In: *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region* (orgs Moure JS, Urban D, Melo GAR), pp. 272–578. Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia.
- Kerr WE, Carvalho GA, Nascimento VA (1996) *Abelha urucu: biologia, manejo e conservação*. Fundação Acangau, Belo Horizonte. p.143
- Kevan PG, Baker HG (1983) Insects as flower visitors and pollinators. *Annual Review of Entomology*, **28**, 407–453.
- Melo GAR, Campos LAO (1987) Variação no padrão de faixas na população de *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1936 no Estado de Minas Gerais (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Anais do XIV Congresso Brasileiro de Zoologia, Juiz de Fora, Minas Gerais. p.76
- Michener CD (2000) *The bees of the world*. The Johns Hopkins University press, Baltimore and London.
- Moreto G, Arias MC (2005) Detection of mitochondrial DNA restriction site differences between the subspecies of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Neotropical Entomology*, **34**, 381–385.
- Moure JS, Kerr WE (1950) Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apoidea). *Dusenya*, **1**, 105–129, + 2 estampas.
- Nogueira-Neto P (1970) *A criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae)*. 2ª ed. São Paulo, Editora Tecnapis.
- Proctor M, Yeo P, Lack, A (1996) *The natural history of pollination*. London, Harper Collins Publishers.

- Schwarz H (1932) The genus *Melipona* IV. The type genus of the Meliponidae or stingless bees. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **63**, 231–460.
- Silveira FA, Melo GAR, Almeida EAB (2002) *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. Fundação Araucária, Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Souza RO, Moretto G, Arias MC, Del Lama MA (2008) Differentiation of *Melipona quadrifasciata* L. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) subspecies using cytochrome b PCR-RFLP patterns. *Genetics and Molecular Biology*, **30**, 445–450.
- Waldschmidt AM, Barros EG, Campos LAO (2000) A molecular marker distinguishes the subspecies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Genetics and Molecular Biology*, **23**, 609–611.
- Waldschmidt AM, Marco-Júnior P, Barros EG, Campos LAO (2002) Genetic Analysis of *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) with RAPD markers. *Brazilian Journal Biology*, **62**, 923–928.

OBJETIVOS

- Avaliar a distribuição geográfica de *M. quadrifasciata*, bem como identificar a área de ocorrência das populações disjuntas de *M. q. quadrifasciata*, com padrão de faixas terçais contínuo;
- Caracterizar o gene COI do DNA mitocondrial com base em padrões RFLP das diferentes formas de *M. quadrifasciata*;
- Identificar e caracterizar subdivisões geográficas em populações de *M. quadrifasciata*;
- Inferir sobre os processos históricos que atuaram sobre esta espécie, bem como comparar os padrões encontrados com outras espécies animais;
- Propor uma hipótese biogeográfica que explique a diversificação em *M. quadrifasciata*.

Capítulo 1

Geographic distribution and differentiation in the color pattern of abdominal stripes of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae)

Geographic distribution and differentiation in the color pattern of abdominal stripes of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae)

Henrique Batalha-Filho¹, Gabriel A. R. Melo², Ana M. Waldschmidt³, Lucio A. O. Campos¹ and Tânia M. Fernandes-Salomão^{1*}

1. Univ. Fed. Viçosa, Dept. Biol. Geral, BR-36570000 Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

2. Univ. Fed. Parana, Dept. Zool., Lab. Biol. Comparada Hymenoptera, Caixa Postal 19020, BR-81531980 Curitiba, Paraná, Brazil.

3. Univ. Est. Sudoeste Bahia, Dept. Ciênc. Biol., BR-45200000 Jequié, Bahia, Brazil.

*Author for correspondence, email: fernands@ufv.br

Abstract

Melipona quadrifasciata, regionally known as “mandaçaia”, present two distinct subspecies: *M. quadrifasciata anthidioides* and *M. quadrifasciata quadrifasciata*. The main difference between both subspecies refers to the yellow tergal stripes which are continuous in *M. q. quadrifasciata* and discontinuous in *M. q. anthidioides*. This study investigated the geographic differentiation in the metasomal coloration and characterized the restriction sites in the mtDNA of both morphotypes of *M. quadrifasciata*, as determined by the tergal stripes patterns. Specimens from 198 localities were examined, and the variation observed in the pattern of tergal stripes was grouped into four distinct classes. The distribution pattern of *M. quadrifasciata* found in the present work agrees with the previously reported pattern for this species, i.e., *M. q. quadrifasciata*, a form displaying continuous tergal stripes, inhabits the southern portion of the distribution, from Rio Grande do Sul to southern São Paulo, including Misiones, in Argentina, and southeastern Paraguay to the west, whereas *M. q. anthidioides*, a form with interrupted stripes, ranges from northeastern São Paulo to the northern portion of Diamantina Plateau, in Bahia, and westwards to the western tip of Minas Gerais and central portion of the Goiás state. It is consistently documented for the first time the distribution pattern of populations with continuous stripes and inhabiting clearly disjunct areas in relation to *M. q. quadrifasciata*— one in northern Minas Gerais and another in northeastern Bahia and Sergipe. The data of RFLP showed two restriction patterns, one present in *M. q. quadrifasciata*, and another in *M. q. anthidioides* and in populations with continuous tergal stripes from northern Minas Gerais and northeastern Bahia and Sergipe. The geographic differentiation of *M. quadrifasciata*, bearing forms with distinct tergal stripe patterns at different regions, reflects a complex evolutionary history. The complexity in the observed patterns suggests the occurrence of repeated events of geographical isolation, followed by range expansion, that occurred probably during the cycles of climatic changes in the Pleistocene. Phylogeographic studies based on mtDNA haplotypes should be accomplished, with the intention of elucidating the geographic differentiation exhibited by this bee species.

1. Introduction

The stingless bee *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, regionally known as “mandaçaia” in Brazil, is widespread throughout eastern Brazil, from Rio Grande do Sul to Paraíba states and extending westward to Misiones, in Argentina, and southeastern Paraguay (Moure & Kerr, 1950). Traditionally, this species has been divided into two distinct subspecies: *M. quadrifasciata anthidioides* and *M. quadrifasciata quadrifasciata*. The main difference between the subspecies refers to the yellow tergal stripes from the 2nd to 5th tergum in workers and males, which are continuous in *M. q. quadrifasciata* and discontinuous in *M. q. anthidioides* (Ducke, 1916; Schwarz, 1932).

The subspecies *M. q. quadrifasciata* is found in colder regions, comprising the southern portion of São Paulo, through Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul in the south (Kerr, 1951). The subspecies *M. q. anthidioides* is found from northern and northeastern São Paulo state, eastward up to Paraíba (Kerr, 1951). In the state of São Paulo and southern Minas Gerais there is a hybridization zone between the two subspecies, where intermediary patterns of yellow tergal stripes are detected (Moure & Kerr, 1950; Kerr, 1951).

The occurrence of populations bearing continuous abdominal stripes, similar to the color pattern exhibited by *M. q. quadrifasciata*, in areas outside the distribution range of this subspecies, is known for more than 30 years. Nogueira-Neto (1970) stated that he had received specimens of *M. quadrifasciata* from Carira, in Sergipe, displaying a pattern of tergal stripes similar to that of *M. q. quadrifasciata*. Also, Melo & Campos (1987) reported bee colonies with continuous tergal stripes, similar to the subspecies from southern Brazil, from areas under semi-arid climate in northern Minas Gerais.

Some studies have showed a molecular differentiation between the subspecies of *M. quadrifasciata*. Waldschmidt et al. (2000) detected a RAPD-PCR marker, present in *M. q. quadrifasciata* and absent in *M. q. anthidioides*. Waldschmidt et al. (2002), in a further population study of *M. quadrifasciata* using RAPD markers, observed two genetically distinct groups, one comprising *M. q. quadrifasciata* and another composed of *M. q. anthidioides*. In both studies, the samples from Januária, northern Minas Gerais, and bearing continuous tergal stripes, clustered with *M. q. anthidioides*.

In stingless bees, analyses of mitochondrial DNA (mtDNA) by RFLP have showed differences at both inter- and intra-specific levels. Francisco et al. (2001) characterized the mtDNA of five species of *Plebeia* using RFLP and detected differences in the restriction sites among them. Fernandes-Salomão et al. (2002) analyzed, via RFLP, the mtDNA of 16 species of *Melipona*, revealing differences among each species. Moretto & Arias (2005) observed distinct RFLP profiles in the mtDNA between the two subspecies of *M. quadrifasciata*. De la Rúa et al. (2007) analyzed the differences in the RFLP pattern and sequences comprising the ITS2 ribosomal region in the nuclear DNA of *Melipona beecheii* and *M. yucatanica* and they also found intra-specific variation in both species.

The goal of the present work is to investigate the geographic differentiation in the metasomal coloration and characterize the restriction sites in the mtDNA of both morphotypes of *M. quadrifasciata*, as determined by the tergal stripe patterns, in order to achieve a better understanding of the evolution of their biogeographic pattern.

2. Material and Methods

2.1 Geographic distribution of the metasomal yellow stripe patterns

Data regarding collecting localities and the pattern of tergal stripes in *Melipona quadrifasciata* were gathered from material deposited in the entomological collections of the Museu de Zoologia at Universidade de São Paulo (in January 21, 1987, by GARM), Coleção Entomológica J. S. Moure at Universidade Federal do Paraná (in February 04, 1988, by GARM and January 15, 2008, by GARM and HBF), Coleção P. Nogueira-Neto at the Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (in July 18, 1988, by GARM), Coleção Camargo at Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras of Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (in November 15, 1991, by GARM), and Museu de Entomologia at Universidade Federal de Viçosa (examined by GARM and HBF in several occasions). Data from recently collected samples in northern Minas Gerais, Bahia and Sergipe, and deposited in the entomological collection of the apiary at Universidade Federal de Viçosa, were also included. Data on Argentinean and Paraguayan samples were taken from Holmberg (1903),

Bertoni (1911) and Cockerell (1919). The geographic records for *Melipona mandacaia* Smith were obtained from specimens deposited in the collection at Universidade Federal do Paraná.

The variation observed in the pattern of tergal stripes was grouped into four distinct classes (Figure 1). Class A represents the pattern in which each yellow stripe is largely interrupted (Figure 1A), corresponding to the so-called *M. q. anthidioides*; class B also presents an interrupted pattern, but the distance between each half band is smaller than that in class A (Figure 1B); class C, represents the hybrid pattern between the extreme forms (Figure 1C); and class D comprises the pattern where the yellow stripes are continuous, corresponding to the pattern found in *M. q. quadrifasciata* (Figure 1D). A few specimens bearing a variant pattern, intermediate between classes A and B, were observed; for practical purposes, they were included in class A. Also, specimens with continuous stripes but displaying a small medial interruption in tergum II were included in class D. The recognition of the hybrid pattern and intermediate forms were based on several controlled crosses (G. A. R. Melo & L. A. O. Campos, unpublished data).

Representative specimens of the four classes of tergal stripe patterns were photographed using a Leica DFC 500 digital camera attached to a stereomicroscope Leica MZ 16. Images were captured using the software IM 50 (Image Manager) and combined using the software Auto-Montage Pro 5.03.0040.

Geographic coordinates for the localities cited in the collecting labels were obtained using the geo-referencing tool *geoLoc* provided by the Centro de Referência em Informação Ambiental - CRIA, available at <http://smlink.cria.org.br/geoloc>. Preference was given to coordinates provided by IBGE. Locality coordinates for recent samples, mainly in northern Minas Gerais, Bahia and Sergipe, were obtained in the field using a GPS device. A map of the geographic distribution was generated using the software Arcview Gis 3.2a.

2.2 RFLP analysis

The samples of *M. quadrifasciata* used in the present work were collected and stored in absolute ethanol and kept frozen at -80°C up to their

utilization. A worker bee from each of the following localities was analyzed: Itaiópolis (SC) and Porto Alegre (RS), representing *M. q. quadrifasciata*; Caeté (MG), Viçosa (MG) and Jequié (BA), representing *M. q. anthidioides*; Urucuia and Januária, comprising the population with continuous stripes from northern Minas Gerais; Brejão and São Cristóvão, in Sergipe, representing the population with continuous stripes from northeastern Bahia and Sergipe.

The DNA extraction followed the procedure reported by Fernandes-Salomão et al. (2005) and the samples were quantified in 0.8% agarose gel, in order to check the amount and the quality of DNA samples. A region encompassing the mtDNA COI gene was amplified, using the primers mtD7 (5' GGATCACCTGATATAGCATTCCC 3') and COI-IIR (5' GATCAATATCATTGATGACC 3') described by Simon et al. (1994) and Hall & Smith (1991), respectively.

The PCR reactions comprised 50ng of genome DNA, 5 µL of buffer (Promega), 3 µL of MgCl₂ (25 mM), 1.5 µL of each primer (20 µM), 5 µL of dNTPs (100mM) and 2 U of *GoTaq* DNA polymerase (Promega) and water to a final volume of 50 µL. Each reaction was carried out in a PTC-100 thermocycler (MJ Research, Inc.), programmed to an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles at 94°C for 1 min, 45°C for 1 min and 64°C for 2 min, plus a final extension step at 64°C for 10 min.

The amplified DNA fragment was digested with the enzymes *DraI*, *EcoRI*, *HinfI*, *Mbol*, *PstI*, *Scal*, *XbaI* and *XhoI*. The digestion reaction was performed at 37°C for lasted 6h, and the digested products were run in 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and photodocumented under UV light.

3. Results

3.1 Geographic distribution and differentiation in the tergal stripe patterns

Specimens from 198 localities in Brazil were examined, comprising the entire area of occurrence of *M. quadrifasciata*. The distribution records are shown in Figure 2, each one represented by the symbol corresponding to the pattern of tergal stripes herein recognized. The distribution records for *M. mandacaia* are also shown in Figure 2.

In general, the distribution pattern of *M. quadrifasciata* found in the present work agrees with the previously reported pattern for this species, i.e., *M. q. quadrifasciata*, a form displaying continuous tergal stripes, inhabits the southern portion of the distribution, from Rio Grande do Sul to southern São Paulo, including Misiones, in Argentina, and southeastern Paraguay to the west, whereas *M. q. anthidioides*, a form with interrupted stripes, ranges from northeastern São Paulo to the northern portion of Diamantina Plateau, in Bahia, and westwards to the western tip of Minas Gerais and central portion of the Goiás state.

Regarding the distribution pattern reported by previous authors, two main differences should be pointed out: (1) Samples bearing interrupted stripes were not observed in the states of Alagoas, Pernambuco and Sergipe, as shown in Kerr (1951); (2) It is consistently documented for the first time the distribution pattern of populations with continuous stripes and inhabiting clearly disjunct areas in relation to *M. q. quadrifasciata*, one in northern Minas Gerais and another in northeastern Bahia and Sergipe (Figure 2).

Both northern populations exhibiting a pattern of continuous stripes are associated with the basin of the São Francisco river. The former population is apparently restricted to areas of arboreal Caatinga along the middle São Francisco and some of its tributaries in Minas Gerais, such as the Verde river, on the right margin, and Urucuia river, on the left margin, while the latter population occupies Caatinga forests near the mouth of the São Francisco river. It is noteworthy that both populations inhabit areas contiguous with the southern and northern limits of the distribution of *M. mandacaia*, a species occurring along the middle to the upper São Francisco (Figure 2).

The contact zones between populations of *M. quadrifasciata* bearing contrasting patterns of tergal stripes were recognized through the presence of hybrid forms (black triangles in Figure 2). As previously shown by Kerr (1951), the hybridization zone between *M. q. quadrifasciata* and *M. q. anthidioides* occupies the central region of the state of São Paulo, along the main channel of the Tietê river (Moure, 1975), and apparently extending to the west up to eastern Mato Grosso do Sul. The hybridization zone between *M. q. anthidioides* and the morphotype with continuous stripes found in the northern portion of the distribution extends along a relatively narrow area in northeastern Bahia.

In relation to the population with continuous stripes in northern Minas Gerais, no specimens that could indicate hybridization with *M. q. anthidioides* were identified, although the occurrence of specimens with a hybrid phenotype in Três Marias, in central Minas Gerais, might be regarded as an evidence of contact between these populations. Individuals displaying a hybrid phenotype were also found in populations from the western tip of Minas Gerais and Goiás, in areas relatively far from the hybridization zone in São Paulo. In populations of *M. q. anthidioides* from northeastern Minas Gerais and southwestern Bahia, specimens exhibiting the class B phenotype were found in a few dispersed localities (Figure 2).

Based on the distribution pattern shown in Figure 2, it seems that *M. q. anthidioides* is associated with higher altitude areas along the mountain ranges in Minas Gerais, Espírito Santo and Bahia, and absent from the lowlands in northern Espírito Santo and southern Bahia, as well as from lower altitude areas in the upper São Francisco river.

3.2 RFLP Analysis

A fragment of about 1700bp, encompassing the mtDNA COI gene of each specimen was amplified and digested. From the eight enzymes tested, *EcoRI*, *PstI*, *Scal*, *XbaI* and *XhoI* failed in digesting the amplified DNA fragment, while the other provided restriction fragments. The restriction pattern after digestion with *DraI* was identical in all samples, while *HinfI* and *MboI* generated polymorphic profiles.

Five restriction fragments (970, 240, 190, 180, 120) were produced by the enzyme *DraI*, corresponding to four restriction sites, similar in all analyzed samples. The enzyme *HinfI* generated two restriction patterns: (A) one restricted to samples of *M. q. quadrifasciata*, corresponding to the localities Itaiópolis and Porto Alegre; and (B) another present in the remaining studied localities (Caeté, Viçosa, Jequié, Urucuia, Januária, Brejão and São Cristóvão) with fragments (Table 1). Polymorphic profiles were obtained by the enzyme *MboI*, following the pattern seen with *HinfI*: one pattern was found in samples of *M. q. quadrifasciata* (A), and the second pattern was present in the remaining localities (B) (Table 1).

The RFLP data are only partially congruent with the geographic distribution of the tergal color patterns. The samples with continuous stripes belonging to *M. q. quadrifasciata* presented distinct restriction patterns in relation to those from the other analyzed samples. The samples bearing continuous stripes from northern Minas Gerais and northeastern Bahia and Sergipe, however, exhibited the same restriction pattern observed in samples of *M. q. anthidioides*.

4. Discussion

Melipona quadrifasciata has one of the largest geographic distributions among species of *Melipona*, inhabiting a large area along eastern Brazil. This species is mainly associated with the Atlantic Forest along its southern distribution range and with Cerrado (Brazilian savannah) and seasonal forests in the northern portion of its distribution. Its occurrence in such distinct biomes reveals a successful history of survival and reproduction under diverse climatic conditions and vegetation when compared to other species of *Melipona*. The occupation of mesic environments, covered by humid forests, can be regarded as a derived feature exhibited by this species. The species of the subgenus *Melipona* (*Melipona*), group to which *M. quadrifasciata* belongs to, inhabit mainly dry and seasonal forests, such as for instance *M. mandacaia* in northeastern Brazil (G.A.R. Melo, unpublished data).

The geographic differentiation of *M. quadrifasciata*, bearing forms with distinct tergal stripe patterns at different regions, reflects a complex evolutionary history. The maintenance of two distinguishable patterns of metasomal coloration between *M. q. quadrifasciata* and *M. q. anthidioides* has been related to recent ecological features, such as adaptation to distinct climatic conditions (Kerr 1951; Moure 1975; Camargo & Pedro 2007). However, the occurrence of additional populations bearing continuous tergal stripes in two separate regions suggests that vicariant historical events might have taken place. Based on the present scenario, these disjunct populations bearing continuous stripes would represent remaining descendants of a larger population that became fragmented.

This hypothesis is supported by comparisons between *M. quadrifasciata* and *M. mandacaia*. Within *M. (Melipona)*, *M. mandacaia* is the closest species to *M. quadrifasciata* and, based on several morphological similarities found in workers and males and nest architecture, they can be considered sister-species (G.A.R. Melo, unpublished data). Similarly to other species of *M. (Melipona)* that possess tergal stripes, *M. mandacaia* displays continuous yellow stripes, indicating that the occurrence of such condition in *M. quadrifasciata* should be considered a plesiomorphy, thereby justifying giving those forms with continuous metasomal stripes the status of remaining populations. The presence of a single form possessing interrupted stripes, *M. q. anthidioides*, would be a result of a more recent differentiation within this group. The continuous geographic distribution of *M. q. anthidioides* within the central portion of the species range provides additional support to this hypothesis.

The separation between *M. q. quadrifasciata* and the other populations, as indicated by RFLP profiles using the enzymes *HinfI* and *MboI*, is in agreement with the results of Waldschmidt et al. (2000, 2002), who found a RAPD marker present in *M. q. quadrifasciata* and absent in *M. q. anthidioides*, as well as with Moretto & Arias (2005) who also distinguished both subspecies based on distinct RFLP patterns.

As observed by Waldschmidt et al. (2000, 2002), the samples with continuous stripes from northern Minas Gerais, and, in the present study, also from northeastern Bahia and Sergipe, were not genetically different from samples of *M. q. anthidioides*. The molecular data suggest that the differentiation process first involved a split between the southern populations, giving rise to *M. q. quadrifasciata*, and those found in the northern portion of the species range. The differentiation of the form with interrupted stripes, corresponding to the subspecies *M. q. anthidioides*, in relation to populations bearing continuous stripes in northern Minas Gerais and northeastern Bahia and Sergipe, would represent a more recent event.

The available evidence does not allow for a more precise estimate of when the differentiation process in *M. quadrifasciata* has started. The complexity in the observed patterns suggests the occurrence of repeated independent events of geographical isolation, followed by range expansion. Other species of *Melipona* from the Atlantic forest, such as *M. bicolor* and *M.*

marginata, also present morphological differences over their ranges, in the north-south direction, and these distinct forms have been regarded as subspecies (Camargo & Pedro 2007). A similar differentiation has been reported in other animal groups, as in birds of the genus *Xiphorhynchus* (Cabanne et al. 2007). Probably, these events took place more recently in the evolutionary history of these species of *Melipona*, most likely during the cycles of climatic changes in the Pleistocene, as revealed in *Xiphorhynchus fuscus* by Cabanne et al. (2007).

The identification of populations bearing continuous yellow stripes and isolated in the northern portion of the species range could indicate that additional subspecies of *M. quadrifasciata* should be recognized in order to give them a taxonomical status congruent with the differentiation pattern observed for the species. Phylogeographic studies using mtDNA haplotypes, however, are still required to elucidate the phylogeographic pattern of populations and define whether phylogroups are present or not within this species. Preliminary data from mtDNA sequences (H. Batalha-Filho, unpublished data) indicate promising results for such approach.

5. Acknowledgments

The authors are grateful to Lorena A. Nunes and Rogério M. O. Alves for collecting some of the samples, to Lisiane D. Wendt (Taxonline) for the assistance in the image capture and using the software Automontage, to CNPq for the grant to the HBF and FAPEMIG for the financial support.

6. References

- Bertoni A.W. 1911. Contribución á la biología de las avispas y abejas del Paraguay (Hymenoptera). An. Mus. Nac. Hist. Nat. B. Aires, ser.3, 15: 97–146.
- Cabanne G.S., Santos F.R. and Miyaki C.Y. 2007. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. Bio. Jour. Lin. Soc. 91: 73-84.
- Camargo J.M.F. and Pedro, S.M.R. 2007. Meliponini. In: Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region (Moure J.S., Urban D. and Melo, G.A.R., Orgs), Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia. pp. 272-578.
- Cockerell T.D.A. 1919. Bees in the collection of the United States Museum - 3. Proc. U. S. Nat. Mus. 55: 167–221.
- De La Rúa P., May-Itzá W.de, Serrano J. and Quezada-Euán, J.J.G. 2007. Sequence and RFLP analysis of the ITS2 ribosomal in two Neotropical social bees, *Melipona beecheii* and *Melipona yucatanica* (Apidae, Meliponini). Insect. Soc. 54(4): 418-423.
- Ducke A. 1916. Enumeração dos Hymenopteros colligidos pela Comissão e Revisão das espécies de abelhas do Brasil. Comm. Lin. Teleg. Estr. M. Gr. ao Amaz. 35: 3–171.
- Fernandes-Salomão T.M., Muro-Abad J.I., Campos L.A.O. and Araújo E.F. 2002. Mitochondrial and nuclear DNA characterization in the *Melipona* species (Hymenoptera, Meliponini) by RFLP analysis. Hereditas. 137: 229–233.
- Fernandes-Salomão T.M., Rocha R.B., Campos L.A.O., Araújo E.F. 2005. The first internal transcribed spacer (ITS1) of *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis. Insect. Soc. 52: 11-18.
- Francisco F.O., Silvestre D. and Arias M.C. 2001. Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction map. Apidologie 32: 323-332.

- Hall H.G. and Smith D.R. 1991. Distinguishing African and European honeybee matriline using amplified mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4548-4552.
- Holmberg E.L. 1903. Delectus Hymenopterologicus Argentinus [...]. An. Mus. Nac. Hist. Nat. B. Aires, ser. 3, 2: 377-468.
- Kerr, W.E. 1951. Estudos sobre a genética de populações de himenópteros em geral e dos apíneos sociais em particular. Ann. Esc. Sup. Agric. L. Queiroz 8: 219-354.
- Melo, G.A.R. and Campos, L.A.O. 1987. Variação no padrão de faixas na população de *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1936 no Estado de Minas Gerais (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). In: Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Zoologia, Juiz de Fora, MG Brasil, pp. 76.
- Moreto G. and Arias, M.C. 2005. Detection of mitochondrial DNA restriction site differences between the subspecies of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). Neo. Entomol. 34: 381-385.
- Moure J.S. 1975. Notas sobre as espécies de *Melipona* descritas por Lepetelier em 1836 (Hymenoptera, Apidae). Rev. Bras. Biol. 3: 15-17.
- Moure J.S. and Kerr, W.E. 1950. Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymen. – Apoidea). Dusenía 1(2):105-129 + 2 estampas.
- Nogueira-Neto P. 1970. A criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae). 2ª ed. São Paulo, Editora Tecnapis, 365 p.
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H. and Flook P. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entomol. Soc. Am. 87: 651-701.
- Schwarz H.F. 1932. The genus *Melipona* IV. The type genus of the Meliponidae or stingless bees. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 63: 231-460.
- Waldschmidt A.M., Barros E.G. and Campos L.A.O. 2000. A molecular marker distinguishes the subspecies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). Gen. Mol. Biol., 23: 609-611.

Waldschmidt A.M., Marco-Júnior P., Barros E.G. and Campos L.A.O. 2002. Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. Braz. Jour. Biol., 62: 923-928.

Legends to Figures

Figure 1. Patterns of tergal yellow stripes exhibited by workers and males of *Melipona quadrifasciata*. A, class A, *M. q. anthidioides* (worker from Santa Tereza, Espírito Santo); B, class B (worker from Três Marias, Minas Gerais); C, class C, hybrid pattern (worker from Ourolândia, Bahia); D, class D, *M. q. quadrifasciata* (worker from Campina Grande do Sul, Paraná).

Figure 2. Distribution map for *Melipona quadrifasciata* and *M. mandacaia*. The records of the different patterns of tergal stripes (class A-D) in *M. quadrifasciata* are discriminated in the map (see text for characterization of the pattern classes). The different gray tones in the map are based on digital reconstruction of the relief, where the darkest tones indicate higher altitude.

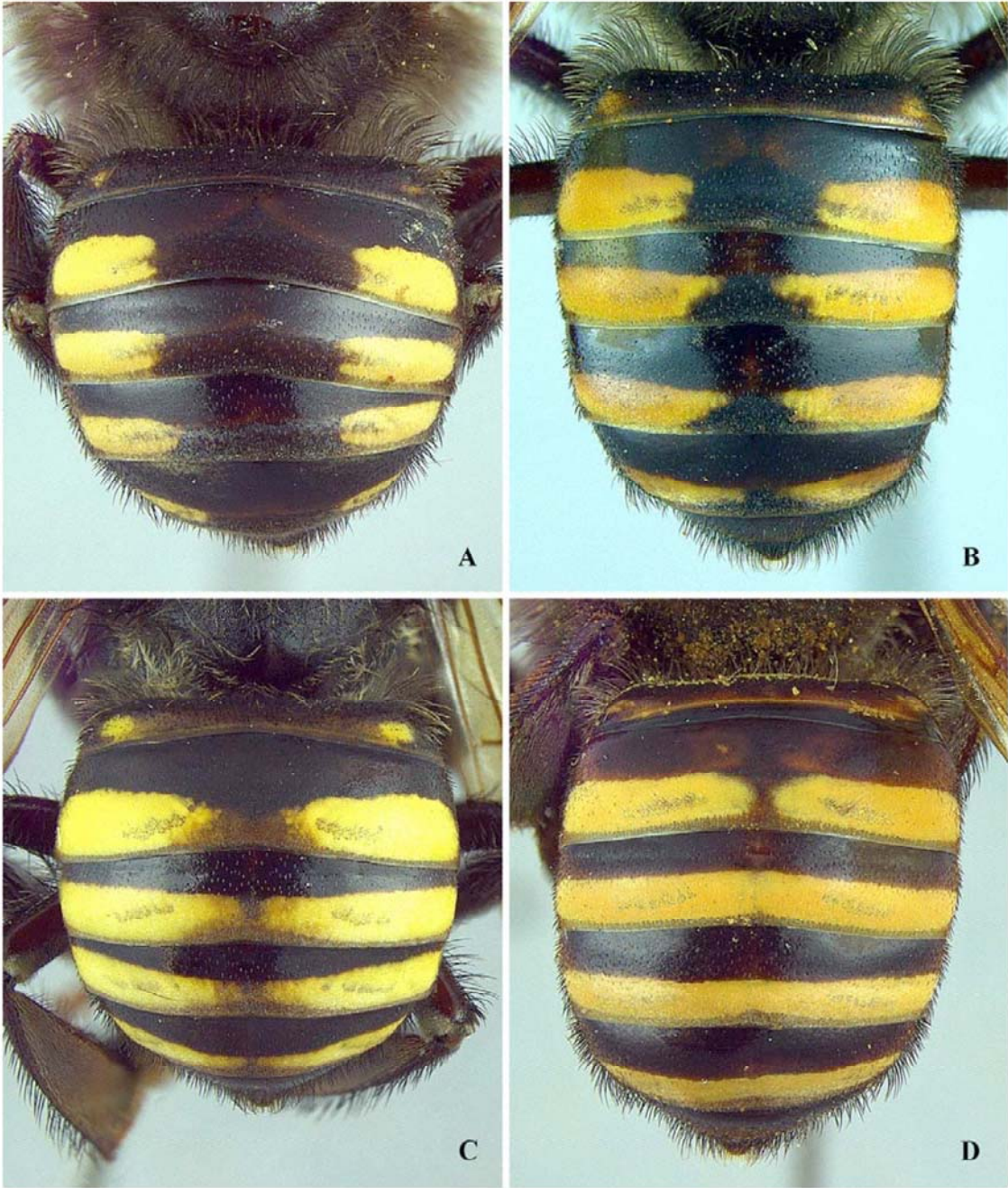


Fig. 1

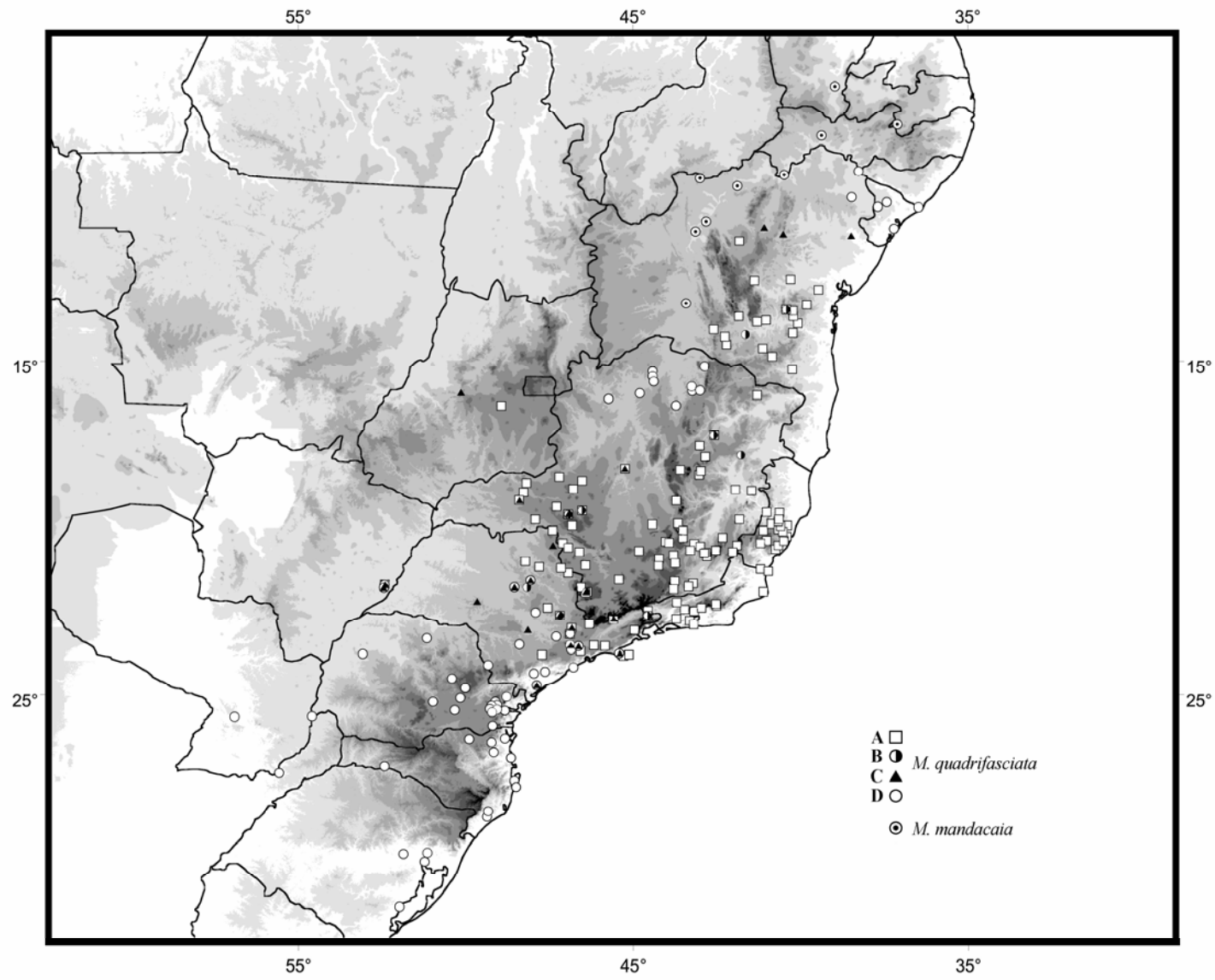


Fig. 2

Table 1. Restriction fragment polymorphic sizes generated after enzymatic digestion with *Hinf*I and *Mbol*I in *M. quadrifasciata*.

Pattern	<i>Hinf</i>I	<i>Mbol</i>I
A	950, 320, 280, 150	640, 340, 320, 230, 170
B	950, 600, 150	600, 380, 320, 230, 170

Capítulo 2

Filogeografia de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Meliponini): vicariância pleistocênica e diversificação recente na região neotropical

Filogeografia de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Meliponini): vicariância pleistocênica e diversificação recente na região neotropical

Resumo

Estudos filogeográficos têm proporcionado inúmeras possibilidades para o entendimento dos padrões evolutivos e da história demográfica da diversificação dos organismos. A abelha *Melipona quadrifasciata*, conhecida popularmente como mandaçaia, apresenta duas subespécies distintas, *M. quadrifasciata anthidioides* e *M. quadrifasciata quadrifasciata*. A principal diferença entre as subespécies são as bandas terçais amarelas, que são contínuas em *M. q. quadrifasciata* e descontínuas em *M. q. anthidioides*. A existência de colônias com padrão de faixas abdominais contínuas, semelhantes a *M. q. quadrifasciata*, em regiões fora da área de ocorrência da subespécie do sul do Brasil tem sido relatadas no Sergipe e na região de Januária, no norte do Estado de Minas Gerais, em regiões com clima semi-árido. O objetivo deste estudo foi elucidar o padrão filogeográfico das populações de *M. quadrifasciata* ao longo de sua área de distribuição. Para análise filogeográfica foram utilizadas seqüências de 852 pb referentes a parte do gene COI do mtDNA de 145 indivíduos de *M. quadrifasciata* provenientes de 56 localidades dos estados do RS, SC, PR, SP, RJ, MG, ES, BA e SE. As seqüências foram alinhadas pelo método CLUSTAL W. Foram construídas uma árvore filogenética por meio da inferência Bayesiana e uma rede de haplótipos por *median-joining network*. Foram implementados também SAMOVA e *mismatch distribution*. A estimativa da coalescência foi realizada pelo programa MDIV. Dos 852 pb obtidos, 55 (6,45%) foram variáveis. Foram identificados 50 haplótipos, com uma diversidade nucleotídica (π) de 0,0055 e uma diversidade haplotípica (H_d) de 0,957. Foi evidenciado, na inferência filogenética e na rede de haplótipos, a presença de dois clados: o clado sul compreendendo a subespécie *M. q. quadrifasciata*, e o clado norte formado pela subespécie *M. q. anthidioides* e as populações de faixa terçal contínua do norte de Minas Gerais e do Sergipe e nordeste da Bahia. A AMOVA mostrou um percentual de variação entre os clados de 68,56% e um Φ_{ST} de 0,905. A barreira de fluxo gênico, estimada pela SAMOVA, foi localizada próxima ao Vale do Ribeira do Iguaçu no sul do estado de São Paulo, concordando também com a separação

dos clados. A *mismatch distribution* evidenciou gargalos populacionais em ambos clados por meio de distribuição unimodal. O tempo de divergência estimado pela análise de coalescência foi entre 490.000 e 390.000 anos A.P. Padrões filogeográficos com vicariância semelhante foram reportados para pássaros (*Xiphorhynchus fuscus*) e serpentes (*Bothrops jararaca*). Outras espécies de abelhas, *M. bicolor* e *M. marginata*, exibem diferenciação morfológica que recebe o status de subespécies, apresentando zona de separação entre as subespécies concordante com *M. quadrifasciata*.

1. Introdução

Estudos filogeográficos têm proporcionado inúmeras possibilidades para o entendimento dos padrões evolutivos e da história demográfica da diversificação das linhagens de espécies (Avice 2000).

A abelha *Melipona quadrifasciata*, popularmente conhecida como mandaçaia, é descrita como distribuindo-se ao longo da porção leste brasileira, indo do Rio Grande do Sul até a Paraíba (Moure & Kerr 1950). Tradicionalmente, duas subespécies distintas são reconhecidas, *M. quadrifasciata anthidioides* e *M. quadrifasciata quadrifasciata*. A principal diferença entre elas são as bandas terciais amarelas do 2º ao 5º segmento, que são contínuas em *M. q. quadrifasciata* e descontínuas em *M. q. anthidioides* (Ducke 1916; Schwarz 1932).

A subespécie *M. q. quadrifasciata* é encontrada em regiões de clima frio no sul de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Kerr 1951; Moure 1975), e *M. q. anthidioides* se distribui do norte e nordeste de São Paulo, ao longo da porção leste brasileira, até a Paraíba (Kerr 1951). No estado de São Paulo e no sul de Minas Gerais existe uma zona de hibridação natural entre as duas subespécies, onde se pode observar vários padrões de distribuição das terciais amarelas (Kerr 1951; Moure 1975).

A existência de colônias com padrão de faixas abdominais contínuas, semelhantes ao de *M. q. quadrifasciata*, em regiões fora da área de ocorrência da subespécie do sul do Brasil tem sido relatadas. Nogueira-Neto (1970) relata ter recebido exemplares de mandaçaia oriundos de Carira, no Sergipe, que apresentam padrão de faixas terciais semelhantes ao de *M. q. quadrifasciata*. Melo & Campos (1987) relataram a ocorrência de colônias com padrão de faixas terciais contínuo semelhante ao da subespécie do sul do Brasil na região de Januária, no norte do Estado de Minas Gerais, em regiões com clima semi-árido. Esses relatos mostram a possível existência de populações com faixas terciais contínuas, disjuntas das populações de *M. q. quadrifasciata* do sul do Brasil.

A distribuição geográfica da abelha *M. quadrifasciata* esta associada a regiões com altitude acima de 600 metros, exceto no limite sul da distribuição, onde há uma compensação da baixa altitude pela alta latitude. Essa relação é

exemplificada pela distribuição da espécie no Espírito Santo, onde *M. quadrifasciata* é encontrada somente na região serrana do estado. Na porção norte do estado que é caracterizada por matas de tabuleiro não há registros da ocorrência, seguindo por toda região da Mata Atlântica na Bahia. A *M. quadrifasciata* com padrão de faixas terçais contínuo do nordeste da Bahia e Sergipe encontra-se associada à foz do Rio São Francisco em regiões de baixa altitude.

A capacidade de dispersão nos meliponíneos, cujo estabelecimento se dá com a fundação de novas colônias por enxameação, pode apresentar taxas de migração mais lentas (Silveira *et al.* 2002). O estabelecimento de uma colônia filha é dependente da colônia mãe, pois esta utiliza alimento e operárias da colônia mãe até sua estabilidade, fazendo com que a fundação de novos ninhos fique restrita a pequenas distâncias (Nogueira-Neto 1954).

Poucos estudos filogeográficos com abelhas têm sido relatados, e em meliponíneos, até então, nenhum trabalho com esse enfoque foi publicado. Tanaka *et al.* (2001), por exemplo, analisaram a posição filogenética de *Apis nuluensis* e a filogeografia de *Apis cerana* no nordeste de Borneo, e os dados sugerem a ocorrência de vicariância durante glaciações no Plio-Pleistoceno. Soucy & Danforth (2002) estudaram a filogeografia do polimorfismo social em *Halictus rubiduncus*, e relataram que a estrutura genética das populações é concordante com a expressão do comportamento solitário e social nas populações da América do Norte. Dick *et al.* (2004) propuseram ocorrência de fluxo gênico, por meio de filogeografia comparada, a longas distâncias e a dispersão sobre os Andes em abelhas Euglossini, verificando uma diferenciação filogeográfica do mtDNA fraca ou ausente em 12 espécies monofiléticas de Euglossini.

Este trabalho teve como objetivo elucidar o padrão filogeográfico de populações de *M. quadrifasciata* ao longo de sua área de distribuição, bem como entender o padrão de distribuição das faixas terçais em relação à linhagem materna mitocondrial. Os resultados obtidos irão subsidiar a compreensão dos padrões biogeográficos e evolutivos deste táxon.

2. Material e Métodos

2.1 Estratégias de Amostragem

Foram coletadas cerca de dez operárias de cada colônia, num total de 145 colônias, de 56 localidades dos estados da Bahia (BA), Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP), Paraná (PR), Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Sergipe (SE) (Tabela 1, Figura 1) no período entre 2002 e 2008. As amostras obtidas foram colocadas em frascos com etanol absoluto e armazenadas em freezer a -80°C, até a extração de DNA. Foi analisada uma operária de cada colônia.

Tabela 1. Localidades amostradas, coordenadas geográficas (decimais), tamanho das amostras (N) e haplótipo encontrado.

Localidade/Estado	Latitude S	Longitude W	N	Haplótipo
Acerburgo-MG	-21.3642	-46.94	1	H46
Alfredo Chaves-ES	-20.635	-40.749	4	H27
Barbacena-MG	-21.2	-43.7	4	H1
Brejão-SE	-10.38	-36.48	1	H38
Brumado-BA	-14.2	-41.65	1	H2
Caeté-MG	-19.8	-43.530	6	H23, H24
Caitité-BA	-14.067	-42.55	4	H2
Campina Grande do Sul-PR	-25.305	-49.055	2	H50
Coromandel-MG	-18.683	-47.15	1	H25
Contendas do Sincorá-BA	-13.762	-41.041	2	H9
Cristiano Ottoni-MG	-20.85	-43.8	5	H1, H26
Cunha-SP	-23.074	-44.959	4	H9, H41, H47
Curitiba-PR	-25.427	-49.273	5	H3, H4, H34, H48
Domingos Martins-ES	-20.383	-41.017	4	H27
Diogo de Vasconcelos-MG	-20.533	-43.733	1	H5
Guarapari-ES	-20.521	-40.671	5	H27
Guimarães-MG	-18.833	-46.783	3	H6, H7
Içara-SC	-28.7133	-49.3	5	H28, H29
Itaberaba-BA	-12.527	-40.306	2	H8, H14
Itaiópolis-SC	-26.336	-49.906	5	H34, H44, H45
Ituaçu-BA	-13.813	-41.296	1	H9
Jacobina-BA	-11.180	-40.518	1	H36
Janaúba-MG	-15.883	-43.250	1	H49
Januária-MG	-15.583	-44.533	7	H14, H15, H30
Jequié-BA	-13.857	-40.083	4	H9, H10
Jeremoabo-BA	-10.075	-38.4808	1	H38
Lafaiete Coutinho-BA	-13.655	-40.212	1	H9
Lajedo do Tabocal-BA	-13.47	-40.223	2	H8, H14

Lapão-BA	-11.383	-41.831	1	H14
Oliveira-MG	-20.6964	-44.8272	2	H24
Manoel Vitorino-BA	-14.145	-40.242	1	H9
Materlândia-MG	-18.4	-43.033	1	H11
Miguel Pereira-RJ	-22.453	-43.468	1	H13
Nova Porteirinha-MG	-15.75	-43.267	5	H14, H15
Nova Soure-BA	-11.233	-38.483	1	H14
Ourolândia-BA	-10.970	-41.083	3	H14, H16, H17
Paulo Afonso-BA	-9.4061	-38.2147	1	H38
Pedra Azul-MG	-16.005	-41.297	1	H27
Pedra Branca-BA	-12.850	-39.475	1	H14
Pilar do Sul-SP	-23.813	-47.716	2	H9
Piranga-MG	-20.533	-43.233	5	H5, H31, H32
Porto Alegre-RS	-30.033	-51.23	5	H29, H33, H34
Poté-MG	-17.8	-41.866	2	H18, H19
Ressaquinha-MG	-21.05	-43.75	4	H1, H20
Rio Vermelho-MG	-18.3	-43	6	H11, H35
Riacho dos Machados-MG	-15.867	-43.016	1	H42
Ribeirão Preto-SP	-21.177	-47.810	1	H43
São Cristovão-SE	-11.014	-37.206	2	H37, H38
São Francisco-MG	-15.95	-44.8	1	H15
São João Del Rey-MG	-21.1	-44.216	3	H13, H21, H22
Santa Inês-BA	-13.292	-39.818	1	H14
Teresópolis-RJ	-22.412	-42.965	1	H12
Urucuia-MG	-16.067	-45.783	6	H15, H39
Valença-RJ	-22.245	-43.700	1	H13
Vitória da Conquista-BA	-14.866	-40.839	2	H9, H40
Viçosa-MG	-20.753	-42.881	1	H24
Total			145	

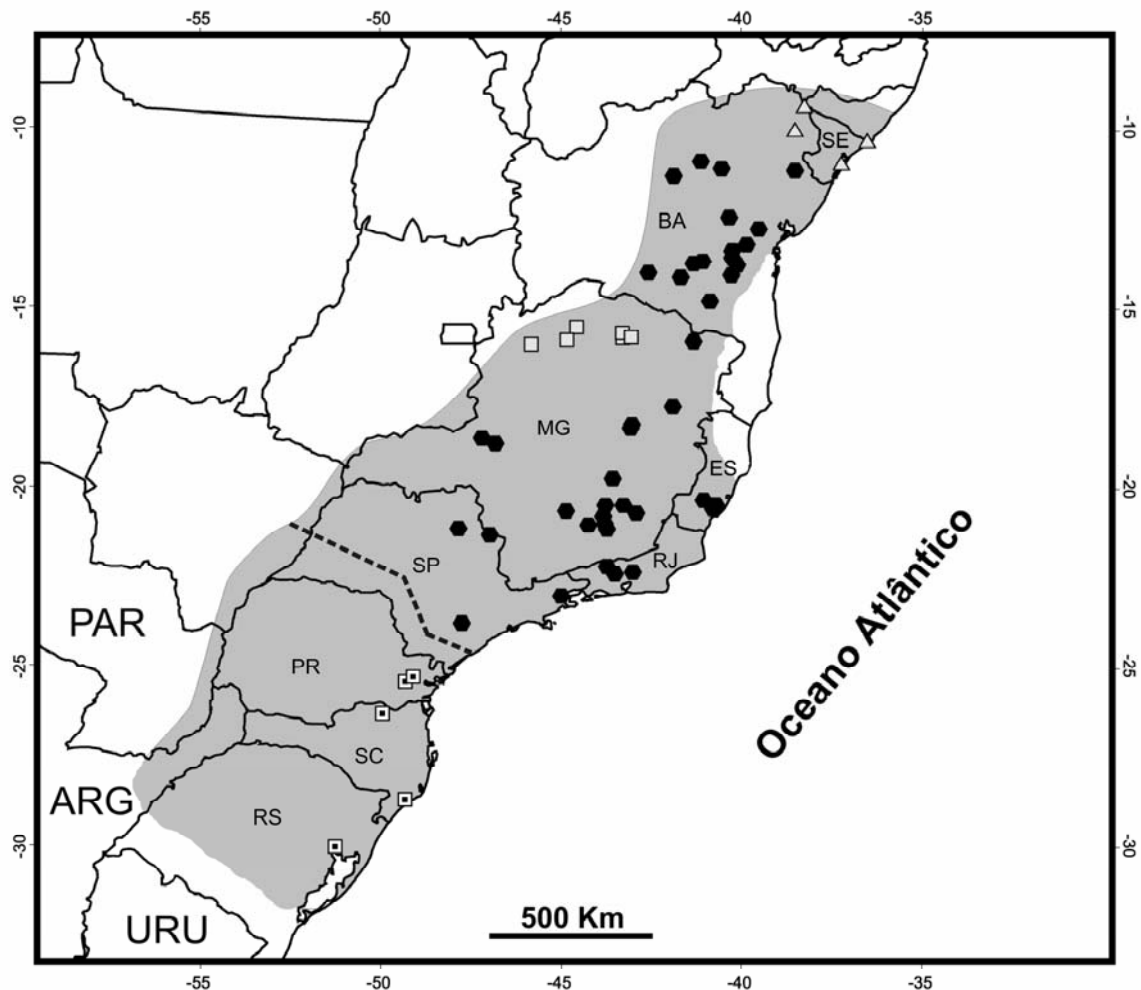


Figura 1. Mapa da distribuição geográfica das 56 localidades de amostragem de *M. quadrifasciata* analisadas. Os quadrados perfurados indicam indivíduos de *M. q. quadrifasciata*, os hexágonos pretos indicam indivíduos de *M. q. anthidioides*, os quadrados brancos indicam indivíduos com padrão de faixas terçais contínuo do norte de Minas Gerais, e os triângulos brancos indicam indivíduos com padrão de faixas terçais contínuo do Sergipe e nordeste da Bahia. A área em cinza representa a distribuição geográfica determinada para *M. quadrifasciata*. A linha pontilhada representa a possível barreira de fluxo gênico estimada pelo programa SAMOVA 1.0.

As amostras de *M. quadrifasciata* foram divididas em quatro grupos conforme o padrão de faixas terçais: (i) subespécie *M. q. quadrifasciata* com padrão de faixas terçais contínuas; (ii) subespécie *M. q. anthidioides* com padrão de faixas terçais interrompidas, forma intermediária entre interrompido e híbrido, e padrão híbrido; (iii) *M. quadrifasciata* com padrão de faixas terçais contínuas do norte de Minas Gerais; (iv) *M. quadrifasciata* com padrão de faixas terçais contínuas do nordeste da Bahia e Sergipe (Figura 1).

Foram utilizadas como grupo externo as espécies *M. orbigny* (N=1) oriunda de Campo Grande no Mato Grosso do Sul e *M. subnitida* (N=1) proveniente de Natal no Rio Grande do Norte, que são do subgênero *Melipona*

(*Melipona*), ao qual *M. quadrifasciata* também pertence. A espécie *M. mandacaia* (N=2), uma amostra de Lapão e uma de Uibaí ambas no estado da Bahia, foi incluída na reconstrução filogenética com intuito de testar a estreita relação desta com *M. quadrifasciata*, como reportado por Silveira et al. (2002).

2.2 Extração e quantificação do DNA total

O DNA genômico foi extraído utilizando uma operária de cada colônia conforme protocolo descrito por Fernandes-Salomão et al. (2005). Para a extração do DNA foi utilizado somente a cabeça e o tórax de cada indivíduo, que foram macerados em microtubos de 2 mL com pistilos de vidro, devidamente flambados. As amostras foram quantificadas em gel de agarose 0,8% (P/V) para verificação da quantidade e da qualidade do DNA extraído. Obteve-se em média 50 ng/μL de DNA genômico total em cada amostra. Todas as amostras de DNA utilizadas neste estudo estão depositadas no banco de DNA do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia Geral na Universidade Federal de Viçosa.

2.3 Amplificação e seqüenciamento

Para análise filogeográfica foram utilizadas seqüências do gene citocromo oxidase subunidade 1 (COI) do DNA mitocondrial. Os *primers* utilizados neste estudo foram desenhados a partir do genoma mitocondrial de *M. bicolor* (Silvestre et al. 2008) depositado no GenBank. Para auxílio na confecção dos *primers* foi utilizado o programa Oligo Explorer 1.2TM. Foram desenhados quatro *primers*, dois flanqueando o gene COI (COX1 e COX4) e dois internos ao gene COI (COX3 e COX2) (Tabela 2).

Tabela 2. Seqüências dos *primers*, tamanho do fragmento obtido e temperatura de pareamento.

<i>Primers</i>	Direção	Seqüência 5' → 3'	Tamanho do fragmento	Temperatura de pareamento
COX1	<i>forward</i>	AAGTTAAATAAACTATTAATCTTC	1009 pb	47°C
COX3	<i>reverse</i>	TAATCCTACTGTAAATATATGATGGG		
COX2	<i>forward</i>	CAATTACTATATTATTATTTGATCG	1051 pb	52°C
COX4	<i>reverse</i>	CTTGAAATGAAATTATATTTTCATGTTG		

As ampliações dos fragmentos de DNA foram conduzidas em termociclador PTC-100™ MJ research Inc. A mistura para a reação contendo os *primers* COX1 e COX3 consistiu de 1 µL do DNA genômico (50 ng), 5 µL do tampão 5X (Promega), 2 µL de MgCl₂ a 25 mM, 0,75 µL de cada *primer* a 20 µM, 2,5 µL da mistura de dNTPs a 100 mM e 1,5 U de *GoTaq*® DNA polimerase (Promega), em um volume final de 25 µL. A mistura para a reação contendo os *primers* COX2 e COX4 consistiu de 1 µL do DNA genômico (50 ng), 5 µL do tampão 5X (Promega), 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM, 0,5 µL de cada *primer* a 20 µM, 2 µL da mistura de dNTPs a 100 mM e 1 U de *GoTaq*® DNA polimerase (Promega), em um volume final de 25 µL. As condições de amplificação consistiram de um passo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos com 94°C por 1 minuto, temperatura de pareamento de cada combinação de *primers* por 1:20 minutos e 64°C por 2 minutos; e um passo de extensão final a 64°C por 10 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0 % (p/v), imerso em tampão TBE 1X e corado com brometo de etídio, para confirmação da amplificação.

O DNA amplificado foi submetido à purificação com enzima ExoSap-IT® (USB corporation). O DNA purificado foi submetido à reação de seqüenciamento direto, em ambas as direções (*forward* e *reverse*), utilizando seqüenciador automatizado MegaBace DNA Analysis System 500 (Amersham Biosciences) e o kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences).

2.4 Alinhamento das seqüências e inferências filogeográficas

Após o seqüenciamento, os cromatogramas foram editados utilizando o pacote de programas, para o sistema operacional Linux, Phred, Phrap e Consed (Ewing *et al.* 1998; Ewing & Green 1998; Gordon *et al.* 1998). As seqüências editadas foram alinhadas utilizando-se o método CLUSTAL W (Higgins *et al.* 1994) com o auxílio do programa MEGA4 (Tamura *et al.* 2007) e comparadas com a seqüência de COI para *M. bicolor* (Silvestre *et al.* 2008)

depositada no GenBank. Todos os alinhamentos foram inspecionados e corrigidos visualmente.

As características inerentes as seqüências de DNA obtidas foram identificadas com auxílio do programa MEGA4 (Tamura *et al.* 2007). As diversidades haplotípica (H_d) e nucleotídica (π) foram estimadas por meio do programa DNASP 4.0 (Rozas *et al.* 2003). O modelo de substituição usado para a reconstrução filogenética Bayesiana foi estimado usando-se o MrMODELTEST (Nylander *et al.* 2004) com o critério de informação Akaike (AIC), utilizando-se os grupos externos. O modelo de substituição usado na abordagem de máxima-verossimilhança foi calculado usando-se o ModelTest (Posada & Crandall 1998) com o com o critério de informação Akaike (AIC), utilizando-se os grupos externos.

A árvore filogenética foi estimada pelos métodos da inferência Bayesiana, *neighbor-joining* e máxima-verossimilhança. A Bayesiana foi estimada pelo programa MrBayes 3.1 (Huelsenbech & Ronquist 2001) com 3.000.000 de gerações da *Markov chain Monte Carlo* (MCMC). Foram excluídas as 100.000 gerações iniciais, por meio do “burn in”, e os valores de probabilidade a posteriori foram estimados com as árvores restantes. A árvore de *neighbor-joining* foi calculada com auxílio do programa MEGA4 (Tamura *et al.* 2007) utilizando o modelo de substituição de Tamura-Nei com 1000 replicações de *bootstrap*. A abordagem de máxima-verossimilhança foi calculada utilizando-se o método de busca heurística NNI e com 100 replicações de *bootstrap*, com auxílio do programa PAUP* (Swofford 1998). As topologias Bayesiana e máxima-verossimilhança foram visualizadas no programa TreeView 1.6.6 (Page 2001).

Para análise da estruturação filogeográfica foi obtida uma rede de haplótipos por meio do método *median-joining network* (Bandelt *et al.* 1999) utilizando-se o programa NETWORK 4.5.0.0 (www.fluxus-engineering.com).

A análises de variância molecular (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992) e a estimativa de uma possível barreira de fluxo gênico foram implementadas pelo método da análise de variância molecular espacial (SAMOVA) por meio do programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.* 2002). O programa implementa uma abordagem para definir grupos de populações que são geograficamente homogêneos e leva a identificação de barreiras geográfica entre estes grupos.

A AMOVA foi calculada com três níveis hierárquicos e dois grupos. Foram delimitadas 38 populações para esta análise conforme figura 4.

Para verificar a expansão demográfica e evidenciar gargalos populacionais foi realizada a *mismatch distribution* e o teste de neutralidade pelos métodos de Tajima (Tajima 1983), Fu (Fu 1997) e Fu & Li (Fu & Li 1993) dos filogrupos obtidos, com o auxílio do programa DNASP 4.0 (Rozas *et al.* 2003).

A estimativa da coalescência entre os clados observados foi implementada pelo programa MDIV (Nielsen & Wakeley, 2001). O programa utiliza simulações da *Markov-chain Monte Carlo* para estimar a máxima-verossimilhança de três parâmetros θ ($4N_e\mu$), M ($2N_em$) e T ($t/2N_e$), onde N_e é o tamanho efetivo da população, μ é taxa de substituição, m é a taxa de migração e t é tempo de divergência entre as populações. Foram realizadas quatro análises simultâneas com diferentes *random seeds*, cada uma com 5.000.000 de ciclos e com um *burn-in* de 1.250.000, assumindo-se um $M_{MAX} = 10$ e um $T_{MAX} = 5$ e utilizando o modelo de substituição HKY. Simulações paralelas utilizando diferentes valores de M_{MAX} , T_{MAX} e de ciclos da cadeia produziram valores convergentes, mostrando que o número utilizado é adequado. Para calcular o tempo de divergência assumiu-se uma taxa de substituição de 1,2 e 1,5% por milhão de anos calibrada para outros insetos (Caccone & Sbordoni 2001; Farrel 2001) e utilizada em abelhas Euglossini (Dick *et al.* 2004). Assumindo-se que o gene COI varie de maneira uniforme, a taxa referente 852 pb mínima é de $\mu = 1,02 \times 10^{-5}$ e máxima é de $\mu = 1,28 \times 10^{-5}$ substituições por ano.

3. Resultados

3.1 Escolha da região do gene para análise filogeográfica

Foram seqüenciados 30 indivíduos de *M. quadrifasciata*, dispersos ao longo da área de amostragem, com as duas combinações de primers (COX1, COX3 e COX2, COX4) em que se obteve seqüências completas do gene COI de 1559 pb. As seqüências foram submetidas à ferramenta BLAST para

confirmação da amplificação do gene alvo. Posteriormente foram alinhadas em conjunto com a seqüência de COI de *M. bicolor* (Silvestre *et al.* 2008) depositada no GenBank, e observou-se ausência de *indels*.

Após o alinhamento, foi verificado que a porção final do gene, correspondente a combinação de primers COX2 e COX4, apresentou maior diversidade nucleotídica (π), em comparação a porção inicial. Nesse sentido, optou-se pelo uso da combinação de primers COX2 e COX4, com intuito de reduzir o número de seqüências por indivíduos e ampliar o número de indivíduos seqüenciados.

3.2 Características das seqüências do DNA mitocondrial

Foi obtido um fragmento de 852 pb do gene COI do DNA mitocondrial de 145 indivíduos de *M. quadrifasciata*, 2 indivíduos de *M. mandacaia*, 1 indivíduo de *M. orbignyi* e 1 indivíduo de *M. subnitida*. No alinhamento obtido para *M. quadrifasciata* 55 sítios foram variáveis, correspondendo a 6,45% (Figura 2), deste, 32 sítios foram parcimoniosamente informativos e 23 foram *singletons*. Dos 55 sítios variáveis, 8 foram na primeira base do códon, 4 na segunda base e 43 na terceira base. Os sítios variáveis deram origem a 10 substituições de aminoácidos. A composição de nucleotídeos foi: T=42,5%, C=9,4%, A=37,3% e G=10,7%. Foram identificados 50 haplótipos (Tabela 1, Figura 2), com uma diversidade nucleotídica (π) de 0,00547 e uma diversidade haplotípica (H_d) de 0,957 (Tabela 3).

Tabela 3. Estatísticas intraespecíficas para os clados sul e norte e na espécie como um todo.

	H_d/sd	π/sd	D	D'	F'	F_s
Clado Sul	0,879 ± 0,046	0,00268 ± 0,00046	-1,27175	-1,29757	-1,50074	-3,568
Clado Norte	0,944 ± 0,008	0,00334 ± 0,00018	-1,88573*	-2,97296*	-3,03456**	-35,259
Total	0,957 ± 0,006	0,00547 ± 0,00037	-1,60475	-3,10228*	-2,95705*	-35,614

H_d , diversidade haplotípica; π , diversidade nucleotídica; sd , desvio padrão; D , teste de Tajima; D' e F' , teste de Fu & Li; F_s , teste de Fu; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Além da região de 852 pb referente ao gene COI também foram obtidas seqüências de aproximadamente 35 pb referentes ao tRNA^{Leu}. Nessas seqüências observou-se uma duplicação de 6 pb, referentes a porção inicial do

tRNA^{Leu}, presentes em todas colônias oriundas da população com padrão de faixa tergal contínua do Sergipe e nordeste da Bahia. Também foi encontrada uma duplicação de 3 pb, referente ao códon de terminação do COI, em todas colônias provenientes de Uruçuaia. Entretanto, estas duplicações e as seqüências do tRNA^{Leu} foram excluídas das análises filogeográficas.

```

H1  ATTGAAATCTATTTATTTTTTTTTATATTATTTTTTACATAATATATTTATCCCTA
H2  ..C.....T.....
H3  .....T.G....C.....G..C..C.....T.....T...T
H4  .....T.....C..C.....C...A..T..C.....T...T
H5  .....G.T.....C.....G.....C.
H6  .....T..T.....
H7  C...T..T.....G.....T..
H8  .....T.....T.....C.....
H9  ..C.....T.....G.....
H10 ..C.....T.....G.....T..
H11 .....T.....C.....
H12 .....T.....C.....
H13 .....T.....T...
H14 .....T.....T.....
H15 .....T.....T.....C.....
H16 .....T..A.....T.....
H17 .A.....T.....T.....
H18 ..C.....TC.....G.....
H19 .....TC.....G.....
H20 .....C.....T.....
H21 .....T.....A.....T.....A...T..
H22 .....AT.....T.....
H23 .....T.....G.....
H24 .....T.....
H25 ...G..T.....C.....G.....
H26 .....A.....
H27 .....G.T.....
H28 .....T.....C.....C..C..A..T..GC.....T...T
H29 .....T.G....C.....C..C..A..T..C.....T...T
H30 ...A...T.....T.....
H31 .....T.....C.....C.
H32 .....T.....C.....G.....TTC.
H33 .....T.....C.....C..C..A..T..C..G...T...T
H34 .....T.....C.....C..C..A..T..C.....T...T
H35 .....T.....C.....T...
H36 .....T.....C..T.....
H37 .....T.....CG.....T...
H38 .....T.....C.....
H39 .....T..A.....T.....C.....
H40 ..C.....T.....CG.....
H41 ..C.....T.....C.....G.....
H42 .....T.....G.....T.....
H43 ..C.....T...C.....T.....
H44 .....T.....C.....C..A..T..C.....T...T
H45 .....T.....C..C.....C..C..A..T..C.....T...T
H46 .....T.....T.....
H47 .....T.....C.....CT...
H48 .....T.....C.....C..C..C..T..C.....T...T
H49 .....T.....T.....C..C.....
H50 .....T.G....C.....C..C.....T..C.....T...T

```

Figura 2. Sítios variáveis dos 50 haplótipos de *M. quadrifasciata*, referentes ao fragmento de 852 pb do gene COI do DNA mitocondrial.

3.3 Relações Evolutivas em *M. quadrifasciata*

O modelo evolutivo selecionado para a inferência Bayesiana, incluindo os grupos externos, foi GTR+I baseados no AIC com uma proporção de sítios invariáveis de 0,8286 e para a máxima-verossimilhança, incluindo os grupos externos, foi TIM+I baseados no AIC com uma proporção de sítios invariáveis de 0,8283. As topologias obtidas pelos três métodos de reconstrução filogenética foram similares e para apresentação dos resultados optou-se pela estimada por inferência Bayesiana. Na reconstrução filogenética ficou clara a presença de dois clados em *M. quadrifasciata*, com altos valores de suporte de ramo, sendo um clado relativo à distribuição norte e outro a distribuição sul (Figura 3). O clado sul compreende à subespécie *M. q. quadrifasciata* e estende-se do estado do Paraná até Porto Alegre no estado do Rio Grande do Sul, possuindo 10 haplótipos. O clado norte foi formado pela subespécie *M. q. anthidioides* e as populações de faixa tergal contínua do norte de Minas Gerais e do Sergipe e nordeste da Bahia, estendendo-se de São Paulo até o máximo norte da distribuição geográfica, possuindo 40 haplótipos.

A relação filogenética de *M. quadrifasciata* com os grupos externos corrobora com aquela relatada por Silveira *et al.* (2002) e Camargo & Pedro (2007), com base em morfologia. Além disso, ficou confirmada a relação mais estreita entre *M. quadrifasciata* e *M. mandacaia*, em relação às outras espécies do subgênero *Melipona* (*Melipona*) do Brasil analisadas (Figura 3).

(H29) e Porto Alegre (H29 e H34). Entretanto, no clado norte parece haver algumas estruturas geográficas com poucos passos mutacionais.

O haplótipo central da rede (H24), presente no clado norte, foi encontrado nas localidades de Viçosa, Oliveira e Caeté, todas no estado de Minas Gerais. Na porção sul do Serra do Espinhaço em Minas Gerais observou-se uma estruturação geográfica por proximidade entre as localidades, com a formação de um grupo possuindo os haplótipos H1, H20 e H26, identificado nas localidades de Barbacena, Cristiano Ottoni e Ressaquinha, e outro grupo possuindo os haplótipos H5, H31 e H32, formado por Piranga e Diogo de Vasconcelos. Contudo, São João Del Rey compartilha um haplótipo presente no estado do Rio de Janeiro (H13).

Ainda no estado de Minas Gerais, Rio Vermelho e Materlândia também apresentaram estruturação geográfica, com o haplótipo H11 estando presente nas duas localidades. Entretanto, na região de cerrado próximo ao triângulo mineiro, as localidades de Guimarães e Coromandel, embora muito próximas, não compartilharam haplótipos. A localidade de Poté apresentou os haplótipos H18 e H19 que são derivados do haplótipo H9, presente no estado da Bahia. Na localidade de Pedra Azul foi encontrado o haplótipo H27, presente no estado do Espírito Santo.

Todas as colônias oriundas do estado do Espírito Santo apresentaram o haplótipo H27. No estado do Rio de Janeiro também se observou estruturação geográfica, com o haplótipo H13 sendo compartilhado por Valença e Miguel Pereira. No estado de São Paulo o haplótipo H9 presente nas localidades de Cunha e Pilar do Sul foi também observado no estado da Bahia.

No estado da Bahia foram encontrados dois grupos de haplótipos, um grupo restrito a região sudoeste do estado incluindo os haplótipos H2, H9, H41 e H40, e outro restrito a porção medial do estado contendo os haplótipos H8, H14, H16, H17 e H36. A população com padrão faixa tergal contínua do Sergipe e nordeste da Bahia apresentou o haplótipo H38 em todas as localidades amostradas e o haplótipo H37 foi encontrado somente São Cristóvão no Sergipe.

A AMOVA, implementada pelo programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.* 2002), com três níveis hierárquicos mostrou uma estruturação com 2 grupos concordante com a reconstrução filogenética e a rede de haplótipos, com o

percentual de variação entre os clados sul e norte de 68,56% e um Φ_{ST} de 0,905 (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de variância molecular (AMOVA) em *M. quadrifasciata*. Os grupos foram estimados pela SAMOVA.

Fonte de Variação	G.L.	% de variação	Φ_{ST}	p-Value
Entre grupos	1	68.56		
Entre localidades dentro de grupos	36	21.95	0.905	<0,0001
Dentro de localidades	106	9.49		
Total	143			

3.5 Estruturação do padrão de faixas terciais

Não foi observada estruturação genética em função do padrão de faixas terciais. Ficou evidenciado que *M. q. quadrifasciata* apresenta estruturação significativa (6 passos mutacionais), entretanto, as populações com padrão de faixas terciais contínuo do norte de Minas Gerais e do Sergipe e nordeste da Bahia não apresentaram estruturação e foram agrupadas no clado norte com *M. q. anthidoides* (Figura 4).

Contudo, a população com padrão de faixas terciais contínuo do Sergipe e nordeste da Bahia apresentou haplótipos exclusivos, embora o mais freqüente tenha sido separado por apenas um passo mutacional do haplótipo central do clado norte (H24) presente em *M. q. anthidoides* (Figura 4).

Populações com padrão de faixas terciais contínuo do norte de Minas Gerais compartilharam o haplótipo H14 com *M. q. anthidoides* do estado da Bahia. As localidades de Orolândia e Nova Soure no estado da Bahia, embora possuam padrão de faixa tergal híbrido também apresentaram o haplótipo H14 (Tabela 1 e Figura 4).

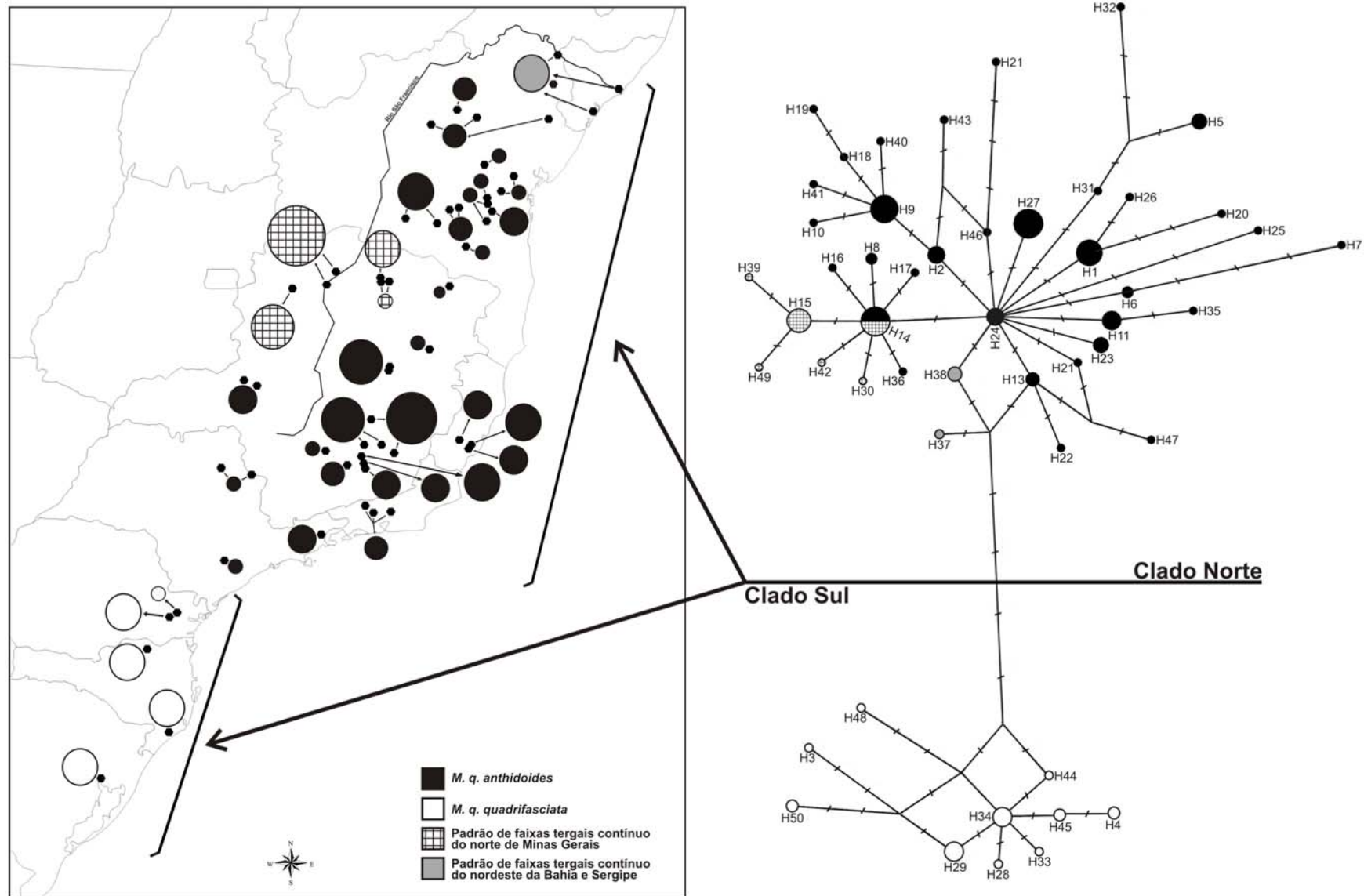


Figura 4. Mapa com distribuição geográfica das populações e rede de haplótipos *median-joining* do gene COI em *M. quadrifasciata*. No mapa cada círculo representa uma população delimitada para este estudo e o tamanho do círculo representa a freqüência de indivíduos, e os hexágonos pretos representam as localidades amostradas. Na rede de haplótipos cada círculo compreende um haplótipo e o seu tamanho é proporcional a sua freqüência, e cada traço na linha que conecta os haplótipos representa um passo mutacional. A codificação dos haplótipos é conforme Tabela 1.

3.6 História demográfica

A barreira de fluxo gênico estimada pela SAMOVA foi localizada próxima ao Vale do Ribeira do Iguape no sul do estado de São Paulo, e concorda com a separação dos clados sul e norte aqui estimada (Figura 1).

A *mismatch distribution* realizada para cada clado mostrou expansão demográfica tanto no clado norte (Figura 5A) quanto sul (Figura 5B), onde observou-se uma distribuição unimodal das diferenças par-a-par, sugerindo a ocorrência de gargalo populacional, ocorrido no passado, em ambos grupos. Em ambos os clados o pico da distribuição das diferenças par-a-par foi observado entre uma e cinco, o que reflete uma expansão recente em ambos clados, pela presença de poucas diferenças dentro dos clados.

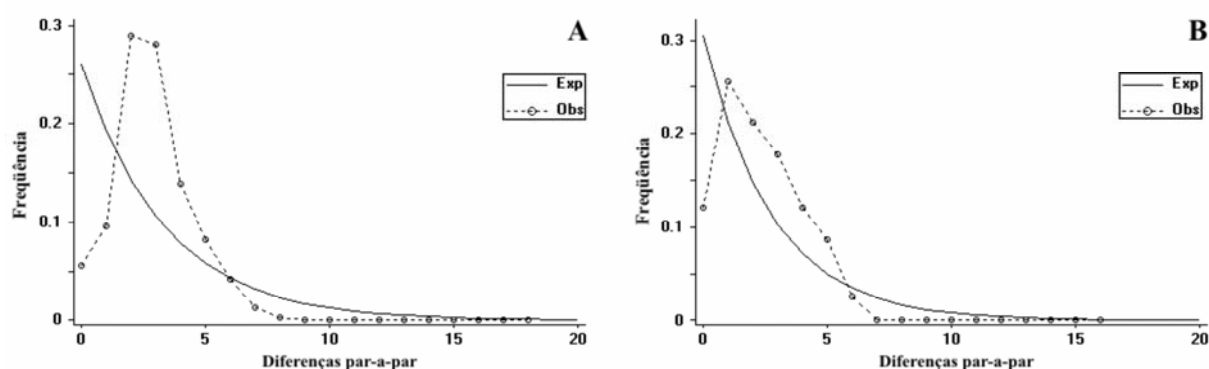


Figura 5. Diagramas ilustrando a *mismatch distribution* em *M. quadrifasciata*. A: no clado norte; B: no clado sul. A distribuição esperada é em uma população estável com tamanho constante.

Os valores negativos dos testes de neutralidade (Tabela 3) para os dois clados refletem expansões populacionais em ambos, entretanto as estatísticas foram significativas somente para o clado norte.

3.7 Análise de coalescência e tempo de divergência

A estimativa da coalescência por meio do programa MDIV gerou probabilidades a posteriori dos parâmetros θ , M e T (Figura 6). Os valores com maiores probabilidades são $\theta = 12,46$, $M = 0,02$ e $T = 0,81$ (Tabela 5). O baixo valor de M (0,02) concorda com o Nm por geração, estimado a partir do Φ_{ST} , de 0.02625. O tempo de divergência (t) estimado, assumindo-se $\mu = 1,02 \times 10^{-5}$

mínimo e $\mu = 1,28 \times 10^{-5}$ máximo, foi estimado entre 493.000 e 394.000 mil anos A.P. Este período estimado em que ocorreu a vicariância entre os clados norte e sul foi no Pleistoceno médio, provavelmente durante intensos ciclos de glaciações.

Tabela 5. Parâmetros de coalescência do MDIV, tamanho efetivo histórico (N_e) estimado e tempo de divergência estimado (t).

Taxa de substituição por ano	θ	M	T	N_e	t (anos)
$\mu = 1,02 \times 10^{-5}$	12,46	0,02	0,81	304.656	493.000
$\mu = 1,28 \times 10^{-5}$				243.728	394.000

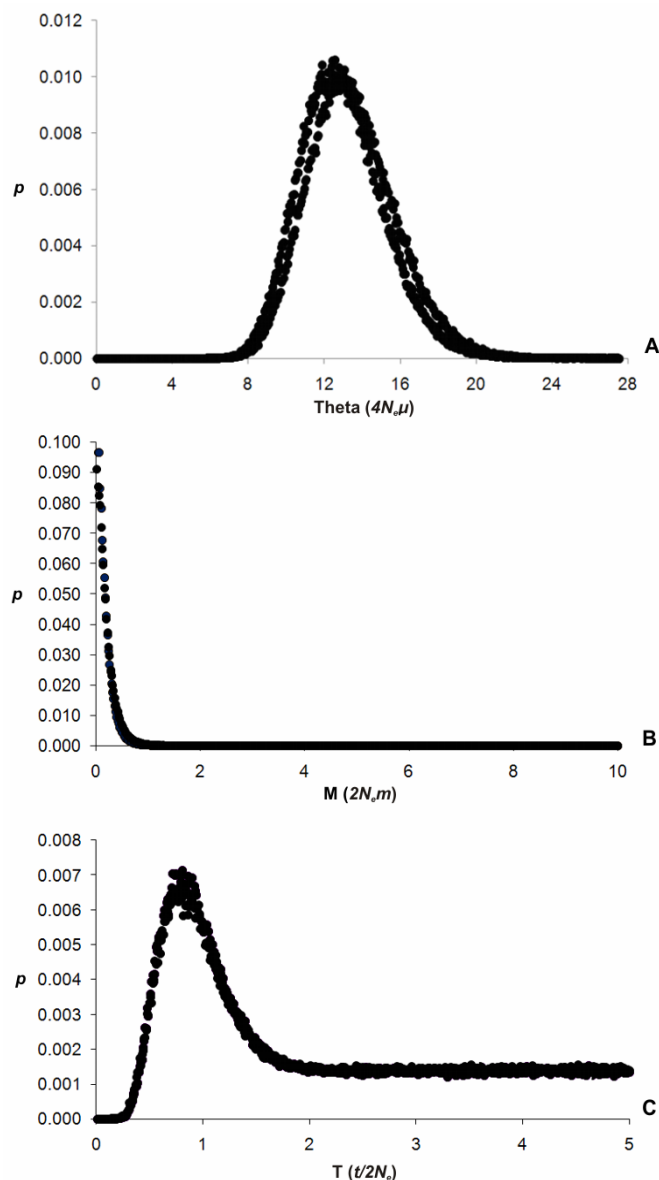


Figura 6. Distribuição das probabilidades a posteriori dos parâmetros de coalescência estimados pelo MDIV. A: Theta, B: M, C: T. p é a probabilidade a posteriori, μ é a taxa de substituição de nucleotídeos por ano, N_e é o tamanho efetivo histórico, m é a taxa de migração e t é o tempo de divergência.

4. Discussão

A composição de bases da seqüência parcial do gene COI com maior percentual de A-T (79,8%) seguiu o padrão já reportado para o DNA mitocondrial de insetos (Crozier & Crozier 1993; Simon *et al.* 1994).

Embora *M. orbignyi*, *M. subnitida*, *M. mandacaia* e *M. quadrifasciata* pertençam ao mesmo subgênero, *Melipona* (*Melipona*), as duas últimas são filogeneticamente mais próximas, o que concorda com Silveira *et al.* (2002) que afirma que as duas espécies apresentam semelhanças na morfologia das operárias e arquitetura dos ninhos. Contudo, é necessário utilizar, para a reconstrução filogenética, abelhas do subgênero *Melipona* (*Michmelia*) para confirmar a classificação proposta por Silveira *et al.* (2002) e Camargo & Pedro (2007), uma vez que Kerr *et al.* (1967) e Moure (1992) consideram *M. quadrifasciata* como pertencente ao subgênero *Melipona* (*Michmelia*).

As análises filogenéticas e a rede de haplótipos mostraram a separação de *M. quadrifasciata* em dois clados, clado sul e clado norte. Essa separação coincide com a subdivisão das duas subespécies presentes, onde a subespécie *M. q. quadrifasciata* é adaptada a regiões de clima frio e a subespécie *M. q. anthidioides* a regiões de clima tropical (Kerr 1951; Moure 1975). Entretanto, essa adaptação a condições climáticas divergentes possivelmente ocorreu posterior a vicariância entre os dois clados.

A AMOVA com um percentual de variação entre grupos de 68,56% e um Φ_{ST} de 0,905 mostram uma alta estruturação entre os clados. A barreira de fluxo gênico estimada, localizada próxima ao Vale do Ribeira do Iguape no sul do estado de São Paulo, concorda com a separação dos clados sul e norte. Estes resultados também reforçam a separação estimada pela árvore filogenética e pela rede de haplótipos.

A ausência de estruturação no clado sul pode ser resultado de um gargalo populacional recente e uma pequena expansão populacional, uma vez que a distribuição geográfica deste clado é mais restrita, quando comparada com o clado norte. As matas associadas ao clado sul são mais homogêneas, o que também reforça a hipótese de ausência de estruturação.

As pequenas estruturações observadas no clado norte são, possivelmente, decorrentes de recentes isolamentos por distância. A

estruturação observada na porção sul da Serra do Espinhaço em Minas Gerais é, provavelmente, oriunda de refúgios recentes (Pleistoceno final e Holoceno) associados ao mosaico de montanhas presentes na região. No clado norte a espécie se distribui nos biomas mata atlântica de altitude, matas de galeria do cerrado e caatinga arbórea. Essa heterogeneidade de habitats possivelmente originou a maior diversidade observada no clado norte.

A baixa diversidade nucleotídica (Tabela 3), os valores negativos das estatísticas dos testes de neutralidade (Tabela 3) e a distribuição unimodal com poucas diferenças para-par na *mismatch distribution* (Figura 5) evidenciam a ocorrência de gargalos populacionais seguidos de expansão demográfica recente.

Os resultados da análise de estrutura filogeográfica dos padrões de faixas terçais mostraram uma ausência de estruturação em função do padrão (Figura 4). Contudo, *M. q. quadrifasciata* (clado sul) apresentou estrutura na rede de haplótipos com uma separação de seis passos mutacionais das demais populações. As populações com padrão de faixas terçais contínuo do norte de Minas Gerais e do Sergipe e nordeste da Bahia, junto com as populações de *M. q. anthidioides* formaram o clado norte.

Souza *et al.* (2008) analisando populações de subespécies de *M. quadrifasciata* por meio de padrões RFLP do gene citocromo b mostraram associação entre os padrões RLFP observados e o padrão de faixas terçais presente nas subespécies de *M. quadrifasciata*. No presente estudo essa associação não foi observada, uma vez que indivíduos com padrão de faixas terçais diferente apresentaram o mesmo haplótipo (H14) (Figura 4).

As amostras com padrão de faixas terçais híbrido das localidades de Orolândia e Nova Soure no estado Bahia apresentaram o haplótipo H14, presente tanto em *M. q. anthidioides* quanto em populações com padrão de faixas terçais contínuo do norte de Minas Gerais. Essa estruturação mostra que o padrão híbrido em função da hibridação entre *M. q. anthidioides* e a população com padrão de faixas terçais contínuo do Sergipe e nordeste da Bahia não ocorre com base na herança materna. Entretanto, o processo de hibridação pode estar ocorrendo por meio do fluxo gênico entre machos com padrão de faixas terçais contínuo e fêmeas com padrão de faixas terçais

interrompido. Análises utilizando genes nucleares poderão confirmar ou confrontar essa hipótese.

A presença do padrão de faixas terçais contínuo nas populações do norte de Minas Gerais e do Sergipe e nordeste da Bahia é, possivelmente, decorrente da retenção de um polimorfismo ancestral, uma vez que o caráter faixas terçais contínuas no subgênero *Melipona* (*Melipona*) parece ser plesiomorfo, pois todas as abelhas deste grupo que se distribuem no Brasil possuem faixas abdominais contínuas.

A separação entre os clados norte e sul parece ter ocorrido em um momento diferente do surgimento do padrão de faixas terçais interrompido, pois as análises filogenéticas e a rede haplótipos, que mostram a presença destes clados, não concordam com uma separação elucidada em função desse caráter morfológico.

Possuir as faixas terçais interrompidas parece exercer alguma vantagem ecológica em relação às faixas terçais contínuas. A subespécie *M. q. anthidioides* possui uma ampla distribuição geográfica quando comparada com a forma com padrão de faixas terçais contínuo. Uma abelha da família Megachilidae, *Megachile pseudanthidioides*, possui uma semelhança morfológica com *M. q. anthidioides*, principalmente nas faixas terçais amarelas interrompidas presentes no metassoma. Essa abelha também possui uma ampla distribuição geográfica que vai de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul (Silveira *et al.* 2002; Moure *et al.* 2007) e também na caatinga no estado da Bahia.

A região do Vale do Ribeira do Iguape, localização da barreira de fluxo gênica estimada, apresenta uma falha geológica datada do Quaternário denominada Lineamento de Guapiara (Saadi *et al.* 2002). Segundo Melo *et al.* (1989) e Saadi *et al.* (2002) esse lineamento é uma falha normal que teve continuidade de sua atividade tectônica, na região, durante todo o Quaternário, e foi marcada por deformações de terraços no Vale do Ribeira do Iguape. Falhas geológicas, provavelmente, causaram alterações significativas nas biotas florestais, dando origem a barreiras geográficas que desencadearam eventos vicariantes sobre as espécies (Pereira & Almeida 1996).

A análise de coalescência mostrou que vicariância norte sul observada provavelmente ocorreu entre 490.000 e 390.000 anos A.P. Essa datação

concorda com a estimativa da movimentação mais recente do Lineamento de Guapiara, que foi durante o Quaternário (>1,3 milhões de anos) (Melo *et al.* 1989, Saadi *et al.* 2002).

A vicariância entre norte e sul aqui observada tem relação direta com a associação de *M. quadrifasciata* com regiões de altitude. Dados sobre a distribuição geográfica mostram de maneira geral esta abelha não se distribui em regiões com altitudes menores que 600 m. A falha do quaternário, Lineamento de Guapiara, localizada na região do Vale do Ribeira do Iguape associada com a presença da quebra filogeográfica, aqui observada, possivelmente tenha promovido a formação de um vale com baixa altitude que teria exercido a função de barreira geográfica que deu origem a formação dos clados sul e norte presentes na espécie.

A relação da distribuição geográfica com a altitude parece ser fundamental para algumas abelhas. Silveira *et al.* (2002) observaram padrões de disjunção associados com altitudes em algumas espécies de abelhas na região sul e sudeste do Brasil. As observações sugerem que as espécies envolvidas tiveram distribuições mais amplas no passado, durante períodos frios e com o aumento da temperatura, elas teriam se extinguido nas áreas mais baixas, subsistindo como populações isoladas em refúgios climáticos nos altos das serras (Silveira *et al.* 2002).

Barreiras geográficas com pequenas extensões podem atuar muito bem como barreira de fluxo gênico para meliponíneos. Segundo Nogueira-Neto (1954) o estabelecimento de novos ninhos ocorre em pequenas distâncias, pois, a colônia filha depende de alimento e operárias da colônia mãe até o seu estabelecimento.

Padrões filogeográficos similares com o presente estudo, têm sido reportados para outros grupos animais. Grazziotin *et al.* (2006) estudando um complexo de serpentes observaram a existência de dois clados (norte e sul) estruturados por 14 passos mutacionais na rede de haplótipos, com vicariância seja datada a 3,8 milhões de anos A.P. Cabanne *et al.* (2007) estudando uma espécie de pássaro (*Xiphorhynchus fuscus*) observaram um padrão filogeográfico também com separação entre clados norte e sul dentro da subespécie *X. fuscus fuscus*, com separação entre os clados de aproximadamente 70.000 anos A.P. Em ambos estudos são reportadas

expansões demográficas recentes associadas com fragmentações florestais oriundas de mudanças climáticas.

O padrão biogeográfico presente em *M. quadrifasciata*, provavelmente se repete em outras espécies de *Melipona*. As espécies da Floresta Atlântica *M. bicolor* e *M. marginata* exibem diferenciação morfológica que recebe o status de subespécies, e com a zona de separação entre as subespécies concordante com a separação em *M. quadrifasciata* (Moure 1975; Camargo & Pedro 2007).

Segundo Tuomisto (2007), diferentes *taxa* podem mostrar árvores filogenéticas semelhantes porque a especiação aconteceu por vicariância, no sentido de que as espécies residentes sofreram um colapso nas distribuições ancestrais de maneira semelhante, quando as várias barreiras de dispersão foram formadas. Entretanto, padrões biogeográficos semelhantes também podem surgir se partes diferentes da área analisada tiverem condições ambientais diferentes, que elas mesmas originaram em uma seqüência histórica de eventos geológicos e climáticos (Tuomisto 2007).

O presente estudo mostra que o caráter morfológico padrão de faixas terçais não é um bom indicativo para diferenciação das subespécies de *M. quadrifasciata*. Contudo, os dados não indicam exclusão do status de subespécie, uma vez que há presença de dois clados que concordam com abordagens anteriores de Kerr (1951) e Moure (1975).

Estudos sobre a diversificação evolutiva na região Neotropical são extremamente valiosos, pois essas abordagens ajudam a entender o efeito das glaciações pleistocênicas e das alterações geomorfológicas sobre a biota que observamos atualmente. Mais estudos se fazem necessários para confirmar se o efeito vicariante aqui observado se repete em outras espécies de abelhas ou outros de grupos animais.

5. Referências

- Avice JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University press, Cambridge, Massachusetts.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37-48.
- Cabanne GS, Santos FR, Miyaki CY (2007) Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, **91**, 73–84 .
- Caccone A, Sbordoni V (2001) Molecular biogeography, evolutionary rates, and morphological adaptations to cave life: a case study using Bathysciine beetles and sequence data from the mitochondria CO1 gene. *Evolution*, **55**, 122–130.
- Camargo JMF, Pedro SMR (2007) Meliponini. In: *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region* (orgs Moure JS, Urban D, Melo GAR), pp. 272–578. Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia.
- Crozier RH, Crozier YC (1993) The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, **133**, 97–117.
- Dick CW, Roubik DW, Gruber KF, Bermingham E (2004) Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. *Molecular Ecology*, **13**, 3775–3785.
- Ducke A. (1916) Enumeração dos Hymenopteros colligidos pela Comissão e Revisão das espécies de abelhas do Brasil. *Comm. Lin. Teleg. Estr. M. Gr. ao Amaz.*, **35**, 3–171.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, **11**, 2571–2581.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analyses of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479 – 491.

- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, **8**, 175–185.
- Ewing B, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, **8**, 186–194.
- Farrell BD (2001) Evolutionary assembly of the milkweed fauna: cytochrome oxidase 1 and the age of *Tetraopes* beetles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **18**, 469–478.
- 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. *Insectes Sociaux*, **52**, 11–18.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915–925.
- Fu YX, Li WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, **133**, 693–709.
- Gordon D, Abajian C, Green P (1998) Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, **8**, 195–202.
- Grazziotin FG, Monzel M, Echeverrigaray S, Bonatto SL (2006) Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, **15**, 3969–3982.
- 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. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673–4680.
- Huelsenbech JP, Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic tree. *Bioinformatics*, **17**, 754–755.
- Kerr WE (1951) Estudos sobre a genética de populações de Himenópteros em geral e dos Apíneos sociais em particular. Tese para livre docência. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, **8**, 219–354.

- 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). *Papéis Avulsos de Zoologia*, **20**, 135–145.
- Melo GAR, Campos LAO (1987) Variação no padrão de faixas na população de *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1936 no Estado de Minas Gerais (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Anais do XIV Congresso Brasileiro de Zoologia, Juiz de Fora, Minas Gerias. p.76
- Melo MS, Fernandes LA, Coimbra AM, Ramos RGN (1989) O Graben (Terciário ?) de Sete Barras, Vale do Ribeira do Iguape, SP. *Revista Brasileira de Geociências*, **19**, 260–262.
- Moure JS (1975) Notas sobre as espécies de *Melipona* descritas por Lepetelier em 1836 (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Biologia*, **3**, 15–17.
- Moure JS (1992) *Melikerria* e *Eomelipona*, dois subgêneros novos em *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera, Apidae). *Naturalia*, (**edição especial**), 62–66.
- Moure JS, Kerr WE (1950) Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apoidea). *Dusenya*, **1**, 105–129, + 2 estampas.
- Moure JS, Melo GAR, Dalmolin A. (2007) Megachilini. In: *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region* (orgs Moure JS, Urban D, Melo GAR), pp. 917–1001. Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia.
- Nielsen R, Wakeley J (2001) Distinguishing migration from isolation: a Markov chain Monte Carlo approach. *Genetics*, **158**, 885–896.
- Nylander JAA, Ronquist F, Huelsenbeck, JP, Nieves-Aldrey JL (2004) Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology*, **53**, 47–67.
- Nogueira-Neto P (1954) Notas bionômicas sobre meliponíneos: III – Sobre a enxameagem. *Arquivos do Museu Nacional*, **42**, 419–451.
- Nogueira-Neto P (1970) *A criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae)*. 2ª ed. São Paulo, Editora Tecnapis.
- Page RDM (2001) TreeView (Win32) 1.6.6. Adquirido em: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>

- Pereira JBS, Almeida JR (1996) Biogeografia e Geomorfologia. In: *Geomorfologia e Meio Ambiente* (orgs Guerra AJT, Cunha SB), pp. 195–247. Rio de Janeiro, Bertrand Brasil.
- Posada D, Krandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinf.*, **14**, 817–818.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19**, 2496–2497.
- Saadi A, Machette MN, Haller KM, Dart RL, Bradley L, Souza AMPD (2002) *Map and Database of Quaternary Faults and Lineaments in Brazil*. International Lithosphere Program Task Group II-2 Co-Chairman (Western Hemisphere), Denver, Colorado.
- Schwarz H (1932) The genus *Melipona* IV. The type genus of the Meliponidae or stingless bees. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **63**, 231–460.
- Silveira FA, Melo GAR, Almeida EAB (2002) *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. Fundação Araucária, Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Silvestre D, Downton M, Arias MC (2008) The mitochondrial genome of the stingless bee *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Sequence, gene organization and a unique tRNA translocation event conserved across the tribe Meliponini. *Genetics and Molecular Biology*, **31**, 451–460.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, **87**, 651–701.
- Soucy SL, Danforth BN (2002) Phylogeography of the socially polymorphic sweat bee *Halictus rubicundus* (Hymenoptera: Halictidae). *Evolution*, **56**, 330–341.
- Souza RO, Moretto G, Arias MC, Del Lama MA (2008) Differentiation of *Melipona quadrifasciata* L. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) subspecies using cytochrome b PCR-RFLP patterns. *Genetics and Molecular Biology*, **30**, 445–450.

- Swofford DL (1998) *PAUP*-A computer program for phylogenetic Inference using Maximum Parsimony and other methods*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tajima F (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetic*, **105**, 437–460.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596–1599.
- Tanaka H, Roubik DW, Kato M, Gunsalam G (2001) Phylogenetic position of *Apis nuluensis* of northern Borneo and phylogeography of *A. cerana* as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Insectes Souciaux*, **48**, 44–51.
- Tuomisto H (2007) Interpreting the biogeography of South America. *Journal of Biogeography*, **34**, 1294–1295.

CONCLUSÕES

- A distribuição geográfica de *M. quadrifasciata* observada estende-se do Sergipe e nordeste da Bahia até o Rio Grande do Sul e Misiones na Argentina, através da costa leste brasileira;
- A subespécie *M. q. quadrifasciata* ocupa a porção sul da distribuição, do Rio Grande do Sul até a metade sul de São Paulo, indo a oeste até a província de Misiones, na Argentina e porção sudeste do Paraguai; a subespécie *M. q. anthidioides* distribui-se da metade nordeste de São Paulo até o extremo norte da região da Chapada Diamantina, na Bahia, estendendo-se a oeste pelo Triângulo Mineiro e região central do estado de Goiás; e a distribuição das duas populações exibindo padrão de faixas contínuas em áreas disjuntas das populações do sul do Brasil foi no norte de Minas Gerais, e outra no Sergipe e nordeste da Bahia;
- Foram observados dois padrões RFLP do gene COI do DNA mitocondrial em *M. quadrifasciata* sendo um referente a *M. q. quadrifasciata* e outro a *M. q. anthidioides* e populações de faixa tergal contínua do norte de Minas Gerais e do Sergipe e nordeste da Bahia;
- Dois clados geograficamente estruturados foram evidenciados para *M. quadrifasciata* (clado sul e clado norte), o clado sul compreende a subespécie *M. q. quadrifasciata* e o norte foi formado pela subespécie *M. q. anthidioides* e as populações de faixa tergal contínua do norte de Minas Gerais e do Sergipe e nordeste da Bahia;
- A separação entre os clados observados foi datada entre 490 e 390 mil anos A.P.;
- A vicariância entre norte e sul tem relação direta com associação de *M. quadrifasciata* com regiões altitude, uma vez que abelha não se distribui em regiões com altitudes menores que 600 m. A falha do quaternário, Lineamento de Guapiara, possivelmente tenha promovido a formação de um vale com baixa altitude que teria exercido a função de barreira geográfica que deu origem a formação dos clados sul e norte presentes na espécie.