



Variabilidade genética de *Tetragnisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) de meliponários.

Genetic variability of *Tetragnisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) from meliponaries.



Leandro Rodrigues Santiago

**Variabilidade genética de *Tetragonisca angustula*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini) de
meliponários.**

**Genetic variability of *Tetragonisca angustula*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini) from
meliponaries.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Arias

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Rodrigues Santiago, Leandro

Variabilidade genética de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) de meliponários.

xii + 119

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. *Tetragonisca angustula* 2. Variabilidade Genética

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a) Maria Cristina Arias

Orientadora

Fotos da Capa:

Foto superior esquerda: operária de *Tetragonisca angustula angustula*. Foto de Luís Adrián Florit;

Foto superior direita: operária de *Tetragonisca angustula fiebrigi*. Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/80/meliponicultura.htm>;

Foto central esquerda: Resedá (*Lagerstroemia Indica*). Disponível em: <http://www.flickr.com/photos/pliniopierry/2330309602/>;

Foto central inferior: Entrada do ninho de *Tetragonisca angustula*. Foto de Paulo César Fernandes - Departamento de Ecologia - Instituto de Biociências - USP;

Foto central esquerda: coroa de Cristo (*Euphorbia milli*). Foto de Airton Mazzini;

Foto inferior esquerda: Meliponário Matriz do Santa Cruz. Disponível em: <http://criacaodeabelhassemferrao.blogspot.com.br/2010/09/meliponario-matriz-do-santa-cruz.html>;

Foto inferior central: mel do Meliponário Jandermm, Rio Grande do Norte. Disponível em: <http://www.omelhordavida.com.br/experiencias/gourmet/meliponario-jandermm-doce-experiencia>;

Foto inferior direita: meliponário do Projeto Meliponários Didáticos da Prefeitura Municipal de João Pessoa, Paraíba. Disponível em: <http://www.joaopessoa.pb.gov.br/pmjp-promove-reflorestamento-da-mata-atlantica-por-meio-de-meliponarios/>.

Dedicatória

Aos meus pais e irmãos.

Aos meus tios Valter e Doralice.

Aos meus amigos e também mentores Flávio e Rute.

À minha orientadora Dr^a Maria Cristina Arias.

Aos meliponicultores que forneceram as amostras.

Agradecimentos

À Deus pela vida, consciência, capacidade intelectual, propósito, provisão, direção, consolo e força.

À meus pais e meus irmãos por acreditarem em mim e terem me dado as condições necessárias para que eu viesse para São Paulo, me dando todo o suporte, sendo minha coluna. Mesmo que isso significasse sacrifício financeiro para eles.

Aos meus tios Valter e Doralice que entre todos os meus tios, paternos e maternos, me amaram como filho e me deram todo o suporte durante minha graduação e também nesta etapa. Hoje lhes considero como segundos pais.

Aos meus pastores Wellington Abreu e Gislane que foram minha família em São Paulo, me dando suporte emocional e familiar, além de valiosos ensinamentos pessoais que me ajudaram em todos os momentos.

Aos meus eternos mentores e amigos Flávio de Oliveira Francisco e Rute Magalhães Brito, que me introduziram no mundo da pesquisa, me incentivaram, ajudaram e ensinaram. Foram minha ponte para São Paulo, sem eles não teria ingressado no mestrado. Também agradeço ao Flávio pelo inestimável e impagável suporte e auxílio em todas as etapas do meu mestrado e pela oportunidade de realizar as viagens de coleta. "Foi baum terríve".

À todos os meus amigos, em especial o Jusé (Paulo Henrique) e a Juséia (Thaiomara), por estarem sempre presentes e me incentivarem.

À toda a equipe do Laboratório de Genética e Evolução de Abelhas (LGEA): Susy, por me ensinar o que é um laboratório e a me portar dentro dele; Yuri, pelo auxílio nas coletas e bancada; Elaine, pelas discussões e ensino de alguns softwares; e a todos que passaram pelo lab.

Aos meliponicultores: Jean pela amostras de Pedreira; Clóvis pelas amostras de Amparo; José Luciano pelas amostras e auxílio na procura dos meliponicultores no estado de São Paulo; Arthur Ewaldo Favaretto pelas amostras de Curitiba; Vilson Hackmann e Dalírio Irineu Reisner pelas amostras de Marechal Cândido Rondon e Santa Helena; Olindo Forgiarini pelas amostras de São Miguel do Iguaçu e Olindo Zarpellon pelas amostras de Entre Rios do Oeste. Um agradecimento especial ao Flávio Haupenthal pelas amostras de Marechal Cândido Rondon e Santa Helena e o auxílio na por meliponicários no estado do Paraná, além de sempre apresentar disponibilidade e estar de prontidão para fornecer amostras e me apresentar meliponicultores no estado do Paraná, você foi fundamental para a realização deste trabalho, obrigado!

À minha orientadora que me aceitou em seu laboratório. Sem mesmo me conhecer confiou no potencial de um rapaz vindo do Tocantins (Mato?). Obrigado por me lapidar, pelos valiosos conselhos, suporte, orientação, amizade, cuidado e paciência.

À FAPESP pelo financiamento do projeto (BIOTA-FAPESP 2004/15801-0 e 10/50597-5) e a bolsa TT3 (FAPESP 2008/07417-6 e 2012/00802-7).

À CAPES pela bolsa concedida.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 VARIABILIDADE GENÉTICA EM MELIPONINI	1
1.2 <i>TETRAGONISCA ANGUSTULA</i> E A MELIPONICULTURA	6
1.3 MARCADORES MOLECULARES	11
1.3.1 Microsatélites.....	11
1.3.2 DNA mitocondrial.....	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	16
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	18
3.3 MICROSSATÉLITES	18
3.3.1 Amplificação dos loci	18
3.3.2 Análise dos dados.....	20
3.4 DNA MITOCONDRIAL	23
3.4.1 Sequenciamento	23
3.4.2 Análise dos dados.....	25
4. RESULTADOS	26
4.1 MICROSSATÉLITES	26
4.1.1 Variabilidade genética.....	26
4.1.2 Estruturação populacional.....	29
4.2 DNA MITOCONDRIAL	35
4.2.1 Variabilidade genética.....	35
4.2.2 Estruturação populacional.....	39
5. DISCUSSÃO	43
5.1 VARIABILIDADE GENÉTICA	44

5.2 ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL	47
5.2.1 Fluxo gênico via machos.....	49
5.2.2 Transporte artificial de colônias.....	51
5.2.3 Divisão de colônias	52
5.2.4 Endocruzamento.....	53
5.3 CONCLUSÕES	57
6. CONCLUSÕES.....	58
7. RESUMO.....	59
8. ABSTRACT	60
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
10. APÊNDICE	76
10.1 APÊNDICE A: MATERIAL SUPLEMENTAR DA SEÇÃO RESULTADOS- MICROSSATÉLITES	76
10.2 APÊNDICE B: MATERIAL SUPLEMENTAR DA SEÇÃO RESULTADOS-DNA MITOCONDRIAL	113

Lista de Figuras

- Figura 1:** Operária de *Tetragonisca angustula* em voo. A seta indica a corbícula. Foto: Paulo César Fernandes - Departamento de Ecologia - Instituto de Biociências - USP..... 7
- Figura 2:** Mapa das Américas indicando a distribuição natural da espécie *T. angustula* em verde (modificado de Camargo e Pedro, 2012)..... 8
- Figura 3:** Entrada do ninho de *T. angustula* (parte inferior à direita) e operária guarda em voo (parte superior à esquerda). Foto: Paulo César Fernandes - Departamento de Ecologia - Instituto de Biociências - USP 9
- Figura 4:** Vista da entrada do ninho de *T. Angustula* à esquerda e estrutura da entrada em forma canudo à direita. Foto: Paulo César Fernandes - Departamento de Ecologia - Instituto de Biociências - USP 9
- Figura 5:** Estrutura interna do ninho de *T. angustula* mostrando os favos horizontais circundados pelas lamelas 10
- Figura 6:** Dois tipos de alocação de ninhos de *T.angustula* em meliponários. Foto à esquerda disponível em: <http://meliponarioabelhasdosul.webnode.com/meliponario-ab-do-sul-04>. Foto à direita: Fernando Oliveira, disponível em : <http://criacaodeabelhassemferrao.blogspot.com.br /2010/09/meliponario-matriz-do-santa-cruz.html> 11
- Figura 7:** Localização dos 11 locais amostrados nos estados de São Paulo e Paraná. **1-PED:** Pedreira; **2-SHE1** e **3-SHE2:** Santa Helena 1 e 2; **4-MCR1** e **5-MRC2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **6-ERO:** Entre Rios do Oeste; **7-SMI:** São Miguel do Iguaçu; **8-CUR:** Curitiba; **9-AMP:** Amparo; **10-SSB:** São Sebastião; **11-PNI:** Parque Nacional do Iguaçu..... 16
- Figura 8:** Relação entre tamanho amostral e número médio de alelos efetivos ($\diamond Ne$). Correlação não significativa ($P>0,05$)..... 27
- Figura 9:** Número médio de alelos rarefeito (Nar) e Número médio de alelos efetivos (Ne) por meliponário e amostras naturais. Linhas verticais pretas representam o erro-padrão. **PED:** Pedreira; **SHE1** e **2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1** e **2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu 28
- Figura 10:** Análise de Coordenadas Principais (PCA) realizada a partir dos resultados da estimativa de D_{est} para todos os meliponários e amostras naturais. **PED:** Pedreira; **SHE1** e **2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1** e **2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu 31
- Figura 11:** Relação entre distância geográfica (Km) e diferenciação populacional. Análise com todas as amostras. ($\diamond D_{est}$). Correlação significativa ($P<0,05$)..... 32
- Figura 12:** Relação entre distância geográfica (Km) e diferenciação populacional ($\diamond D_{est}$). **A:** amostras de São Paulo. **B:** amostras do Paraná 32

- Figura 13:** (A) Probabilidade de atribuição posterior (eixo vertical) de genótipos individuais (eixo horizontal) para cada um dos dois grupos (verde e vermelho) definidos pelo STRUCTURE. (B) Detalhe do mapa da região Sul-Sudeste do Brasil apresentando a proporção dos dois grupos representados em cada meliponário e amostras naturais de *Tetragonisca angustula*. O tamanho das circunferências é proporcional ao tamanho amostral. **PED:** Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu 33
- Figura 14:** Distribuição genotípica resultante da análise de *Population Assignment* em *T. angustula* de meliponários e amostras naturais. **PED:** Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu 34
- Figura 15:** Número de haplótipos (H) e haplótipos exclusivos (HE) por meliponário e amostras naturais. **PED:** Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu 36
- Figura 16:** Diversidade haplotípica (H_d) e nucleotídica (π) por meliponário e amostras naturais. **PED:** Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu 38
- Figura 17:** Relação entre tamanho amostral e diversidade haplotípica ($\blacklozenge H_d$) e nucleotídica ($\blacklozenge \pi$). Correlação não significativa ($P > 0,05$) 38
- Figura 18:** Rede de inter-relações haplotípicas entre os 52 haplótipos encontrados em amostras de *T. angustula* de meliponários e amostras naturais. Os números próximos aos ramos indicam o número de passos mutacionais. **PED:** Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu 39
- Figura 19:** Análise de Coordenadas Principais (PCA) realizada a partir dos resultados da estimativa de D_{est} para todos os meliponários e amostras naturais (ERO e SMI estão localizados atrás de MCR1). **PED:** Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu 41
- Figura 20:** Relação entre distância geográfica (Km) e diferenciação populacional ($\blacklozenge D_{est}$). Correlação significativa ($P < 0,05$) 41
- Figura 21:** Relação entre distância geográfica (Km) e diferenciação populacional ($\blacklozenge D_{est}$). **A:** amostras de São Paulo. **B:** amostras do Paraná 42

Lista de Tabelas

Tabela 1: Nome dos municípios, sigla dos meliponários visitados e número de ninhos amostrados por meliponário.	17
Tabela 2: Número de indivíduos de <i>Tetragonisca angustula</i> coletados por cidade do entorno do Parque Nacional de Iguaçu-PR	17
Tabela 3: Distância geográfica aproximada em quilômetros par a par entre os meliponários e amostras naturais	17
Tabela 4: Ciclo de PCR para cada locus de microssatélite amplificado em <i>Tetragonisca angustula</i>	19
Tabela 5: Pares de <i>primers</i> para amplificação de regiões do genoma mitocondrial de <i>T. angustula</i>	24
Tabela 6: Número médio de alelos rarefeito (N_r), Número médio de alelos efetivos (N_e), Heterozigose observada (H_o) e esperada (H_e) segundo o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e F_{IS} com o valor P (entre parêntesis) por meliponário e amostras naturais	28
Tabela 7: Estimativa de diferenciação genética de Jost (D_{est}) para todos os pares de meliponários e amostras naturais (microssatélites)	30
Tabela 8: Análise de Variância Molecular (AMOVA) em <i>T. angustula</i> de meliponários e amostras naturais (microssatélites)	34
Tabela 9: Número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (H_d) e nucleotídica (π) e seus erros-padrão (entre parêntesis) e número de sítios polimórficos (S) por meliponário e amostras naturais e total	37
Tabela 10: Estimativa de diferenciação genética de Jost (D_{est}) para todos os pares de meliponários e amostras naturais (DNA mitocondrial)	40
Tabela 11: Análise de Variância Molecular (AMOVA) em <i>T. angustula</i> de meliponários e amostras naturais (DNA mitocondrial)	42

1. INTRODUÇÃO

1.1 VARIABILIDADE GENÉTICA EM MELIPONINI

Grande parte da flora tropical brasileira é polinizada por abelhas, com destaque àquelas pertencentes à tribo Meliponini (abelhas sem ferrão). Esta tribo possui ampla distribuição e pode ser encontrada em todas as regiões tropicais do planeta, sendo que sua maior diversidade e abundância são encontradas na região neotropical (Camargo e Pedro, 1992; Michener, 2007). Dos 56 gêneros válidos, 33 são exclusivamente neotropicais, com 397 espécies descritas (Camargo e Pedro, 2012). Essa tribo possui como características marcantes o ferrão reduzido e o comportamento altamente eussocial (Silveira *et al.*, 2002; Michener, 2007). Este comportamento é caracterizado pela sobreposição de gerações, divisão do trabalho reprodutivo em um sistema de castas, cuidado cooperativo da prole e diferenças morfológicas entre rainhas e operárias (Wilson, 1971; Michener, 2007).

Estudos têm mostrado o importante papel ecológico e econômico dos Meliponini, especialmente pela polinização (Aidar, 1996; Kerr *et al.*, 1996; Nogueira-Neto, 1997; Malagodi-Braga e Kleinert, 2002; Bacelar-lima *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2009). A contribuição econômica das abelhas sem ferrão é reconhecida. Estima-se que cerca de mais de 60% das culturas vegetais tropicais sejam polinizadas por abelhas sem ferrão (Brosi, 2009). A polinização mediada por Meliponini provavelmente vem contribuindo com bilhões de dólares para a economia tropical (Klein *et al.*, 2007; Ricketts *et al.*, 2008). A contribuição da polinização é tão significativa que pode chegar a beneficiar em 35% o suprimento de alimento no mundo (Klein *et al.*, 2007).

Ecologicamente, os polinizadores são considerados essenciais para a biodiversidade global (Daily, 1997; Giannini *et al.*, 2012). As abelhas possuem substancial papel como polinizadores de plantas nativas. Pelo fato de utilizarem vários recursos vegetais, tais como: néctar como fonte de carboidratos, pólen como fonte proteica e resinas para construção do ninho, a polinização ocorre muitas vezes como consequência (Roubik, 1992; Velthuis, 1997). Contudo, essa interação inseto-planta tem sido perturbada pela degradação e desmatamento das florestas, uso indiscriminado de defensivos agrícolas, queimadas e mesmo pela ação de meleiros (Jazen, 1980; Kremen *et al.*, 2002; Kremen *et al.*, 2004; Ricketts *et al.*, 2008; Freitas *et al.*, 2009; Potts *et al.*, 2010; Lautenbach *et al.*, 2012).

Apesar do reconhecido e importante papel ecológico dos Meliponini, pouco se sabe sobre a variabilidade genética populacional de suas espécies. Os parâmetros genéticos são de extrema importância, pois podem ser utilizados para inferir processos que moldam ou moldaram as populações, possibilitando traçar estratégias de conservação para espécies (Couceiro *et al.*, 2011; Ishtiaq *et al.*, 2011; Moutou *et al.*, 2011). As interpretações de dados genéticos devem levar em consideração os aspectos ecológicos e comportamentais das espécies estudadas. Dentre esses, destaco a eussocialidade e a filopatria.

O comportamento altamente eussocial causa a diminuição do tamanho populacional efetivo, pois embora existam muitos indivíduos em um ninho, somente a rainha e os machos são reprodutivos. Isso teoricamente pode causar diminuição da variabilidade genética. Há uma redução do potencial de polimorfismo genético dado o baixo número de indivíduos reprodutivos (Pamilo *et al.*, 1978). Packer e Owen (2001) comparando espécies de insetos sociais e solitários viram que a variação genética neutra nos primeiros era menor.

A filopatria é o comportamento que algumas espécies têm de retornar, ou mesmo permanecer, ao seu local de nascimento para reprodução (Hulin e Guillon, 2007). Aventa-se que este comportamento possa ter sido a base da socialidade e cooperação em algumas



espécies de aves e mamíferos trazendo-lhes tanto benefícios sociais quanto ecológicos (Marino *et al.*, 2012). Contudo, apesar desses benefícios, a filopatria pode limitar a dispersão agindo como um fator de estruturação genética. Este fato tem sido reportado para alguns insetos sociais (Ross, 2001). Como consequência da baixa dispersão temos o isolamento e a subdivisão populacional, levando à diminuição da variabilidade genética e do número efetivo populacional, ao endocruzamento, e a uma ação mais acentuada da deriva genética (Hartl e Clark, 2007). Geralmente se dos sexos se apresenta como filopátrico e o outro atua como dispersor. Em alguns organismos é descrito que se a fêmea é filopátrica, geralmente o macho é o responsável pelo fluxo gênico, sendo o sexo dispersor, ou vice-versa (Bengtsson, 1978; Whitehead, 1998; Nyakaana e Arctander, 1999; Kappeler *et al.*, 2002; Apio *et al.*, 2010). Este tipo de mecanismo comportamental é positivo, pois minimiza os efeitos negativos da filopatria descritos acima. Em abelhas sem ferrão, alguns estudos já mostraram que as rainhas são filopátricas (Nogueira-Neto, 1954; Engels e Imperatriz-Fonseca, 1990) e que os machos são os dispersores (Cameron *et al.*, 2004; Carvalho-Zilse e Kerr, 2004).

Além dos fatores comportamentais apontados acima, o sistema genético das abelhas também pode influenciar a variabilidade genética. Todos os Hymenoptera são haplodiploides. As fêmeas são diploides e os machos haploides (Whiting, 1933). Nesse sistema há uma diferença no conjunto de cromossomos entre machos e fêmeas. Isso faz com que populações haplodiploides tenham menos cópias gênicas do que populações diploides, levando a um tamanho populacional efetivo menor (Crozier, 1976). Além disso, alelos vantajosos ou recessivos deletérios são constantemente expostos à seleção nos machos sendo rapidamente fixados (para os vantajosos) ou expurgados (para os deletérios) (Avery, 1984; Hedrick e Parker, 1997). Portanto, espera-se que os haplodiploides tenham uma variabilidade genética menor do que populações diploides (Zayed, 2009). De fato, em comparações de variação genética neutra entre insetos haplodiploides, *Drosophila* e Lepdoptera verificou-se

ser esta menor nos haplodiploides (Hedrick e Parker, 1997; Packer e Owen, 2001). Em geral, baixa variabilidade genética em Meliponini tem sido observada (Costa *et al.*, 2005; Francisco *et al.*, 2006; Tavares *et al.*, 2007; Carvalho-Zilse *et al.*, 2009; Borges *et al.*, 2010; Francisco e Arias, 2010).

Os efeitos danosos oriundos da baixa variabilidade genética são conhecidos. No entanto em abelhas, e na maioria dos Hymenoptera, existe um fator adicional: um sistema particular de determinação do sexo que pode afetar negativamente a variabilidade genética. A maioria dos Hymenoptera se reproduz por partenogênese arrenótoca, onde ovos fertilizados dão origem a fêmeas (diploides) e ovos não fertilizados originam machos (haploides) (Bull, 1983). Isso foi primeiramente demonstrado na vespa parasita *Habrobracon juglandis*, hoje conhecida como *Bracon hebetor* (Whiting, 1933). No entanto, Whiting (1943) registrou em linhagens endocruzadas dessa vespa a produção de machos diploides, resultado discordante com o esperado pelo sistema partenogenético. A análise desses machos, e posteriores análises de ligação gênica, indicou que a determinação sexual poderia estar condicionada a um único locus genético multialélico. A partir destes dados foi proposta a hipótese de um sistema de determinação do sexo complementar denominado *Complementary Sex Determination (CSD)* (Whiting, 1943). Neste sistema, fêmeas são heterozigotas para esse locus e os machos são hemi ou homozigotos (Beye *et al.*, 2003.) Hoje sabe-se que esse sistema complementar não ocorre somente em vespas, mas na grande maioria dos Hymenoptera (Heimpel e de Boer, 2008). Um estudo recente mostrou que o *CSD* é o mecanismo ancestral dentro da ordem e não o complementar como se pensava (Asplen *et al.*, 2009).

Em três espécies de abelha do gênero *Apis* foram identificados dois genes presentes no Locus da Determinação Sexual (LDS): *csd* (*complementary sex determiner*) e *fem* (*feminizer*) (Beye *et al.*, 2003; Hasselmann *et al.*, 2008). O gene *fem* também foi identificado em duas outras abelhas: *Melipona compressipes* e *Bombus terrestris*

(Hasselmann *et al.*, 2008). O mecanismo molecular da determinação sexual, bem descrito em *Apis*, funciona da seguinte forma: o produto do gene *csd* atua no *splicing* do gene *fem*; este codifica uma proteína que forma complexos protéicos multiméricos que agem no *splicing* do gene *Am-dsx* (Hasselmann *et al.*, 2008; Gempe *et al.*, 2009). Esse gene é ortólogo do gene *doublesex* (*dsx*) presente em *Drosophila* e é responsável pelo desenvolvimento sexual do indivíduo (Gempe *et al.*, 2009). Quando há somente uma forma alélica do *csd* (em hemi ou homozigose), uma proteína não funcional é produzida (Beye *et al.*, 2003). Com isso, o RNA mensageiro (RNAm) do *fem* não sofre *splicing* e apresentará um códon de parada prematuro. Desse modo a cascata de desenvolvimento leva à formação de machos por *default*, visto que nem o *fem* nem o *Am-dsx* sofrerão *splicing* (Hasselmann *et al.*, 2008; Gempe *et al.*, 2009). Quando há variantes alélicas do *csd* (em heterozigose) uma proteína heteromérica é formada (Beye *et al.*, 2003). Nesse caso ela é funcional e age no *splicing* do *fem* (Hasselmann *et al.*, 2008). Assim o RNAm não apresentará o códon de parada prematuro, haverá a tradução desse RNAm em um produto funcional e a cascata de desenvolvimento de fêmea seguirá (Hasselmann *et al.*, 2008; Gempe *et al.*, 2009). Portanto, quando há poucos alelos segregando em uma população, a probabilidade de homozigose no LDS é maior.  Nessa situação, o indivíduo homozigoto não será diferente do hemizigoto, já que o primeiro possui duas cópias do mesmo alelo. Portanto, mesmo sendo diploide o indivíduo se desenvolverá como macho (Cook, 1993).  Esses machos são prejudiciais para as populações, pois são estéreis e/ou inviáveis (Stouthamer *et al.*, 1992; Agoze *et al.*, 1994). Desse modo, eles diminuem o *fitness* reprodutivo e a taxa de crescimento da colônia e, conseqüentemente, o tamanho populacional efetivo (Plowright e Pallet, 1979; Page, 1980; Ross e Fletcher, 1986; Ross *et al.*, 1993).

Portanto, as populações pequenas, sujeitas a uma ação mais severa da deriva genética e ao aumento da probabilidade de endocruzamento (Zayed, 2009), ainda sofrem dos

fatores genéticos adicionais que podem levar ao "Vórtex de Machos Diploides" levando a uma rápida extinção do ninho ou da população (Zayed e Packer, 2005).

1.2 *TETRAGONISCA ANGUSTULA* E A MELIPONICULTURA

A criação de abelhas sem ferrão para fins econômicos tem se tornado cada vez mais popular (Imperatriz-Fonseca *et al.*, 1984; Aidar, 1996; Chiari *et al.*, 2002). Uma espécie que tem sido alvo de criação é a *Tetragonisca angustula*. Essa espécie é conhecida popularmente no Brasil como jataí. É caracterizada por possuir um corpo pequeno e delgado de 4 a 5 mm e uma corbícula extremamente pequena que não ocupa toda a largura da tíbia (Figura 1) (Michener, 2007). Possui comportamento altamente eussocial e está distribuída desde o sul do México até o sul do Brasil (Figura 2) (Camargo e Pedro, 2012). Seu nicho ecológico é muito peculiar, pois se trata de uma espécie que sobrevive muito bem em locais onde há grande número de colônias de outras abelhas (Nogueira-Neto, 1997). É generalista quanto aos hábitos de nidificação, utilizando desde cavidades de troncos vivos ou mortos até paredes de alvenaria e tubulações, ocorrendo com frequência em áreas antropofizadas (Freitas e Soares, 2004). A colônia pode chegar a conter 10.000 indivíduos (Grüter *et al.*, 2011). É constituída por: uma rainha, que realiza postura de até 50 ovos por dia em época de boa florada; por zangões, cuja função é de fecundar uma rainha virgem; e por operárias, que realizam todo o trabalho da colônia (Nogueira-Neto, 1997). É considerada como uma espécie monoândrica, ou seja, apenas um macho fecunda a rainha (Imperatriz-Fonseca *et al.*, 1998; Paxton, 2000). *T. angustula* é a única espécie que possui dois tipos de operárias guardas: as que permanecem dentro do ninho (como nas outras espécies de Meliponini) e as que ficam pairando próximo à entrada do ninho (Wittmann, 1985) (Figura 3). Diferenças morfológicas

foram verificadas entre as operárias guardas externas e as forrageiras, tais como peso e tamanho do corpo, comprimento das pernas (todas maiores nas primeiras) e tamanho da cabeça (maior nas forrageiras) (Grüter *et al.*, 2012). A arquitetura e organização do ninho são marcantes. Sua entrada é caracterizada por um tubo de cerume marrom-amarelado com a extremidade apresentando bordas mais estreitas de uma cera mais clara (Freitas e Soares, 2004) (Figura 4). Internamente o ninho é constituído por favos horizontais envoltos por um invólucro de cerume disposto em várias lamelas cuja função é de termorregulação (Figura 5); é comum encontrar depósitos de própolis dentro da colônia, que juntamente com a cera, são utilizados para fechar buracos e construir as paredes do ninho (Campos, 1980; Kerr, 1996). Na natureza, as colônias se reproduzem a uma taxa de uma vez a cada dois anos (Slaa, 2006).

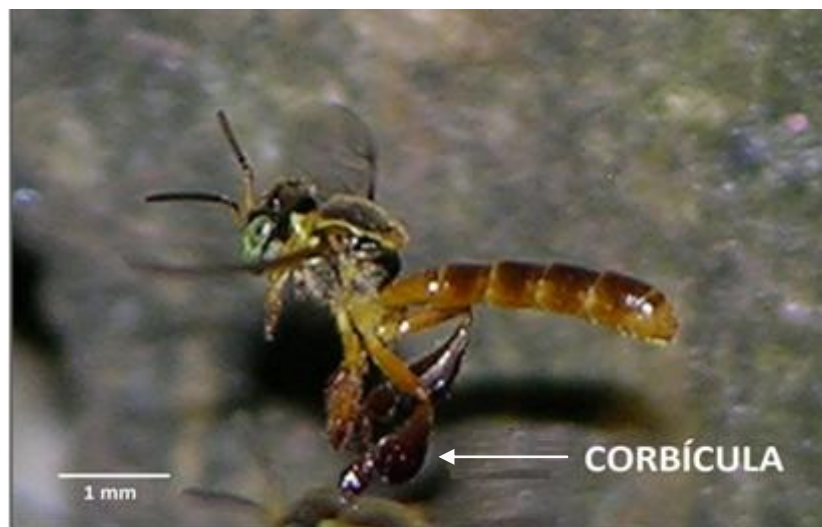


Figura 1: Operária de *Tetragonisca angustula* em voo. A seta indica a corbícula. Foto: Paulo César Fernandes - Departamento de Ecologia - Instituto de Biociências - USP.



Figura 2: Mapa das Américas indicando, em verde, a distribuição natural da espécie *T. angustula* (modificado de Camargo e Pedro, 2012).



Figura 3: Entrada do ninho de *T. angustula* (parte inferior à direita) e operária guarda em voo (parte superior à esquerda). Foto: Paulo César Fernandes - Departamento de Ecologia - Instituto de Biociências - USP.



Figura 4: Vista da entrada do ninho de *T. Angustula* à esquerda e estrutura da entrada em forma canudo à direita. Foto: Paulo César Fernandes - Departamento de Ecologia - Instituto de Biociências - USP.



Figura 5: Estrutura interna do ninho de *T. angustula* mostrando os favos horizontais circundados pelas lamelas.

A abelha jataí produz mel de sabor muito apreciado, chegando a ser oito vezes mais valorizado do que o mel de *Apis mellifera*, além de ser amplamente utilizado em medicina popular (Imperatriz-Fonseca *et al.*, 1984; Nogueira Neto, 1997; Freitas e Soares, 2004). Além disso, tanto o mel quanto a própolis de *T. angustula* possuem atividade antibacteriana (Miorin *et al.*, 2003; Sgariglia *et al.*, 2010). Nos meliponários, os ninhos são organizados próximos uns aos outros (Figura 6) e o aumento do plantel geralmente é feito por divisão de colônias (Nogueira Neto, 1997). Ainda, é comum colônias enxamearem (divisão natural reprodutiva) e ocuparem ninhos vazios no próprio meliponário. Dada essas características a pergunta que levantamos é: como essas divisões, unidas ao comportamento filopátrico, estão afetando a variabilidade genética de *T. angustula* mantidas em meliponários? Nosso cenário hipotético é: populações de meliponários estão estruturadas e endocruzadas, e apresentam baixa variabilidade genética. Dado esse cenário, analisamos aqui

a variabilidade genética de amostras de *T. angustula* oriundas de meliponários por meio de marcadores moleculares.



Figura 6: Dois tipos de alocação de ninhos de *T. angustula* em meliponários. Foto à esquerda disponível em: <http://meliponarioabelhasdosul.webnode.com/meliponario-ab-do-sul-04>. Foto à direita: Fernando Oliveira, disponível em : <http://criacaodeabelhasemferrao.blogspot.com.br/2010/09/meliponario-matriz-do-santa-cruz.html>.

1.3 MARCADORES MOLECULARES

1.3.1 Microssatélites

Os marcadores moleculares do tipo microssatélite são ideais para estudos genético-populacionais, como no cenário descrito acima, já que apresentam herança biparental e os seus loci são altamente polimórficos. Os microssatélites são sequências de DNA repetidas em tandem. As repetições podem variar de uma a seis bases de comprimento (Hancock, 1999). Os microssatélites são classificados em quatro grupos:

- 1) perfeitos (ACACACACACAC), quando não há interrupção na sequência;
- 2) imperfeitos (AGAGAGTGAGAG), quando há interrupção por uma base na sequência;
- 3) interrompidos (AGAGCCCAGAG), quando há interrupção por um pequeno número de bases na sequência;
- 4) compostos (GAGAGAATATATAT), quando há dois ou mais microssatélites adjacentes.

A eficiência desses marcadores vem do alto polimorfismo, seletividade neutra, codominância e segregação do tipo Mendeliana (Hillis *et al.*, 1996; Strassmann *et al.*, 1996; Sunnucks, 2000). São amplamente utilizados em estudos de mapeamento gênico, relações de parentesco (Chakraborty e Kimmel, 1999), variação intraespecífica (Moritz e Hillis, 1996), hibridação, história populacional e filogeografia (Maletzky *et al.*, 2008; Sakaguchi *et al.*, 2012; Weckworth *et al.*, 2012; Zhai *et al.*, 2012).

Sua primeira utilização em estudos de estrutura genética de populações de abelhas ocorreu em 1995 (Estoup *et al.*, 1995), envolvendo nove populações de *Apis mellifera* pertencentes a sete subespécies africanas e **européias**. Os primeiros microssatélites de Meliponini foram descritos em 1998 para a espécie *Melipona bicolor* (Peters *et al.*, 1998). Desde esta primeira descrição para abelhas sem ferrão, os microssatélites vêm sendo amplamente utilizados, especialmente em estudos de variabilidade genética. Alguns destes estudos em Meliponini detectaram baixa variabilidade, estruturação genética e endocruzamento (Francisco *et al.*, 2006; Tavares *et al.*, 2007; Carvalho-Zilse *et al.*, 2009; Borges *et al.*, 2010). Todavia, as conclusões foram feitas a partir de resultados obtidos com o uso de *primers* heteroespecíficos. Isso pode enviesar os resultados no sentido de indicar baixa variabilidade genética, visto que em geral a variabilidade genética detectada com o uso de *primers* homoespecíficos é maior, especialmente devido ao maior sucesso na amplificação dos alelos e a menor suscetibilidade à ocorrência de alelos nulos (Pépin *et al.*, 1995; Francisco

et al., 2006). Em abelhas sem ferrão, lócus de microssatélites foram isolados e caracterizados para 13 espécies: *Melipona bicolor* (Peters *et al.*, 1998), *Scaptotrigona postica* (Paxton *et al.*, 1999a), *Trigona carbonaria* (Green *et al.*, 2001), *Nannotrigona testaceicornis* (Oliveira *et al.*, 2009), *Tetragonisca angustula* (Brito *et al.*, 2009), *Melipona seminigra* (Francini *et al.*, 2009), *Melipona rufiventris* (Lopes *et al.*, 2009), *Melipona mondury* (Lopes *et al.*, 2010a), *Melipona interrupta* (Francini *et al.*, 2010), *Plebeia remota* (Francisco *et al.*, 2011), *Frieseomelitta varia* (Gonçalves *et al.*, 2011), *Scaptotrigona xanthotricha* (Duarte *et al.*, 2012) e *Scaura latitarsis* (Francisco *et al.*, 2013).

1.3.2 DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial (DNAMt) é bastante utilizado como marcador molecular em estudos filogenéticos, filogeográficos e caracterização de populações, espécies e subespécies (Harrison, 1989; Kocher *et al.*, 1989; Hall, 1991; Francisco *et al.*, 2001; Hebert *et al.*, 2003; Brito e Arias 2010; Francisco e Arias, 2010; Ishtiaq *et al.*, 2011). Nos animais a molécula de DNAMt é bem peculiar, pois apresenta tamanho pequeno (16Kb), estrutura gênica simples (ausência de introns, de DNA repetitivo, de pseudogenes, de elementos transponíveis e as regiões intergênicas quando presentes são pequenas), ausência de recombinação (com raras exceções) e o modo de herança é, na maioria dos organismos, materna (Brown, 1985; Moritz *et al.*, 1987; Galtier *et al.*, 2009). O conteúdo gênico é bastante conservado, consistindo de dois genes para subunidades ribossômicas (*12S* e *16S*), 22 para os RNA transportadores, três para as subunidades da enzima citocromo c oxidase (*COI*, II e III), um para o citocromo B (*CytB*), dois para as subunidades da ATPase (*ATPase* 6 e 8) e sete para as subunidades da NADH desidrogenase, além de uma região não codificadora, rica em A+T, responsável pela origem de replicação e transcrição da molécula (Wolstenholme, 1992). A taxa de evolução do

genoma mitocondrial é até 10 vezes maior que a taxa de um gene nuclear de cópia única, apesar de, em alguns organismos, os genes mitocondriais apresentarem a mesma taxa de evolução dos genes nucleares de cópia única (Brown *et al.*, 1979; Pietromonaco *et al.*, 1986; Powell *et al.*, 1986; Moritz *et al.*, 1987). No Brasil, o primeiro estudo de caracterização molecular do DNAm_t em abelhas ocorreu em 1990, para as linhagens de *Apis mellifera* africanizada e **européia** (Arias *et al.*, 1990). Polimorfismos do DNAm_t também foram bastante válidos em estudos de caracterização ao nível inter e intra-específico de *A. mellifera* (Moritz *et al.*, 1986; Hall, 1991; Sheppard *et al.*, 1994; Zamora *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2009; Özdil *et al.*, 2009). Em Meliponini, os estudos empregando o DNAm_t são mais recentes e abordam análises filogenéticas (Rasmussen e Cameron, 2007; Rasmussen e Camargo, 2008; Ramírez *et al.*, 2010; Rasmussen e Cameron, 2010), filogeográficas (Batalha-Filho *et al.*, 2010), caracterização molecular do DNAm_t, variabilidade e diferenciação genética (Francisco *et al.*, 2001; Weinlich *et al.*, 2004; Brito e Arias, 2005; Moretto e Arias, 2005; Silvestre e Arias, 2006; Barni *et al.*, 2007; Quezada-Euán *et al.*, 2007; Silvestre, *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2009; Brito e Arias 2010; Francisco e Arias, 2010; Itzá *et al.*, 2010; Kolling e Moretto, 2010; Thummajitsakul *et al.*, 2011). No entanto, estudos empregando análises do DNAm_t para estudos populacionais e evolutivos em *T. angustula* ainda são escassos (Moretto e Arias, 2005; Kolling e Moretto, 2010).

2. OBJETIVOS

O objetivo central deste trabalho foi analisar a variabilidade genética de *Tetragonisca angustula* provenientes de meliponários, comparar os dados com os de populações naturais, e fazer uma correlação da variabilidade genética com as práticas de meliponicultura que forem conhecidas para cada meliponário amostrado. Para isso cumprimos as seguintes metas:

- Analisar a variabilidade do DNA nuclear das amostras por meio da análise de nove locos espécie-específicos de microssatélites;
- Analisar a variabilidade do DNA mitocondrial das amostras através do sequenciamento de um trecho dos genes *Citocromo Oxidase subunidade I (COI)* e *Citocromo B (CytB)*;
- Determinar os haplótipos mitocondriais e suas relações genéticas;
- Inferir a existência e a direção do fluxo gênico;
- Inferir o nível de endocruzamento nos meliponários;
- Inferir o número de ninhos fundadores nos meliponários.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram visitados nove meliponários localizados nos estados de São Paulo e Paraná (Figura 7). Entre 45 e 50 ninhos de *Tetragonisca angustula* por meliponário foram amostrados. Um indivíduo por ninho foi utilizado nas análises, totalizando 430 indivíduos. Os dados da amostragem estão resumidos na tabela 1. As abelhas foram mantidas a -80°C até a extração do material genético. Foram coletados 100 indivíduos na natureza, na região de São Sebastião (SSB), litoral norte do estado de São Paulo (50 indivíduos) e em cidades no entorno do Parque Nacional do Iguaçu (PNI) (Tabela 2), no estado do Paraná (50 indivíduos) (Figura 7). A distância geográfica aproximada entre todos os grupos amostrais é dada na tabela 3.

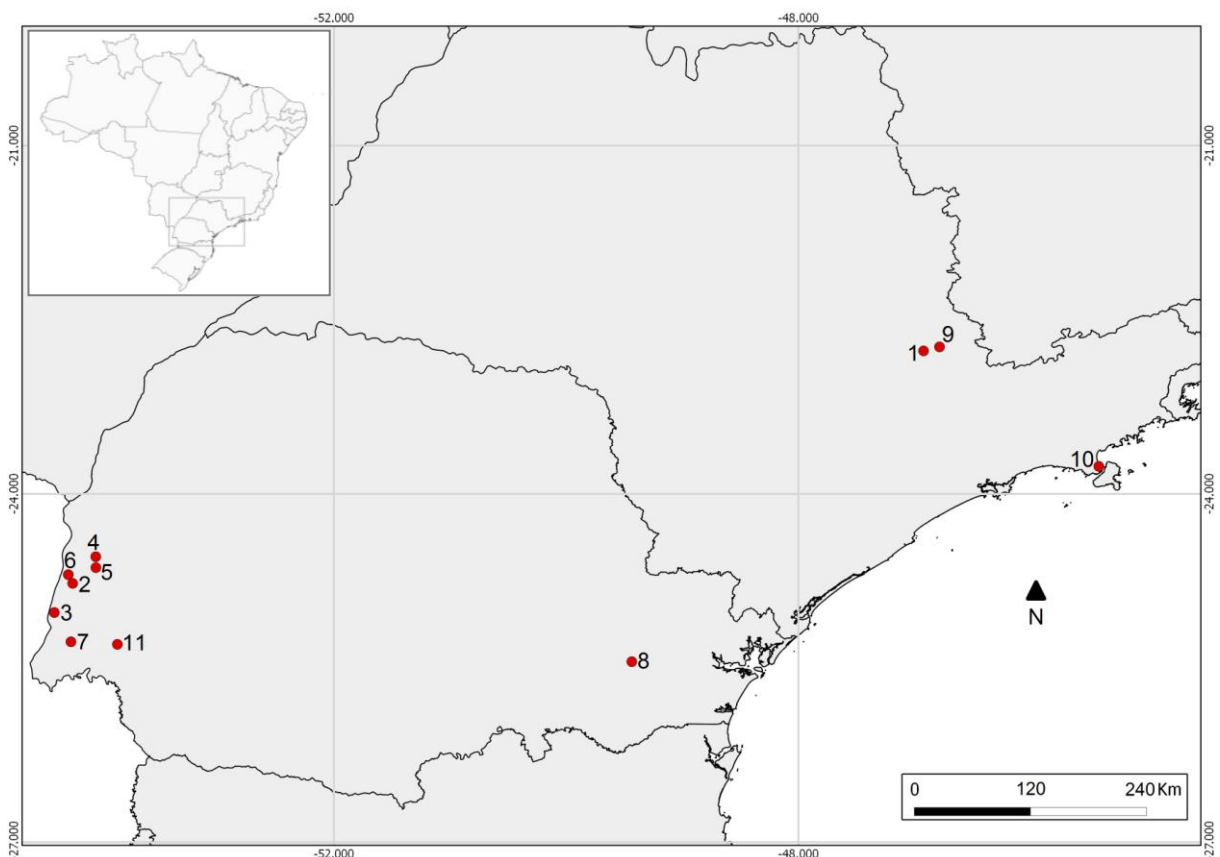


Figura 7: Localização dos 11 locais amostrados nos estados de São Paulo e Paraná. 1-PED: Pedreira; 2-SHE1 e 3-SHE2: Santa Helena 1 e 2; 4-MCR1 e 5-MRC2: Marechal Cândido Rondon 1 e 2; 6-ERO: Entre Rios do Oeste; 7-SMI: São Miguel do Iguaçu; 8-CUR: Curitiba; 9-AMP: Amparo; 10-SSB: São Sebastião; 11-PNI: Parque Nacional do Iguaçu.


Tabela 1: Nome dos municípios, sigla das amostras naturais e meliponários visitados e número de ninhos e indivíduos amostrados por meliponário e amostras naturais, respectivamente.

Municípios	Ninhos/Indivíduos
Pedreira-SP (PED)	50
Santa Helena-PR (SHE1)	45
Santa Helena-PR (SHE2)	50
Marechal Cândido Rondon-PR (MCR1)	45
Marechal Cândido Rondon-PR (MCR2)	50
Entre Rios do Oeste-PR (ERO)	50
São Miguel do Iguaçu-PR (SMI)	50
Curitiba-PR (CUR)	45
Amparo-SP (AMP)	45
São Sebastião (SSB)	50
Parque Nacional do Iguaçu (PNI)	50

Tabela 2: Número de indivíduos de *Tetragonisca angustula* coletados por cidade do entorno do Parque Nacional de Iguaçu-PR.

Municípios	Número de indivíduos coletados
Capanema	3
Capitão Leônidas Marques	3
Céu Azul	17
Foz do Iguaçu	8
Lindoeste	4
Matelândia	3
Santa Lúcia	1
Santa Tereza do Oeste	5
São Miguel do Iguaçu	5
Serranópolis do Iguaçu	1

Tabela 3: Distância geográfica aproximada em quilômetros par a par entre os meliponários e amostras naturais.

	PED	SHE1	SHE2	MCR1	MCR2	ERO	SMI	CUR	AMP	SSB
PED										
SHE1	790,8									
SHE2	817,0	65,2								
MCR1	765,1	56,8	65,2							
MCR2	770,7	38,2	56,8	11,7						
ERO	793,2	31,2	38,2	30,3	25,2					
SMI	812,5	502,0	31,2	85,2	64,3	64,3				
CUR	401,8	802,0	502,0	474,3	472,6	497,5	486,5			
AMP	21,4	922,7	802,0	753,8	753,5	775,5	794,0	392,0		
SSB	179,3	40,0	922,7	890,0	883,2	904,0	909,7	445,0	189,1	
PNI	775,5	69,1	40,0	86,3	75,8	79,0	40,6	450,8	758,0	873,6

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA total foi extraído pelo método Chelex® 100 (Bio-Rad, Herts, Reino Unido) de acordo com Walsh *et al.* (1991). O tórax de um indivíduo por ninho foi levemente macerado em 400 µl de Chelex 10%, incubado por 30 min. a 56 °C, vortexado por 10 seg., incubado novamente por 5 min. a 100 °C e vortexado por 10 seg. A solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 3 min. e estocada a -20 °C. O sobrenadante foi usado para as reações de PCR.

3.3 MICROSSATÉLITES

3.3.1 Amplificação dos loci

Para as reações de amplificação dos loci de microssatélites foi utilizado 1 µl da extração de DNA Chelex. Nove loci homoespecíficos foram amplificados (Tang03, Tang11, Tang12, Tang17, Tang57, Tang60, Tang65, Tang68, Tang70) (Brito *et al.*, 2009). A estratégia para as reações de PCR utilizada aqui foi primeiramente descrita por Schuelke (2000), em que os *primers forward* são desenhados com uma sequência adicional de oligonucleotídeos (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3') acoplados em sua extremidade 5'. Durante as reações de amplificação essa sequência adicional é incorporada ao amplicon. Nas reações posteriores os *primers forward* são substituídos por um *primer* com a mesma sequência do oligonucleotídeo adicional, marcado na sua extremidade 5' com os fluoróforos 6-FAMTM (Integrated DNA Technologies), HEXTM (Integrated DNA Technologies) ou NEDTM (Applied Biosystems). Assim os fragmentos gerados nas reações de amplificação posteriores se tornam marcados com um desses três fluoróforos.

As reações de PCR foram realizadas segundo descrito em Francisco *et al.* (2011), em que a mistura de PCR (volume final 5 μ l) continha: tampão de PCR 1x, 200 μ M de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 0,125 μ M do *primer* marcado com um dos fluoróforos, 0,0125 μ M do *primer forward* com a sequência adicional, 0,125 μ M do *primer reverse*, 1% de glicerol e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, EUA). Os lócus foram amplificados em ciclos específicos de PCR, descritos na tabela 4.

Tabela 4: Ciclo de PCR para cada lócus de microssatélite amplificado em *Tetragonisca angustula*.

Lócus	Ciclo de PCR
Tang12 Tang70	Desnaturação a 94°C/3 min.; 35 ciclos de: desnaturação a 94°C/30 seg., hibridação a 53°C/1 min. e extensão a 72°C/1 min.; extensão extra a 72°C/ 10 min.
Tang03 Tang57	Desnaturação a 94°C/3 min.; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30 seg., hibridação a 59°C/30 seg. e extensão a 72°C/30 seg.; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30 seg., hibridação a 58,5°C/30 seg. e extensão a 72°C/30 seg.; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30 seg., hibridação a 57°C/30 seg. e extensão a 72°C/30 seg.; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30 seg., hibridação a 56,5°C/30 seg. e extensão a 72°C/30 seg.; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30 seg., hibridação a 56°C/30 seg. e extensão a 72°C/30 seg.; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30 seg., hibridação a 55,5°C/30 seg. e extensão a 72°C/30 seg.; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30 seg., hibridação a 55°C/30 seg. e extensão a 72°C/30 seg.; e extensão extra a 72°C/ 5 min.

Tang11

Tang17

Tang60 Desnaturação a 94°C/3 min.; 35 ciclos de: desnaturação a 94°C/30 seg., hibridação a 60°C/1 min. e extensão a 72°C/1 min.; extensão extra a 72°C/10 min.

Tang65

Tang68

Após a amplificação o produto de PCR foi diluído em água ultra pura e adicionado a uma solução com Formamida HI-DI™ (Applied Biosystems, EUA) e o marcador de peso molecular GeneScan™ 500 ROX™ (Applied Biosystems, EUA), de acordo com o recomendado pelo Serviço de Sequenciamento do Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) do IB-USP. Essa mistura foi submetida a eletroforese no sequenciador automático ABI-3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, EUA) do Serviço de Sequenciamento do CEGH. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada através do programa GENEMARKER V1.85 (Softgenetics, EUA). Através do mesmo programa foi realizada uma genotipagem automática com posterior checagem visual. Para identificar os erros tipográficos, a taxa de erros de genotipagem e a presença de alelos nulos foi utilizado o programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

3.3.2 Análise dos dados

Para os cálculos da taxa de heterozigose esperada (H_e) e observada (H_o), frequência alélica, número médio de alelos por locus (N_a), número efetivo de alelos (N_e) e

porcentagem de locos polimórficos a 95% e 99% foi utilizado o programa GENALEX 6.41 (Peakall e Smouse, 2006). Devido à diferença no número amostral foi realizada a rarefação do número médio de alelos por locus através do programa HP-RARE (Kalinowski, 2005). Para verificar se o número médio de alelos rarefeito (Nar) por locus e o número efetivo de alelos (Ne) diferia significativamente entre os grupos amostrais, foi realizado o teste U de Mann-Whitney (Mann e Whitney, 1947) através do programa GENALEX 6.41 (Peakall e Smouse, 2006). Neste trabalho utilizamos como medidas de diversidade genética o Nar e o Ne . Jost (2006), (2007) e (2008) discute o uso de medidas de diversidade que ele chama de tradicionais como a taxa de heterozigose (H). O autor compara, num modelo teórico, a adequabilidade do uso do H em relação ao que ele chama de "verdadeira medida de diversidade", no caso o Ne , para estabelecer estratégias de conservação. Em sua interpretação o Ne nos diz a "real" diversidade contida em cada população e quanto cada subpopulação contribui para a diversidade total. Neste sentido o Ne é uma medida de diversidade linear, fornecendo o que seria uma "quantidade de diversidade real", o que não ocorre com H . Segundo o autor, H não possui uma interpretação linear e quantitativa como buscamos em estudos de variabilidade genética (para mais detalhes acessar o site: <http://www.loujost.com/Statistics and Physics/Diversity and Similarity/PopGen.htm>). Outra vantagem do Ne é que o peso estatístico dado a cada subpopulação é igual, assim ele não depende do tamanho amostral.

O teste exato do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado de duas formas: para cada locus por população e global. O teste global é feito por combinação dos valores P de todos os testes individuais através do método de Fisher, gerando um resultado por população. Para esses testes foi utilizado 10.000 desmemorizações, 10.000 lotes e 100.000 iterações por lote. Um segundo teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado com hipótese alternativa de Deficiência de Heterozigotos. Esse teste é feito através do *score U test* de

Rousset e Raymond (1995) e não por combinação de valores P . Para o teste global, com a mesma hipótese alternativa de Deficiência de Heterozigotos, foi realizado o *Multisample score U test* (Rousset e Raymond, 1995), gerando um valor P por população. Para esses testes foram utilizados 10.000 desmemorizações, 10.000 lotes e 100.000 iterações por lote. Todos os testes de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram feitos através do programa GENEPOP 4.1.4 (Rousset, 2008). O nível de significância estabelecido para todos os testes foi de 5%.

Os valores P obtidos pelo Método da Cadeia de Markov nos testes exatos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram ajustados com base no teste *Sequential Goodness of Fit (SGoF)* (Carvajal-Rodríguez *et al.*, 2009) pelo programa SGoF+ v7.2 (Carvajal-Rodríguez e Uña-Alvarez, 2011). Ele apresenta vantagens em relação a outros métodos de correção, pois aumenta o seu poder estatístico com o aumento do número de testes realizados (Carvajal-Rodríguez *et al.*, 2009).

Para se obter a estimativa de diferenciação populacional foi calculada a diferenciação genética de Jost (D_{est}) (Jost, 2008) para todos os pares de populações com 1.000 réplicas de *Bootstrap*. O D_{est} foi obtido através do programa SMOGD v1.2.5 (Crawford, 2010). Para a melhor visualização dos resultados foi realizada uma Análise de Coordenadas Principais (PCA) através do programa GENALEX 6.41 (Peakall e Smouse, 2006), com o algoritmo descrito por Orloci (1978).

A estruturação populacional também foi inferida pelo modelo de agrupamento probabilístico de indivíduos, sem levar em consideração a origem populacional dos mesmos. Esta análise foi realizada pelo programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000), admitindo-se o modelo de frequências alélicas correlacionadas (Falush *et al.*, 2003) e o modelo de ancestralidade miscigenada. O programa foi configurado para 1.000.000 de iterações depois de uma simulação inicial de 100.000 iterações. A estimativa do número de populações estruturadas (K), foi realizada com 10 repetições para $K = 1$ a 11. O melhor K foi estimado de

acordo com método descrito por Evanno *et al.* (2005) através do programa STRUCTURE HARVESTER 0.6.92 (Earl e VonHoldt, 2012). O programa CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson e Rosenberg, 2007) foi utilizado para alinhar as 10 repetições geradas pelo STRUCTURE. O programa DISTRUCT 1.1 (Rosenberg, 2004) foi utilizado para exibir graficamente os resultados produzidos pelo CLUMPP.

O coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) por população segundo Weir e Cockerham (1984) foi obtido através do programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010) com 10.100 permutações.

3.4 DNA MITOCONDRIAL

3.4.1 Sequenciamento

Para a amplificação das duas regiões do genoma mitocondrial (*COI*, *CytB*) foram utilizados dois pares de *primers* derivados do genoma mitocondrial de insetos (UBC *Insect Mitochondrial DNA Primers Kit*) (Simon *et al.*, 1994) (Tabela 5). A mesma extração de DNA utilizada para os microssatélites foi utilizada para a amplificação dos genes do DNAm.

As reações de PCR foram realizadas com tampão de PCR 1x, 3 mM $MgCl_2$, 4 μM de cada *primer*, 200 μM de dNTPs, 1 M de Betaína (USB, EUA) e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, EUA). À solução foram adicionados 2 μl de DNA molde e o volume final completado para 20 μl com água bidestilada e autoclavada. Cada reação de PCR, inicialmente, foi submetida a uma desnaturação a 94°C/5 min., seguida de 35 ciclos de

[desnaturação a 94°C/1 min., hibridação a 42°C/80 seg. e extensão a 64°C/2 min.]. No final foi realizada uma extensão extra a 64°C/ 10 min.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 0,8% e corados com GelRedTM (Biotium, Inc., EUA). Posteriormente foi realizada uma purificação enzimática com ExoSAP-IT® (USB) de acordo com as recomendações do fabricante. Os fragmentos purificados foram enviados para o serviço de sequenciamento da Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul). Apenas a fita *forward* de cada região foi sequenciada.

As sequências foram visualizadas, editadas e alinhadas (com número máximo de oito repetições), através do algoritmo *Muscle* (Edgar, 2004) dentro do programa GENEIOUS 5.4 (Drummond *et al.*, 2011). Para verificar se havia códons de parada, as sequências geradas foram traduzidas. Posteriormente as duas sequências mitocondriais foram concatenadas. Tanto a tradução quanto a concatenação das sequências foram realizadas através do GENEIOUS 5.4 (Drummond *et al.*, 2011).

Tabela 5. Pares de *primers* para amplificação de regiões do genoma mitocondrial de *T. angustula*.

Pares de <i>primers</i>	Sequência do <i>primer</i>	Genes
MtD6 (<i>F</i>)	5'GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC3'	<i>COI</i>
+		
MtD9 (<i>R</i>)	5'CCCGGTAAAATTTAAAATATAAACTTC3'	
MtD26 (<i>F</i>)	5' TATGTACTACCATGAGGACAAATATC 3'	<i>CytB</i>
+		
MtD28 (<i>R</i>)	5' ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT 3'	

F: Forward; *R*: Reverse

3.4.2 Análise dos dados

O número de haplótipos e sítios polimórficos e a diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica (π), de acordo com Nei (1987), para todos os grupos amostrais foram obtidos através do programa DNASP v.5.10 (Librado e Rozas, 2009). A frequência dos haplótipos foi obtida pelo programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). Neste trabalho utilizamos como medidas de diversidade genética os índices Hd e π . Para verificar se o tamanho amostral influenciava Hd e π foi realizado um teste estatístico de correlação através da análise de regressão linear no Microsoft® Excel 2010. A correlação só foi considerada quando significativa ($P < 0,05$).

A rede de inter-relações haplotípicas foi construída com o algoritmo *Median Joining* (Bandelt *et al.*, 1999) a partir dos dados gerados pelo DNASP, através do programa NETWORK v4.6.10 (www.fluxus-engineering.com). Para a análise da estrutura populacional foram realizados: o teste de diferenciação genética de Jost (D_{est}) (Jost, 2008) a partir da frequência dos haplótipos, e a Análise de Variância Molecular (AMOVA). O primeiro teste foi realizado através do programa SMOGD v1.2.5 (Crawford, 2010) e o segundo através do ARLEQUIN 3.5. Para a melhor visualização dos resultados foi realizada uma Análise de Coordenadas Principais (PCA) através do programa GENALEX 6.41 (Peakall e Smouse, 2006), com o algoritmo descrito por Orloci (1978). A análise de regressão linear também foi usada para verificar a correlação entre distância geográfica e D_{est} .

4. RESULTADOS

Os dados brutos das análises dos locos de microssatélites e do DNAm_t estão apresentados na seção Apêndice, em Apêndice A e B, respectivamente.

4.1 MICROSSATÉLITES

4.1.1 Variabilidade genética

Todos os nove locos de microssatélites amplificados foram polimórficos em ambos os critérios, 95 e 99%. Devido ao fato desses locos terem sido analisados em amostras naturais e nenhum desequilíbrio de ligação ter sido detectado (Francisco, 2012), não realizamos este teste em nossas amostras de meliponários. A matriz de genótipos, a frequência alélica para cada loco por meliponário e amostras naturais, e o número de alelos (N_a), a heterozigose esperada e observada estão sumarizadas nos apêndices A-1, A-2 e A-3, respectivamente. Os resultados do número de alelos rarefeito (N_r) por loco, e do número efetivo de alelos (N_e) por loco são apresentados nos apêndices A-4 e A-5, respectivamente. O teste U de Mann-Witney mostrou que em relação ao N_r , os meliponários não são estatisticamente diferentes entre si e nem às amostras naturais ($P > 0,05$) (Apêndice A-6). De acordo com a figura 8 não houve nenhuma correlação significativa ($R^2 = 0,0292$ $P = 0,616$) entre N_e e tamanho amostral. As comparações entre os valores de N_e para todos os meliponários e amostras naturais realizadas no teste U de Mann-Witney mostraram os mesmos resultados obtidos para N_r (Apêndice A-7).

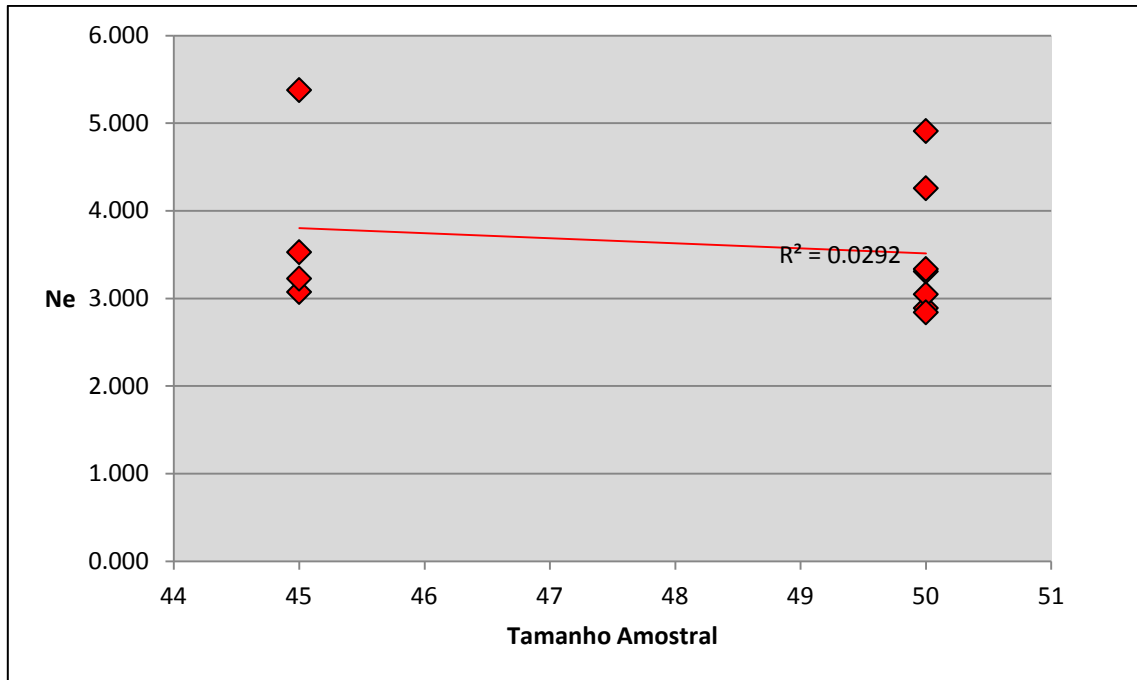


Figura 8: Relação entre tamanho amostral e número médio de alelos efetivos (\blacklozenge Ne). Correlação não significativa ($P > 0,05$).

A tabela 6 apresenta o Nar médio rarefeito e o Ne médio por população, assim como a heterozigose observada (Ho) e esperada (He) segundo o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As relações de Nar e Ne médio entre todos os meliponários e amostras naturais podem ser melhor visualizadas na figura 9. Os valores de Ho e He encontrados nos meliponários de São Paulo não apresentaram diferenças em relação a SSB, assim como os meliponários do Paraná em relação a PNI. Os valores de F_{IS} com seus respectivos valores P por população são apresentados na tabela 6. Foi realizado um teste de significância estatística para verificar se os valores de F_{IS} observados não são diferentes de zero. Os resultados mostraram que AMP, CUR, MCR1 e SSB apresentaram $P > 0,05$, ou seja, seus valores de F_{IS} não são diferentes de zero. O valor de F_{IS} para PNI foi maior do que para SSB, acima de 0,1. Logo, dentre os meliponários que apresentaram F_{IS} diferente de zero, somente PED e SHE2 apresentaram valores baixos em comparação com PNI. Os valores de F_{IS} observados em

MCR2, ERO, SMI e SHE1 foram similares aos de PNI, portanto também foram considerados altos.

Tabela 6: Número médio de alelos rarefeito (*Nar*), Número médio de alelos efetivos (*Ne*), Heterozigose observada (*Ho*) e esperada (*He*) segundo o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e F_{IS} com o valor *P* (entre parêntesis) por meliponário e amostras naturais.

AMOSTRAS	<i>Nar</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	F_{IS}
PED	9,51 (±1,52)	4,910 (±1,209)	0,660 (±0,078)	0,685 (±0,071)	0,0463 (0,0415)
SHE1	8,00 (±1,79)	3,527 (±1,024)	0,496 (±0,075)	0,607 (±0,058)	0,1937 (0,0000)
SHE2	7,42 (±1,78)	2,889 (±0,622)	0,542 (±0,060)	0,571 (±0,053)	0,0604 (0,0280)
MCR1	7,56 (±1,60)	3,073 (±0,913)	0,546 (±0,076)	0,555 (±0,059)	0,0273 (0,2180)
MCR2	7,58 (±1,43)	3,046 (±0,879)	0,489 (±0,071)	0,542 (±0,065)	0,1073 (0,0005)
ERO	6,91 (±1,58)	2,841 (±0,883)	0,440 (±0,054)	0,496 (±0,075)	0,1237 (0,0001)
SMI	7,73 (±1,93)	3,308 (±1,147)	0,473 (±0,058)	0,547 (±0,065)	0,1452 (0,0000)
CUR	8,33 (±1,62)	3,226 (±0,917)	0,521 (±0,081)	0,544 (±0,077)	0,0530 (0,0540)
AMP	8,89 (±1,53)	5,377 (±1,052)	0,719 (±0,058)	0,719 (±0,067)	0,0126 (0,3322)
SSB	8,52 (±1,76)	4,257 (±0,883)	0,673 (±0,053)	0,680 (±0,055)	0,0197 (0,2567)
PNI	9,13 (±1,74)	3,335 (±1,004)	0,496 (±0,052)	0,582 (±0,058)	0,1588 (0,0000)

Erros-padrão de *Nar*, *Ne*, *Ho* e *He* entre parêntesis. **PED:** Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

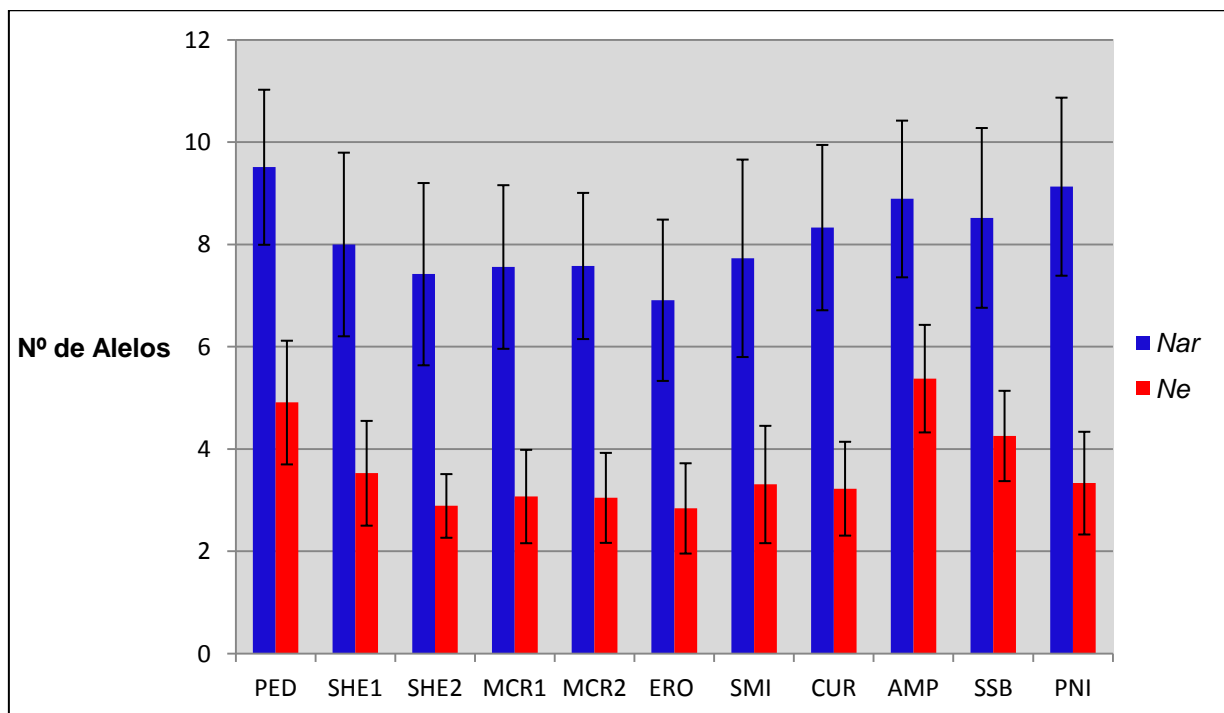


Figura 9: Número médio de alelos rarefeito (*Nar*) e Número médio de alelos efetivos (*Ne*) por meliponário e amostras naturais. Linhas verticais pretas representam o erro-padrão. **PED:** Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

Para verificar se havia desvios do EHW nas amostras de meliponários e amostras naturais, foi realizado o teste exato de Fisher com $\alpha=0,05$ (Apêndice A-8). Mesmo após a correção por *SGoF* os seguintes loci, nos seguintes meliponários e amostras naturais apresentaram desvios do EHW: Tang03 e Tang65 (CUR); Tang12 e Tang65 (ERO); Tang57 (MCR1); Tang03 e Tang60 (MCR2); Tang68 (PED); Tang12, Tang57 e Tang68 (SHE1); Tang03 (SHE2); Tang60 e Tang65 (SMI); Tang03, Tang57 e Tang65 (PNI) (Apêndice A-8). A análise por combinação de valores *P* mostrou que, com exceção de AMP, MCR1, PED e SSB, todos os outros meliponários, assim como PNI, apresentaram desvios do EHW considerando-se todos os loci (Apêndice A-8).

A fim de verificar se os desvios do EHW poderiam ter sido causados por endocruzamento, cujo um dos efeitos é a deficiência de heterozigotos, foi realizado o *score U test* do EHW com hipótese alternativa de deficiência de heterozigotos. Os resultados são apresentados no apêndice A-9. Foi verificada deficiência de heterozigotos em toda a amostragem para vários loci. O *Multisample score U test*, que fornece um valor *P* por população, mostrou que, com exceção de AMP, MCR1 e SSB, todos os meliponários, assim como PNI, apresentaram deficiência de heterozigotos. O programa MICRO-CHECKER 2.2.3 detectou a presença de alelos nulos nos seguintes loci e grupos amostrais (entre parentesis): Tang57, Tang03 (SHE1 e 2, CUR e MCR1, PNI); Tang11 (AMP); Tang12 (SHE1); Tang17 (SMI); Tang57 (SHE1, MCR1 e 2, e PNI); Tang60 (MCR2 e SMI); Tang65 (ERO, SMI, CUR e PNI) e Tang68 (SHE1).

4.1.2 Estruturação populacional

O valor global da diferenciação genética de Jost (D_{est}) foi de 0,383 (IC 95%: 0,374-0,433) mostrando uma estruturação genética de moderada a alta. A tabela 7 mostra os resultados do D_{est} nas comparações feitas par a par. Esse teste nos fornece valores em escala quantitativa, indo de 0 a 1, em que 0 é não diferenciado e 1 é totalmente diferenciado. Como pode ser visto na tabela 7, os meliponários localizados no Paraná apresentaram valores baixos quando comparados entre si (todos abaixo de 0,1). O mesmo resultado foi obtido para os meliponários de São Paulo quando comparados entre si. Contudo, os valores foram altos quando as comparações entre os meliponários do Paraná e os de São Paulo foram realizadas (todos acima de 0,5). Quanto a SSB os valores foram altos em relação às amostras do Paraná e baixos em relação às de São Paulo. O contrário foi visto nos resultados do PNI, sendo baixos em relação às amostras do Paraná e altos relação às de São Paulo. Esses resultados podem ser visualizados nas análises de PCA (figura 10), onde há a separação dos grupos amostrais segundo o que se espera dada a distribuição geográfica das amostras (ver Figura 7). No canto inferior esquerdo do gráfico vemos o aglomerado dos meliponários do Paraná e muito próximo está PNI. Na parte superior direita está SSB e juntos no canto inferior direito está PED e AMP, que são meliponários próximos entre si no estado de São Paulo.

Tabela 7: Estimativa de diferenciação genética de Jost (D_{est}) para todos os pares de meliponários e amostras naturais.

AMOSTRAS	PED	SHE1	SHE2	MCR1	MCR2	ERO	SMI	CUR	AMP	SSB
PED										
SHE1	0,753115									
SHE2	0,835028	0,053338								
MCR1	0,789228	0,003767	0,046584							
MCR2	0,799765	0,035883	0,011458	0,042986						
ERO	0,841932	0,04281	0,012723	0,052444	0,009363					
SMI	0,817985	0,040214	0,005854	0,046689	0,008779	0,008733				
CUR	0,769678	0,055567	0,028338	0,069226	0,013057	0,02844	0,018293			
AMP	0,023708	0,707463	0,732997	0,728911	0,668882	0,765646	0,702234	0,669067		
SSB	0,386304	0,536345	0,505305	0,536968	0,53574	0,518245	0,499088	0,538117	0,331053	
PNI	0,660503	0,159404	0,176422	0,17309	0,192179	0,171025	0,14194	0,219722	0,618568	0,496524

PED: Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MCR1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

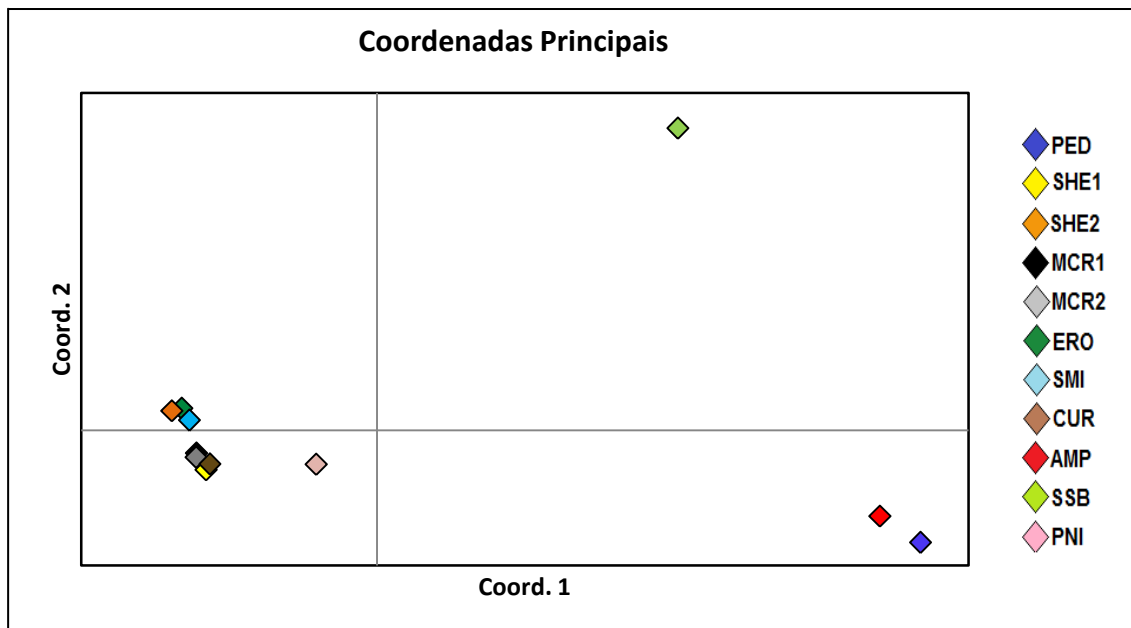


Figura 10: Análise de Coordenadas Principais (PCA) realizada a partir dos resultados da estimativa de D_{est} para todos os meliponários e amostras naturais. **PED:** Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

A fim de verificar se a distância geográfica influenciava os valores de diferenciação populacional realizamos uma análise de regressão linear em toda a amostragem (Figura 11) e em dois grupos (Figura 12), sendo o grupo A formado pelas amostras de São Paulo, e o grupo B formado pelas amostras do Paraná. Os resultados mostraram correlação significativa na primeira análise ($R^2=0,6541$ $P<0,000001$). Em relação aos grupos, somente o grupo A apresentou correlação ($R^2=0,9628$), o que não foi encontrada no grupo B ($R^2=0,0003$ $P=0,926$). Dado o alto valor de R^2 encontrado para o grupo A não foi realizado um teste de significância estatística para R^2 nesse grupo.

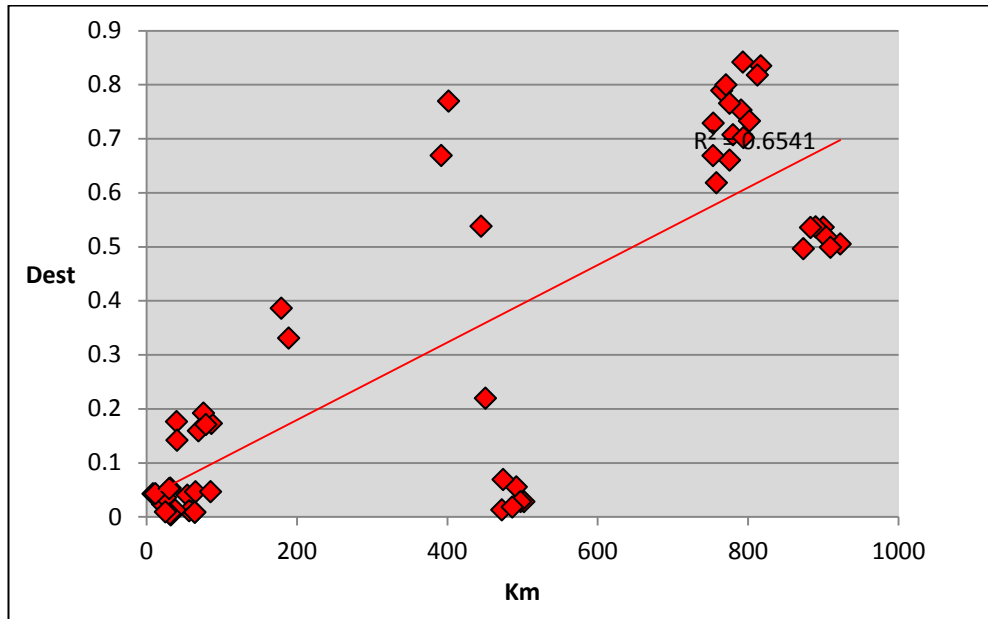


Figura 11: Relação entre distância geográfica (Km) e diferenciação populacional. Análise com todas as amostras. ($\blacklozenge D_{est}$). Correlação significativa ($P < 0,05$).

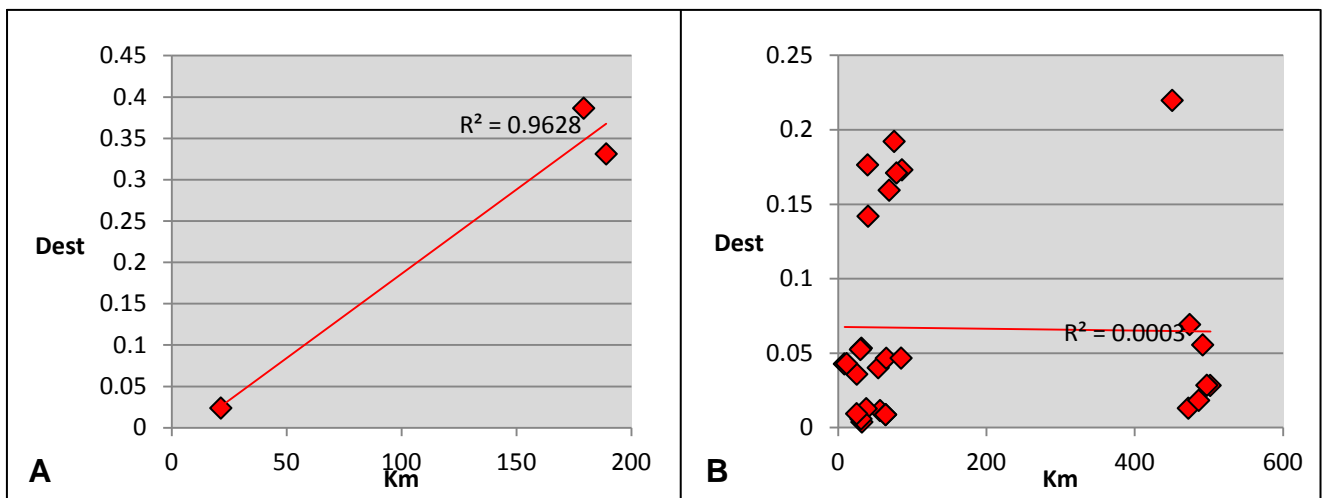


Figura 12: Relação entre distância geográfica (Km) e diferenciação populacional ($\blacklozenge D_{est}$). **A:** amostras de São Paulo. **B:** amostras do Paraná.

Os resultados do STRUCTURE mostraram que a maior estruturação encontrada dividiu os grupos amostrais em dois grupos (Figura 13). O primeiro foi formado por: AMP, PED e SSB (São Paulo). O segundo foi formado por :SHE1, SHE2, MCR1, MCR2, ERO, CUR, SMI e PNI (Paraná).

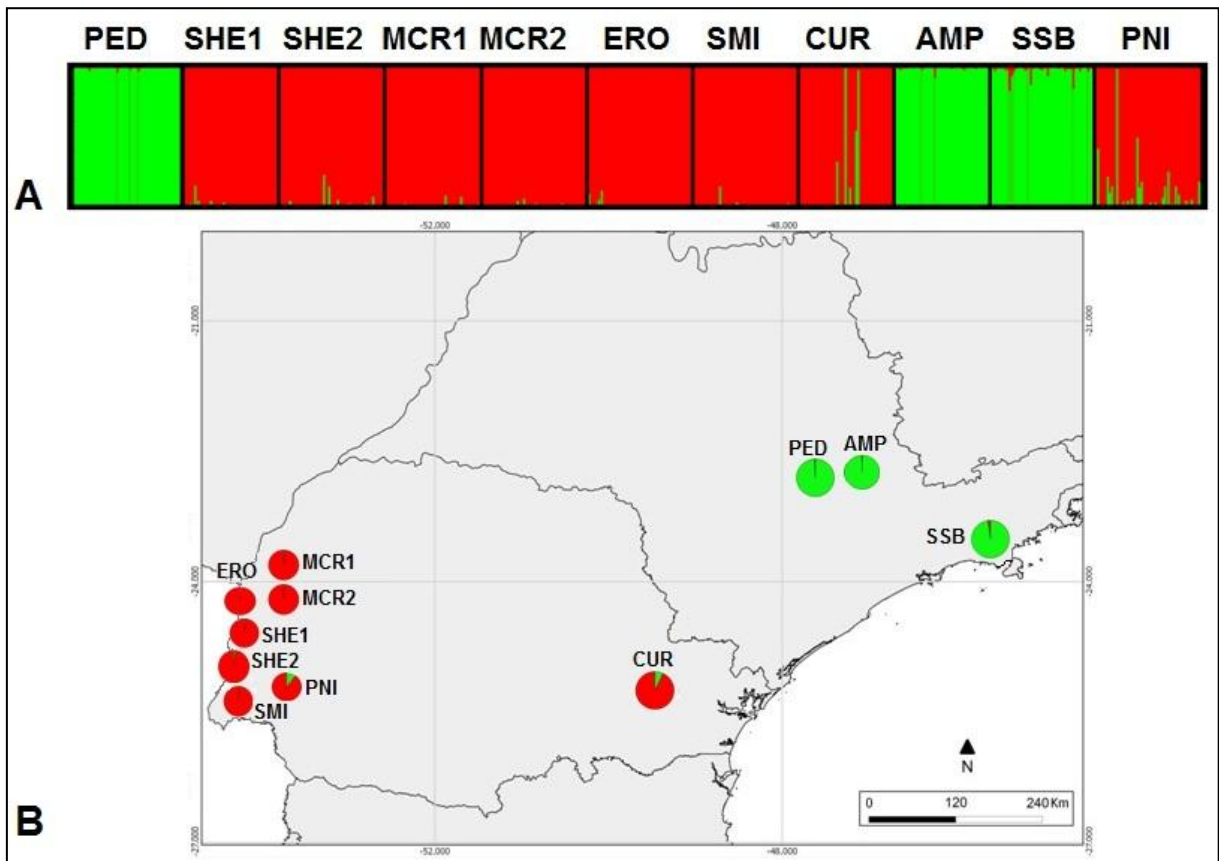


Figura 13: (A) Probabilidade de atribuição posterior (eixo vertical) de genótipos individuais (eixo horizontal) para cada um dos dois grupos (verde e vermelho) definidos pelo STRUCTURE. **(B)** Detalhe do mapa da região Sul-Sudeste do Brasil apresentando a proporção dos dois grupos representados em cada meliponário e amostras naturais de *Tetragonisca angustula*. O tamanho das circunferências é proporcional ao tamanho amostral. **PED:** Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MCR1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

O mesmo padrão também pode ser visto nos resultados da análise de *Population Assignment* (Figura 14). A figura mostra a formação de três aglomerados. Em um extremo (canto superior esquerdo) visualizamos uma concentração de pontos formada pelos

meliponários do Paraná e PNI. No outro (canto inferior direito) um pequeno aglomerado dos meliponários de São Paulo e no meio as amostras naturais de São Sebastião.

A tabela 8 mostra os resultados obtidos na Análise de Variância Molecular (AMOVA). Os resultados mostram que a maior parte da variação genética é explicada por diferenças encontradas dentro das populações, ou seja, dentro dos meliponários e amostras naturais. Isso é congruente com os resultados mostrados acima visto que não houve grande diferença entre os grupos amostrais em relação a variação genética.

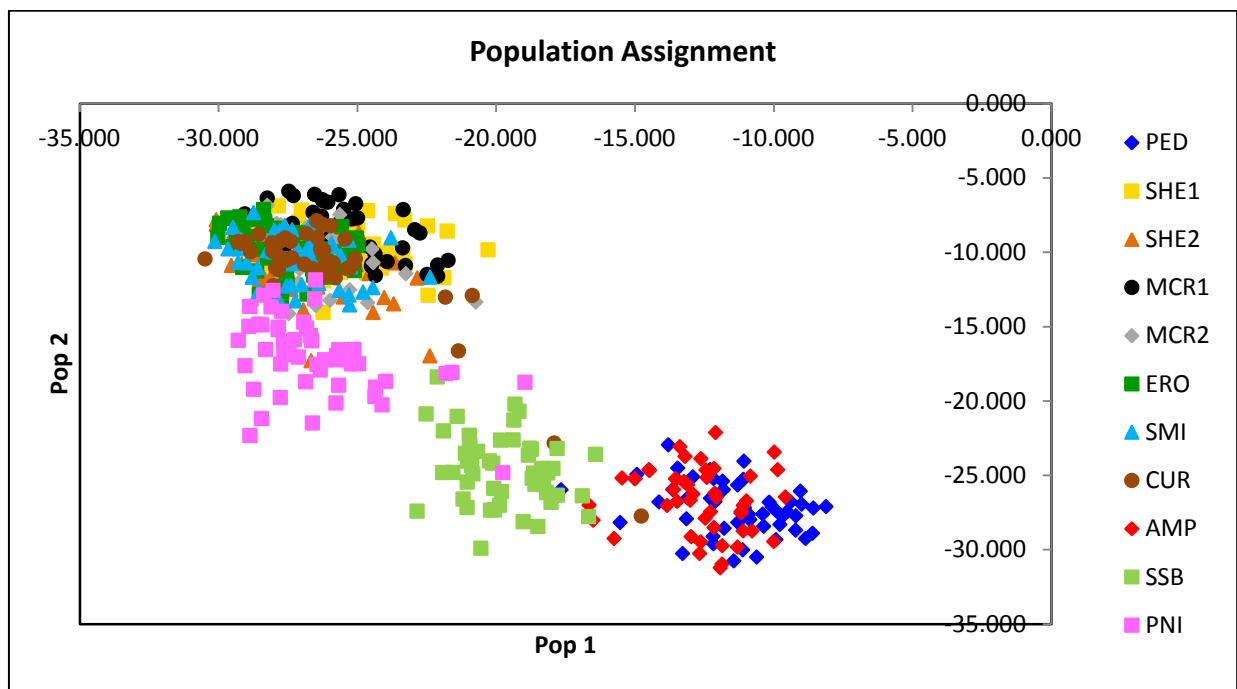


Figura 14: Distribuição genotípica resultante da análise de *Population Assignment* em *T. angustula* de meliponários e amostras naturais. **PED:** Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

Tabela 8: Análise de Variância Molecular (AMOVA) em *T. angustula* de meliponários e amostras naturais.

Fonte da Variação	Componentes da Variância	% de variação
Interpopulacional	0,76899	22,19
Intrapopulacional	2,69655	77,81

4.2 DNA MITOCONDRIAL

4.2.1 Variabilidade genética

As sequências dos dois genes mitocondriais obtidas (*COI* e *CytB*) para todos os indivíduos amostrados foram concatenadas gerando fragmentos de 764pb. A partir do alinhamento destes fragmentos, o programa DNASP identificou 52 haplótipos distintos (Apêndice B-1). Antes de serem concatenadas, as sequências da porção de cada gene foram traduzidas e nenhum códon de parada foi detectado. O apêndice B-1 mostra os sítios variáveis que compõem cada um dos haplótipos encontrados.

A relação entre número de haplótipos (H) e número de haplótipos exclusivos (HE) está apresentada na figura 15. Nessa figura podemos destacar o alto valor de H e HE para as amostras naturais em relação a todos os meliponários, sendo a maioria exclusivos. Os meliponários, em sua maioria, apresentaram poucos haplótipos, com destaque para MCR2 que apresentou apenas 1 haplótipo em seus 50 indivíduos amostrados. A distribuição dos 52 haplótipos por grupo amostral e suas frequências são dadas nos apêndices B-2 e B-3, respectivamente. O haplótipo H6 foi o mais frequente, sendo encontrado em 7 dos 9 meliponários e em PNI. Somente os haplótipos H2, H6 e H13 não foram exclusivos (Apêndice B-4). Além disso, muitos haplótipos foram encontrados em apenas 1 indivíduo.

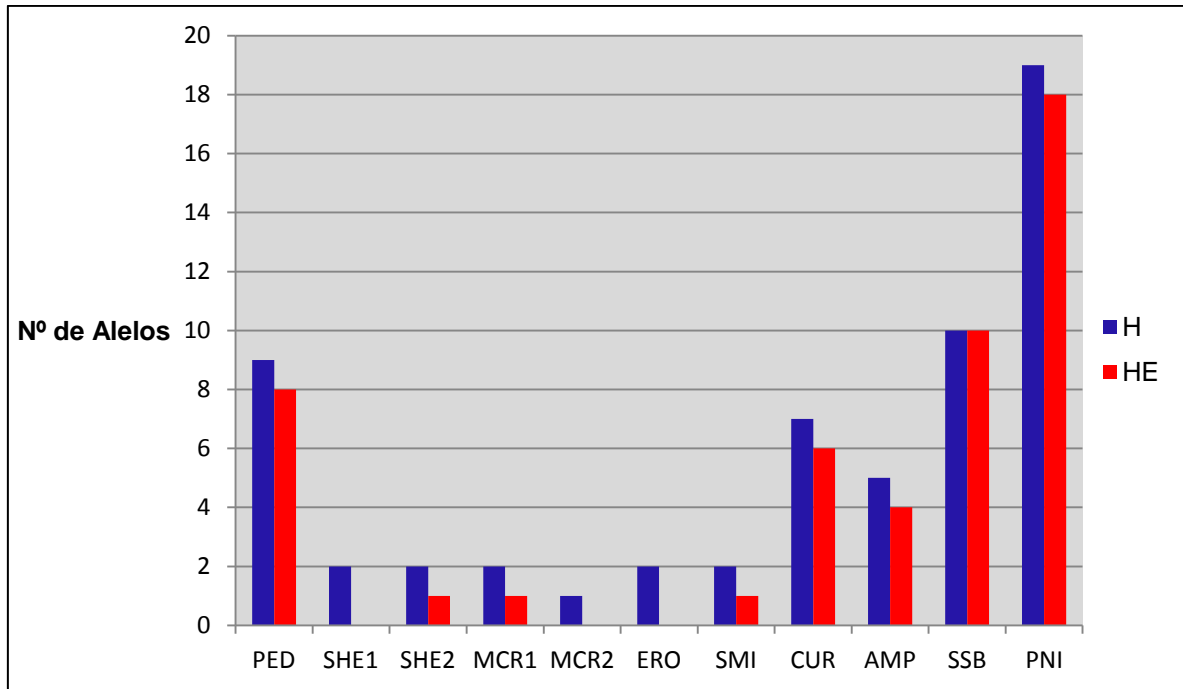


Figura 15: Número de haplótipos (H) e haplótipos exclusivos (HE) por meliponário e amostras naturais. **PED:** Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

O número de haplótipos (H), a diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica (π), assim como o número de sítios polimórficos (S) por meliponário e amostras naturais são apresentados na tabela 9. No total foram verificados 60 sítios polimórficos (Apêndice B-1) dentre as 52 sequências.

Em comparação com as amostras naturais, todos os meliponários apresentaram um baixo H, exceto PED e CUR que apresentaram nove e sete haplótipos, respectivamente. A relação entre Hd e π por meliponário e amostras naturais são melhor visualizadas na figura 16. PED e CUR, assim como AMP, apresentaram valores de Hd relativamente altos em relação aos outros meliponários. Contudo esses valores foram baixos se comparados às amostras naturais, que mostraram valores acima de 0,7. Os resultados de π foram semelhantes. PED, CUR e AMP apresentaram valores altos em relação aos outros meliponários. O interessante é que os valores de π em PED, CUR e AMP foram maiores do que os obtidos em SSB. O

destaque fica por conta de PNI que apresentou o valor mais alto de $\pi=0,0808$. Nenhuma correlação significativa foi observada entre Hd ($R^2=0,0111$ $P=0,758$) e π ($R^2=0,0066$ $P=0,813$) e o tamanho amostral (Figura 17). Assim podemos comparar essas duas medidas de diversidade mesmo com tamanhos amostrais diferentes nos meliponários e amostras naturais.

Tabela 9: Número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica (π) e seus erros-padrão (entre parêntesis) e número de sítios polimórficos (S) por meliponário e amostras naturais e total.

Grupos amostrais	H	Hd	π	S
PED	9	0,640 ($\pm 0,070$)	0,00193 ($\pm 0,00056$)	18
SHE1	2	0,420 ($\pm 0,059$)	0,00055 ($\pm 0,00008$)	1
SHE2	2	0,115 ($\pm 0,059$)	0,00015 ($\pm 0,00008$)	1
MCR1	2	0,087 ($\pm 0,056$)	0,00011 ($\pm 0,00007$)	1
MCR2	1	0	0	0
ERO	2	0,040 ($\pm 0,038$)	0,00005 ($\pm 0,00005$)	1
SMI	2	0,040 ($\pm 0,038$)	0,00005 ($\pm 0,00005$)	1
CUR	7	0,570 ($\pm 0,082$)	0,00341 ($\pm 0,00166$)	27
AMP	5	0,587 ($\pm 0,058$)	0,00438 ($\pm 0,00052$)	10
SSB	10	0,733 ($\pm 0,051$)	0,00166 ($\pm 0,00030$)	12
PNI	19	0,871 ($\pm 0,031$)	0,00808 ($\pm 0,00190$)	33
Total	52	0,641 ($\pm 0,024$)	0,01239 ($\pm 0,00053$)	60

PED: Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

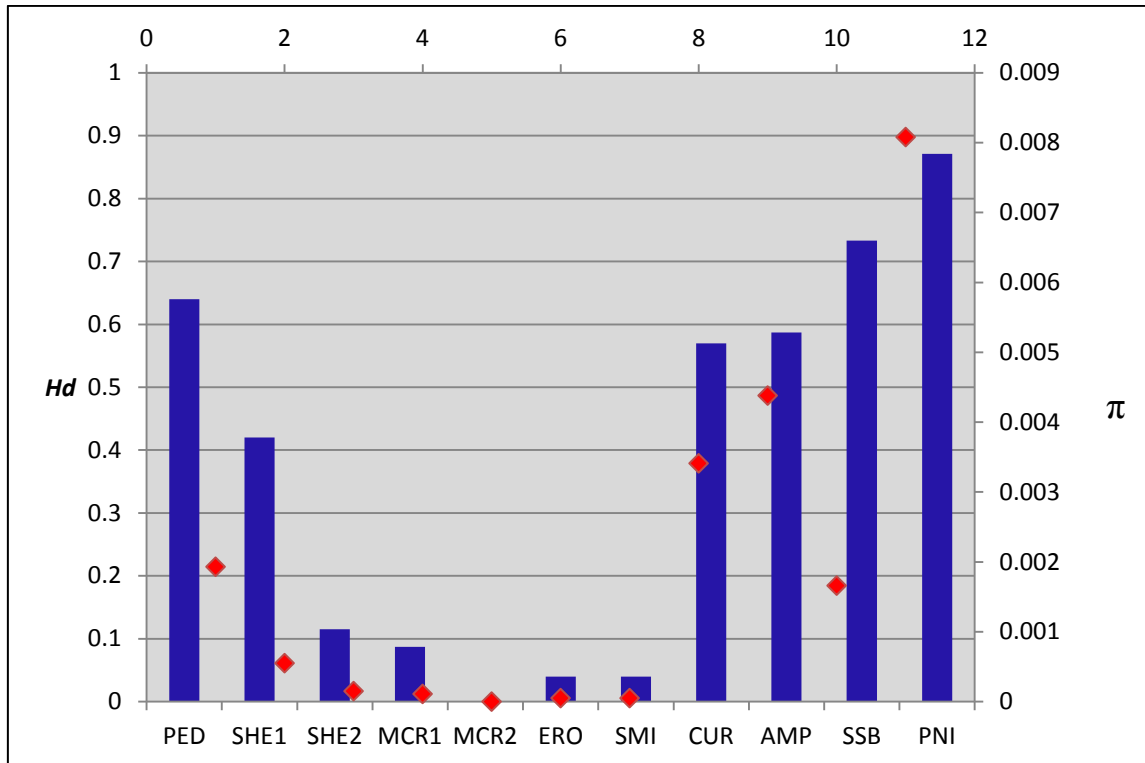


Figura 16: Diversidade haplotípica (H_d) e nucleotídica (π) por meliponário e amostras naturais. **PED:** Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MCR1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

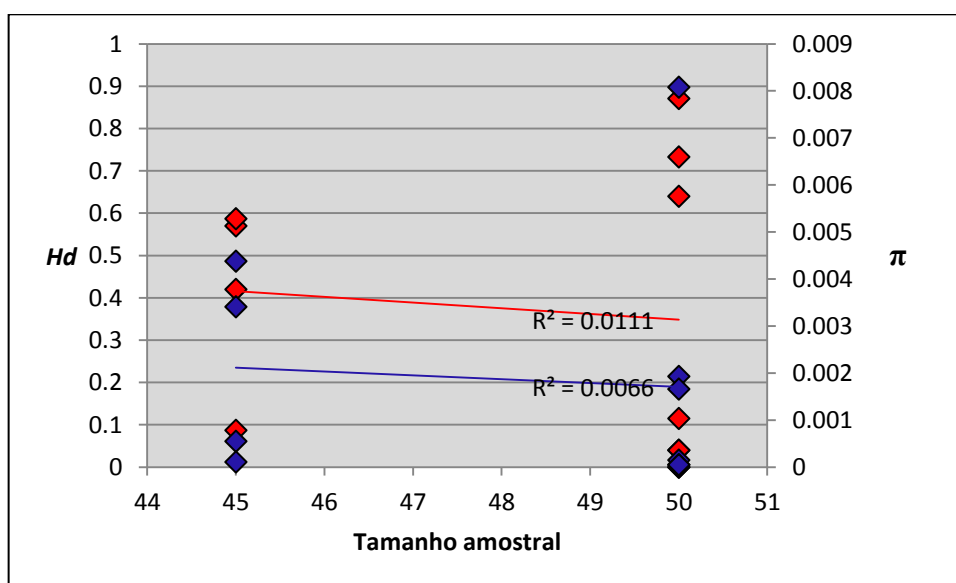


Figura 17: Relação entre tamanho amostral e diversidade haplotípica ($\color{red}\blacklozenge$ H_d) e nucleotídica ($\color{blue}\blacklozenge$ π). Correlação não significativa ($P > 0,05$).

4.2.2 Estruturação populacional

A relação entre os 52 haplótipos obtida pelo método de *median joining* é apresentada na figura 18. Podemos destacar a separação entre as amostras de São Paulo e as do Paraná, assim como a existência de um grande número de haplótipos presente em poucos indivíduos. Dentre todos os haplótipos encontrados, o haplótipo H6 merece destaque, pois é compartilhado por sete meliponários (MCR1, MCR2, SHE1, SHE2, CUR, ERO, SMI) e por PNI, todos do Paraná.

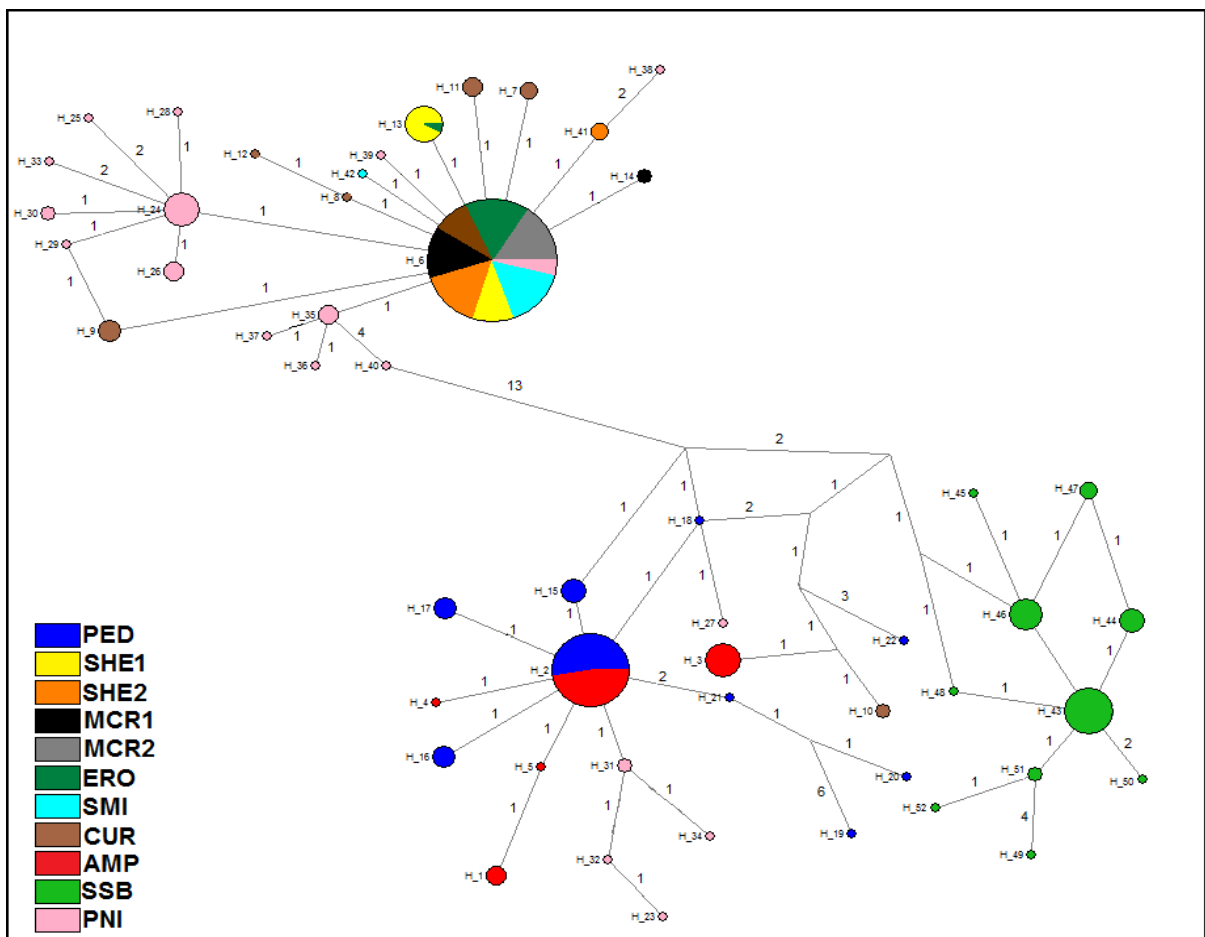


Figura 18: Rede de inter-relações haplóticas entre os 52 haplótipos encontrados em amostras de *T. angustula* de meliponários e amostras naturais. Os números próximos aos ramos indicam o número de passos mutacionais. **PED:** Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MCR1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguçu.

O teste de diferenciação genética de Jost (D_{est}) revelou que em relação ao DNA mitocondrial foi encontrada alta diferenciação populacional, com valor global de 0,473 (IC 95%: 0,455-0,506) (Tabela 10). O resultado apresentado aqui é semelhante ao encontrado para os microssatélites, com a diferença de ter sido observada uma estruturação maior das amostras naturais em relação aos meliponários (Figura 19), além do valor de D_{est} global ter sido maior para o DNAmT em relação aos microssatélites. A análise de regressão linear entre distância geográfica e valores de D_{est} foi realizada com toda a amostragem (Figura 20) e com esta dividida em dois grupos (Figura 21), sendo o grupo A formado pela amostras de São Paulo, e o grupo B formado pelas amostras do Paraná. Os resultados mostraram correlação significativa na primeira análise ($R^2=0,582$ $P<0,000001$). Em relação aos grupos, a análise com o grupo A apresentou correlação ($R^2=0,9973$), porém o grupo B não ($R^2=0,0016$ $P=0,840$). Dado o alto valor de R^2 encontrado para o grupo A não foi realizado um teste de significância estatística para R^2 nesse grupo.

Tabela 10: Estimativa de diferenciação genética de Jost (D_{est}) para todos os pares de meliponários e amostras naturais.

	PED	SHE1	SHE2	MCR1	MCR2	ERO	SMI	CUR	AMP	SSB
PED	0,000									
SHE1	1,000	0,000								
SHE2	1,000	0,091	0,000							
MCR1	1,000	0,093	0,002	0,000						
MCR2	1,000	0,102	0,003	0,002	0,000					
ERO	1,000	0,090	0,002	0,001	0,000	0,000				
SMI	1,000	0,098	0,002	0,001	0,000	0,000	0,000			
CUR	1,000	0,102	0,084	0,088	0,103	0,096	0,096	0,000		
AMP	0,147	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	
SSB	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
PNI	1,000	0,527	0,559	0,564	0,578	0,572	0,572	0,461	1,000	1,000

PED: Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MCR1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

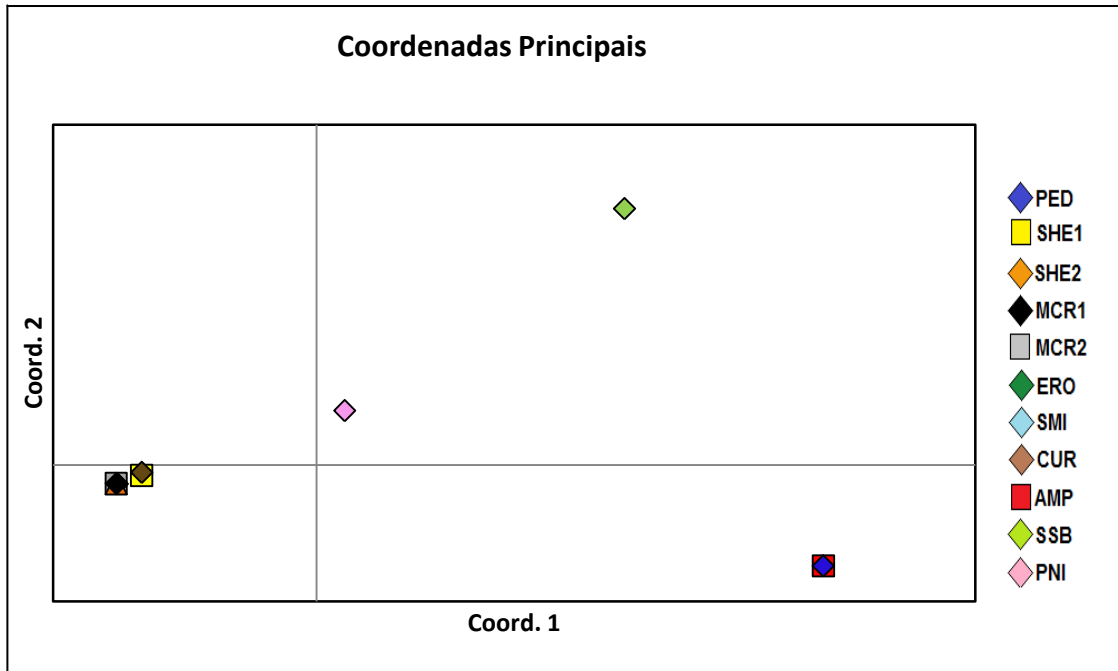


Figura 19: Análise de Coordenadas Principais (PCA) realizada a partir dos resultados da estimativa de D_{est} para todos os meliponários e amostras naturais. O símbolos de ERO e SMI estão localizados atrás de MCR1.. **PED:** Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

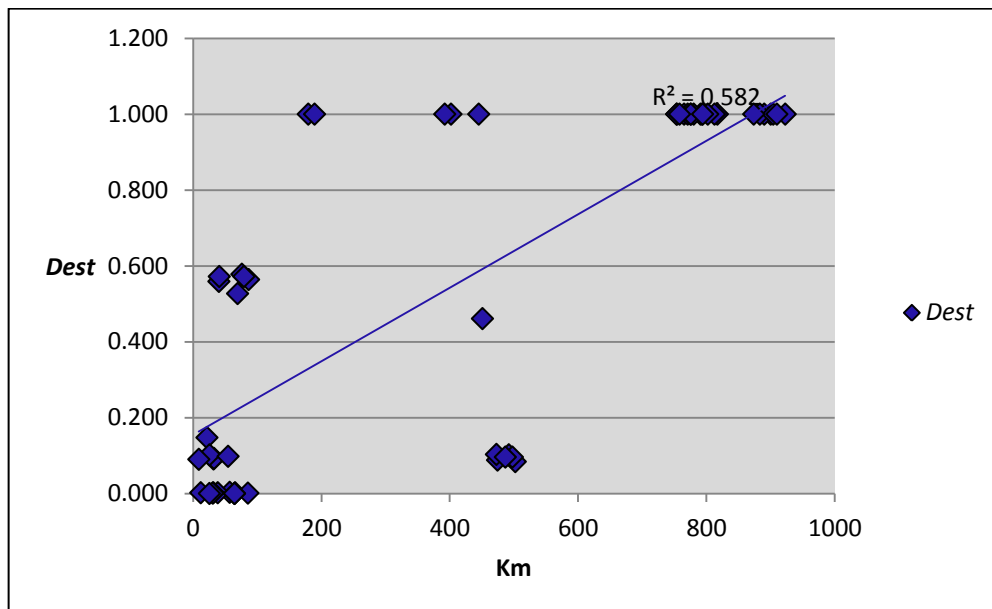


Figura 20: Relação entre distância geográfica (Km) e diferenciação populacional ($\blacklozenge D_{est}$). Correlação significativa ($P < 0,05$).

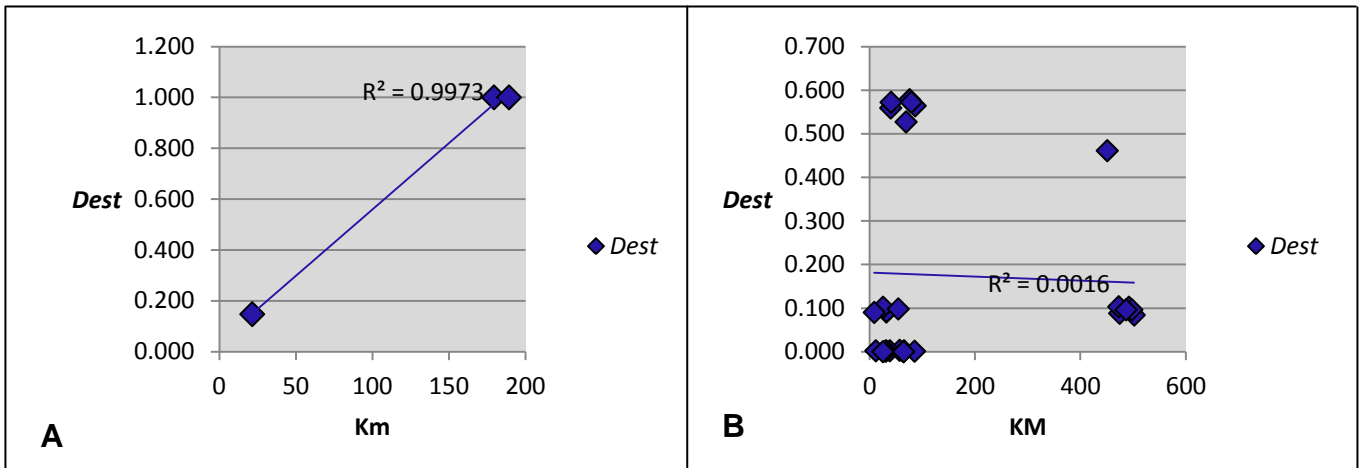


Figura 21: Relação entre distância geográfica (Km) e diferenciação populacional ($\blacklozenge D_{est}$). **A:** amostras de São Paulo. **B:** amostras do Paraná.

A AMOVA mostrou que a maior parte da variação genética é explicada por diferenças encontradas entre as populações (Tabela 11). Para verificar se esses resultados estavam sendo influenciados pelo agrupamento de amostras distantes geograficamente, uma nova AMOVA foi realizada. Dois grupos foram determinados: grupo 1 (AMP, PED e SSB) e grupo 2 (com todo o restante). Os resultados foram os mesmos obtidos na primeira AMOVA, maior variação interpopulacional.

Tabela 11: Análise de Variância Molecular (AMOVA) em *T. angustula* de meliponários e amostras naturais.

Fonte da Variação	Componentes da Variância	% de variação
Interpopulacional	4,43904	86,83
Intrapopulacional	0,67347	13,17

5. DISCUSSÃO

A criação de animais é uma prática comum e data de vários séculos atrás (Clutton-Brock, 1987; Savolainen *et al.*, 2002; Bruford *et al.*, 2003). Desde cachorros, cavalos, búfalos, galinhas, porcos etc, o homem vem interferindo em processos naturais da vida selvagem através da criação e/ou domesticação de animais (Hemmer, 1990; Smith, 1995). A criação de abelhas melíferas data de 7000 a.C. e tem sido usada para a produção de mel e cera (Crane, 1983; Bloch *et al.*, 2010). As abelhas têm destaque também na polinização de plantações com fins comerciais, sendo *Apis mellifera* uma das mais utilizadas (Watanabe, 1994; Allen-Wardell *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 2007; Delaney *et al.*, 2009). Outras espécies também são excelentes polinizadoras, como as abelhas do gênero *Bombus* (Asada e Ono, 1997; Cane, 1997; Aguilar *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2007), algumas abelhas solitárias (Cane, 1997; MacKenzie e Javorek, 1997; Kremen *et al.*, 2004; Hogendoorn *et al.*, 2006) e as abelhas sem ferrão (Heard, 1994; Malagodi-Braga e Kleinert, 2002; Calvete *et al.*, 2003; Antunes *et al.*, 2007).

É esperado que a criação de abelhas em apiários e meliponários leve à diminuição da variabilidade genética. Estudos mostraram que o manejo humano têm levado a redução da diversidade genética de animais domésticos (Bruford *et al.*, 2003). Essa redução ocorre principalmente pela diminuição do tamanho populacional efetivo e da diversidade genética em nível genômico, associados a eventos fundadores (Wright *et al.*, 2005; Zeder *et al.*, 2006). Em galinhas e coelhos domesticados foi encontrada uma diversidade genética 50 a 60% menor em relação às populações selvagens (Muir *et al.*, 2008; Carneiro *et al.*, 2011). Baixa variabilidade genética também foi reportada para populações de *Apis mellifera* de apiários (Sheppard, 1988; Schiff e Sheppard, 1996; Moritz *et al.*, 2007; Delaney *et al.*, 2009; Jaffé *et*

al., 2010; Meixner *et al.*, 2010). A alta taxa de mortalidade de colônias e o declínio populacional de *Apis mellifera* nos Estados Unidos e na Europa têm sido em grande parte atribuídos à redução da diversidade genética (Oldroyd, 2007; Potts *et al.*, 2010; VanEngelsdorp e Meixner, 2010; Sheppard, 2012). Algumas espécies de *Bombus* introduzidas na Nova Zelândia para fins comerciais (Hopkins, 1914; Macfarlane e Gurr, 1995) também mostraram variabilidade genética menor quando comparadas às populações doadoras da Europa (Schmid-Hempel *et al.*, 2007; Lye *et al.*, 2011). Esse cenário de baixa variabilidade genética possui graves consequências para populações de abelhas como descrito na introdução. Entretanto, nossos resultados foram contrastantes com esse cenário, pois nossas amostras de meliponários apresentaram alta variabilidade genética nuclear, comparáveis às amostras naturais.

5.1 VARIABILIDADE GENÉTICA

Nos meliponários a variabilidade genética nuclear foi alta e não se mostrou significativamente diferente daquela observada nas amostras naturais. Após a rarefação dos dados de número médio de alelos (*Nar*), todos os meliponários, assim como as amostras naturais, apresentaram entre seis e nove alelos considerando-se todos os loci. Lopes (2004) e (2008) estudando duas espécies de *Melipona* encontraram valores abaixo de três em análises de loci de microssatélites. Os autores consideraram esses valores como um indicio de variabilidade genética moderada. Comparados a esses estudos nossos valores foram altos. Ao aplicar o teste *U* de Mann-Witney foi verificado que não há diferenças significativas entre os meliponários e entre estes e as amostras naturais ($P > 0,05$). Esse teste verifica se duas

amostras possuem distribuições iguais através da comparação de suas médias (Mann e Whitney, 1947). Para isso um teste de hipótese é realizado com a hipótese nula de que as médias (neste caso o Nar) não são diferentes (Peakall e Smouse, 2006).

Entretanto, apenas o número de alelos (Na) não pode ser usado como índice de diversidade. Se uma espécie possuir um alto Na , mas a distribuição dos alelos se mostrar desigual, com muitos alelos raros por exemplo, a probabilidade desses alelos serem perdidos por deriva genética é maior se comparado a uma população com alelos distribuídos uniformemente (Ridley *et al.*, 2007). Por essa razão resolvemos utilizar também como índice de diversidade o número médio de alelos efetivos (Ne). Este índice mede a probabilidade de dois alelos retirados aleatoriamente da população serem idênticos por descendência, conceito inicialmente proposto por Kimura e Crow (1964). Aqui utilizamos o mesmo conceito com algumas modificações (Peakall e Smouse, 2006; Jost, 2008). Nessa medida quanto maior o número de alelos raros menor é a probabilidade de se obter dois alelos relacionados, sendo assim o valor de Ne será baixo, indicando uma distribuição alélica desigual.

Após o teste U de Mann-Witney, foi verificado que o Ne não difere significativamente entre os grupos amostrais, indicando que todos os meliponários e amostras naturais apresentaram a mesma distribuição alélica, com Ne variando entre dois e cinco. Estes valores de Ne podem ser considerados altos, visto que para se obter um valor de cinco, por exemplo, é preciso que as frequências alélicas tenham contribuído quase que igualmente para o valor total. Tavares *et al.* (2007) verificaram para *Melipona rufiventris* valores de Ne entre 1 e 2, considerados baixos. Os autores interpretaram esses dados como um indício de variabilidade genética moderada.

Baixos valores de Na e Ne foram reportados em outros estudos de variabilidade genética e caracterização de locos de microssatélites em outras espécies de abelhas sem ferrão

(Francisco *et al.*, 2006; Carvalho-Zilse *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2009; Borges *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2010a; Lopes *et al.*, 2010b; Francisco *et al.*, 2011; Viana *et al.*, 2011)..

Harpur *et al.* (2012) estudando populações manejadas e populações naturais de *Apis mellifera* encontraram maior diversidade genética nuclear nas primeiras. Isso foi atribuído ao sistema de acasalamento de *Apis* e às práticas de apicultura, em especial pela importação de colônias para o aumento da densidade de ninhos no apiário (Baudry *et al.*, 1998; Oxley *et al.*, 2010). Ambos os fatores acabam levando a uma maior mistura das populações e assim ao aumento da variabilidade genética (Harpur *et al.*, 2012; Oldroyd, 2012).

Os resultados das análises do DNAm_t mostraram o oposto aos obtidos pelos microssatélites. O número de haplótipos (H), a diversidade haplotípica (*Hd*) e nucleotídica (π) encontrada nos meliponários foi menor do que o observado nas amostras naturais. Enquanto as amostras naturais apresentaram entre 10 e 19 haplótipos, os meliponários apresentaram entre 1 e 9. Nos meliponários do Paraná, com exceção de CUR, foi observado entre 1 e 2 haplótipos. A variabilidade genética foi de baixa a moderada (*Hd* entre 0,040 e 0,420), exceto nos meliponários AMP (*Hd*=0,587), PED (*Hd*=0,640) e CUR (*Hd*=0,570), se comparada às amostras naturais (*Hd* > 0,7). Batalha-Filho *et al.* (2010) encontraram em populações naturais de *Melipona quadrifasciata* alta *Hd* (0,8 a 0,9) e π de 0,0027 a 0,0055. Variabilidade genética mitocondrial de moderada a alta também foi reportada para populações naturais de outras espécies de abelhas sem ferrão (Francisco e Arias, 2009; Brito e Arias, 2010; Thummajitsakul *et al.*, 2011). Esses estudos com populações naturais de abelhas sem ferrão indicam que a variabilidade genética mitocondrial nos meliponários é baixa. Este resultado está de acordo com o esperado para populações manejadas, como explicado anteriormente.

5.2 ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL

Como apresentado na introdução, é esperado que populações manejadas mostrem, além da baixa variabilidade genética, estruturação populacional. Jost (2008) pontua algumas falhas das medidas clássicas de diferenciação genética, tais como G_{ST} , F_{ST} e seus derivados, em medir estruturação genética. Em sua interpretação a maior falha dessas medidas é que elas mostram baixos valores quando a taxa de heterozigose é alta, fato também mostrado por Nei (1973). Portanto, mesmo populações altamente não relacionadas apresentariam baixos valores de G_{ST} e F_{ST} . Esse não é um assunto trivial e tem sido amplamente discutido na literatura (Neigel, 2002; Pearse *et al.*, 2004; Hedrick, 2005; Heller e Siegismund, 2009; Jost, 2009a; Jost, 2009b; Ryman e Leimar, 2009). Dadas as vantagens apresentadas pelo D_{est} de Jost, nos sentimos confortáveis em ter aplicado este teste, que mostrou resultados mais satisfatórios do que os apresentados pelo F_{ST} e teste exato de diferenciação populacional neste trabalho.

O D_{est} mostrou que os meliponários formaram blocos estruturados, congruentes com sua distribuição geográfica (ver figuras 10 e 19). Os meliponários do Paraná não apresentaram estruturação genética entre si e PNI pelos microssatélites. Quando comparados a SSB todas as amostras do Paraná apresentaram valores de D_{est} de moderados a altos. AMP e PED apresentaram baixos valores entre si e altos em relação às amostras do Paraná. Em relação à SSB eles mostraram diferenciação de moderada a alta. Os resultados obtidos pelo STRUCTURE também mostraram os mesmos padrões, dividindo as amostras em São Paulo e Paraná (Figura 13). Esses resultados são confirmados pela AMOVA que mostrou que a maior

variação se encontra no nível intrapopulacional, o que pode sugerir fluxo gênico entre os grupos amostrais próximos, como os meliponários do Paraná e PNI e entre AMP e PED.

Os resultados obtidos pelo DNAm indicaram que apesar dos meliponários do Paraná não apresentarem diferenciação entre si, eles se mostraram geneticamente diferenciados em relação a PNI, apesar da proximidade geográfica. Apenas um haplótipo foi compartilhado. Em relação a SSB todos os meliponários apresentaram diferenciação genética total. PED e AMP mostraram baixos valores entre si. A AMOVA mostrou maior variação interpopulacional, que pode ser interpretado como ausência de fluxo gênico. Isto indica isolamento ou grande diferença entre os grupos amostrais. Delaney *et al.* (2009) encontraram diferenciação populacional entre duas populações de *Apis mellifera* de apiários oriundas do leste e oeste dos Estados Unidos. Mesmo após 10 anos, com todo o nível de manejo dessa espécie no país, a diferenciação genética de ambas as populações não mudou. Schiff e Sheppard (1996) também encontraram diferenciação genética entre populações de *Apis mellifera* naturais e de apiários do oeste dos Estados Unidos.

Para Meliponini, a forte estruturação populacional mostrada pelo DNAm neste estudo está de acordo com a restrita dispersão das fêmeas. Essa dispersão restrita se deve a seus hábitos de nidificação. A formação de um novo ninho se inicia quando operárias procuram um novo local para nidificar. Após a preparação do novo local, uma rainha virgem acompanhada por um grupo de operárias migra para o novo ninho (Van Veen e Sommeijer, 2000a; 2000b). O novo ninho irá depender do ninho "mãe" até se tornar independente e isso pode durar alguns dias ou mesmo até alguns meses dependendo da espécie (Nogueira Neto, 1954; Nogueira Neto, 1997). A distância do novo ninho se restringe à distância de forrageio que as operárias percorrem (Van Veen e Sommeijer, 2000a). Em *T. angustula* a distância de forrageio das operárias cobre um raio de cerca de 500 m (Nogueira Neto, 1997). Van Veen e Sommeijer (2000a) observaram a formação de novos ninhos de *T. angustula* a uma distância

de apenas 2,1 a 5 m. Distâncias de 15 a 300 m já foram reportadas em outras espécies de Meliponini (Nogueira Neto, 1954; Terada, 1972; Inoue *et al.*, 1984). Esses fatores em conjunto (distância de nidificação e dependência do ninho “mãe”) restringem significativamente a dispersão das fêmeas de Meliponini e podem explicar a forte estruturação genética mitocondrial encontrada. Estruturação populacional também foi verificada com dados do genoma mitocondrial em outras duas espécies de Meliponini: *Partamona helleri* e *Plebeia remota*, e a filopatria das fêmeas foi apontada como uma das causas (Francisco e Arias, 2009; Brito e Arias, 2010).

Ainda, 3 fatores, não mutuamente exclusivos, devem ser considerados para o entendimento do cenário genético verificado nos meliponários (microsatélites: alta variabilidade genética e baixa estruturação; DNAm: baixa variabilidade genética e forte estruturação); 1. Fluxo gênico através de machos; 2. Transporte artificial de colônias; e 3. Divisão artificial de ninhos.

5.2.1 Fluxo gênico via machos

Pouco se sabe sobre a capacidade de voo dos machos em Meliponini. Dados da literatura para as espécies *Melipona scutellaris* e *M. subnitida* indicam que os machos podem se deslocar 1.000 e 3.000 m, respectivamente (Bruening, 1990; Carvalho-Zilse e Kerr, 2004). Estudos de agregações de machos revelaram que eles podem pertencer a diversas colônias. Paxton (2000) e Kraus *et al.* (2008) ao analisarem agregações de machos de espécies do gênero *Scaptotrigona* concluíram que os machos presentes nas agregações não eram aparentados e que o número de colônias contribuindo com esses machos variava de 20 a 40. O mesmo resultado foi obtido por Cameron *et al.* (2004) para a espécie *Trigona collina*, porém o número de colônias contribuindo com machos foi de 132. Isso é explicado pelo fato de que

poucas semanas após o nascimento os machos deixam o ninho em busca de uma rainha virgem e nunca mais retornam, vivendo, portanto, como uma abelha solitária (Velthuis *et al.*, 2005). Dadas essas características, espera-se que eles tenham uma capacidade de dispersão maior do que as fêmeas, podendo ter um importante papel como mediador de fluxo gênico entre locais distantes.

Os meliponicultores visitados obtêm seus ninhos da mata do entorno, com exceção de CUR que possui alguns ninhos da região oeste do estado. Nesses meliponários há divisão de ninhos para aumento do plantel, exceto em PED e AMP. Portanto, esperávamos que nos meliponários do Paraná a variabilidade genética para os dois marcadores fosse menor se comparada a PNI. Entretanto, isso não foi observado. Acreditamos que a mata do entorno possa abrigar ninhos naturais de onde partem os machos que fecundam as rainhas virgens, introduzindo novos alelos nos meliponários e assim diminuindo a diferença entre estes e as amostras naturais. O fluxo gênico através de machos pode explicar os resultados obtidos para *Nar* e *Ne* nesses meliponários. Caso o fluxo gênico ocorresse também através de fêmeas, deveríamos esperar um número maior de haplótipos mitocondriais, exceto se as fêmeas migrantes possuísem os mesmos haplótipos já presentes no meliponário.

Supondo que uma rainha heterozigota migrante e com haplótipo diferente dos existentes no meliponário, e sendo fecundada por um macho haploide (Engels e Imperatriz-Fonseca, 1990; Imperatriz-Fonseca *et al.*, 1998; Paxton *et al.*, 1999b; Peters *et al.*, 1999), que possuíse alelos diferentes dos presentes na rainha, teríamos um cenário em nível populacional de três alelos nucleares por haplótipo mitocondrial. Entretanto, o *Nar* foi superior ao esperado, considerando-se o número de haplótipos, para a maioria dos meliponários. Um exemplo disso é MCR2 que apesar de possuir apenas um haplótipo mitocondrial apresentou sete alelos em média. Rainhas migrantes que possuísem os mesmos haplótipos mas alelos diferentes poderiam produzir esse cenário. Entretanto, a hipótese de

fluxo gênico via macho é reforçada pelo alto número de haplótipos mitocondriais encontrados em PNI em relação a todos os meliponários do Paraná. Além disso, o fato de *Nar* não diferir entre PNI e os meliponários, mas os haplótipos mitocondriais apresentarem alta diferença sugere que machos sejam os mediadores do fluxo gênico e não as fêmeas.

5.2.2 Transporte artificial de colônias

O fluxo gênico através de machos não pode ser a única hipótese para explicar o padrão observado. De acordo com as premissas apresentadas nos parágrafos anteriores sobre a ocorrência de fluxo gênico, PNI deveria apresentar baixa diferenciação populacional em relação aos meliponários do Paraná, em especial para o DNAm_t, assim como CUR deveria apresentar alta diferenciação em relação aos mesmos meliponários. Isso não foi observado. O fluxo gênico ou sua ausência poderia explicar esses dois casos. Entretanto, a incongruência dos resultados de PNI (diferentes para ambos os marcadores em relação aos meliponários) e CUR (mesmo distante dos outros meliponários do Paraná não apresentar diferenciação populacional para ambos marcadores) e as características reprodutivas de *T. angustula* unidas à prática da meliponicultura, torna o transporte artificial de ninhos entre locais uma hipótese provável. Segundo Nogueira Neto (1997) *T. angustula* é a espécie mais criada na América Latina. A criação de abelhas sem ferrão é um hábito antigo datando do século XVI, sendo um hábito comum dos nativos (Ximénez, 1967; Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006). Vários grupos indígenas ainda hoje utilizam o mel e a própolis de Meliponini para vários fins (Sommeijer, 1999; Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006). A obtenção de ninhos para fins comerciais tem se intensificado (Calvete *et al.*, 2003; Antunes *et al.*, 2007) e a facilidade de manejo e a docilidade dessas abelhas as têm tornado uma alternativa melhor do que *Apis mellifera*, visto que a criação desta é mais laboriosa (Neumann e Carreck, 2010). A meliponicultura tem se

tornado uma prática popular, difundida e incentivada por pesquisadores e criadores em geral. Há um incentivo para o comércio de ninhos e a troca de experiências (Nogueira Neto, 1997; Chiari *et al.*, 2002; Fioravanti, 2010).

O cenário descrito no parágrafo anterior para CUR e PNI nos leva a postular que há transporte de colônias. De fato, o meliponicultor responsável por CUR nos informou que recebeu amostras oriundas do oeste do estado. Este então é um caso de homogeneização genética artificial. Isso parece ser comum, visto que baixa estruturação genética foi observada em *Melipona scutellaris* e a causa também foi atribuída ao transporte artificial de colônias, pois essa espécie também é bastante utilizada na meliponicultura (Carvalho-Zilse *et al.*, 2009). Portanto, acreditamos que o transporte artificial de ninhos é um fator importante a ser considerado para explicar o padrão de homogeneização genética verificado pelo DNAmt e a estruturação genética observada entre todos os meliponários do Paraná e PNI.

5.2.3 Divisão de colônias

A divisão de colônias é uma prática muito comum para multiplicar o número de ninhos em meliponários (Nogueira-Neto, 1997). Quando a colônia está forte, parte dos favos de cria próximos da emergência, alguns potes de mel e pólen são transferidos para um novo substrato de nidificação onde se desenvolve a nova colônia (Nogueira-Neto, 1997). Essa prática ocorre há muito tempo, datando do século XIX (Castelo-Branco, 1845).

A divisão de colônias transforma os ninhos no meliponário em réplicas formando assim blocos de colônias aparentadas. Isto poderia ser uma forma de endocruzamento e este será discutido posteriormente. Como hipotetizamos, a alta variabilidade genética nuclear ocorre pela introdução de alelos através de fluxo gênico via macho. Logo, o número de alelos sofre mudanças, mas o número de haplótipos mitocondriais não. Assim, o número de

haplótipos presentes nos meliponários pode indicar o número de ninhos fundadores dos mesmos. Como AMP, CUR e PED mostraram 5, 7 e 9 haplótipos respectivamente, podemos inferir que o número de ninhos fundadores desses meliponários seja no mínimo esses. Obviamente o número pode ter sido maior, pois fêmeas de mesmo haplótipo podem ter sido fundadoras. O H também pode ter sido maior e alguns haplótipos podem ter se perdido por deriva. Para os outros meliponários o H é, portanto, o número de ninhos fundadores inferidos foram: 2 (SHE1 e 2, MCR1, ERO, SMI) e 1 (MCR2). Assim observamos que, com exceção de AMP, CUR e PED, os outros seis meliponários apresentaram discordância entre o Nar e o H , pois o primeiro índice variou entre 7 e 9, enquanto o segundo entre 1 e 2. Logo, com este número hipotetizado de ninhos fundadores, acreditamos que o restante das colônias nesses meliponários foram obtidas por divisão artificial. A multiplicação de colônias por divisão manteria os mesmos haplótipos mitocondriais, pois esses seriam réplicas do ninho dividido. A alta variabilidade genética mitocondrial encontrada nas amostras naturais **reforçam** essa conclusão. Caso o aumento do plantel ocorresse apenas por captura de novos enxames naturais, não haveria tanta diferença na diversidade genética mitocondrial entre esses meliponários e as amostras naturais da região. Sendo assim, a divisão artificial de colônias também explica a baixa variabilidade genética mitocondrial e o baixo H encontrados nos meliponários MCR1, MCR2, SHE, SHE2, ERO e SMI.

5.2.4 Endocruzamento

Diante dos resultados, especialmente o fato do Nar e Ne não serem significativamente diferentes entre os grupos amostrais, o que podemos discutir em relação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e as evidências de endocruzamento? De fato, os valores P mostraram que somente AMP, MCR1, PED e SSB não apresentaram desvios do

EHW. Isto era esperado para AMP e PED, visto que as práticas de meliponicultura em ambos são quase inexistentes, e em SSB, pois é uma amostra natural. As amostras de MCR2, SHE1, SHE2, ERO, SMI, CUR e PNI apresentaram desvios no EHW, fato não esperado dado os resultados obtidos para *Nar* e *Ne*. Porém, isso poderia ocorrer devido a endocruzamento, que pode ser inferido indiretamente pela baixa variabilidade genética mitocondrial encontrada nos meliponários. Realizamos um teste para verificar se esse desvio no EHW era devido a deficiência de heterozigotos, uma consequência do endocruzamento. Esse teste revelou que todos os meliponários, assim como PNI apresentaram deficiência de heterozigotos, exceto AMP, MCR1 e SSB. Para estes últimos, a ausência de deficiência de heterozigotos era esperada, pois eles não apresentaram desvios no EHW. Entretanto, o interessante é que PED, mesmo estando em EHW, apresentou deficiência de heterozigotos. Sabe-se que ao longo de várias gerações, em pequenas populações isoladas o único tipo de cruzamento passa a ser o endocruzamento, visto que ele é inevitável (Frankham *et al.*, 2004). Sendo assim, os acasalamentos tornam-se aleatórios mesmo em endogamia, e neste caso não causam desvios no EHW (Templeton, 2006). Neste cenário em especial se encaixa nos padrões observados em PED, pois de todos os meliponários que não apresentaram desvios no EHW, ele foi o único que apresentou evidências de endocruzamento pela deficiência de heterozigotos e baixo valor de F_{IS} .

Os coeficientes de endocruzamento (F_{IS}) obtidos, com exceção em AMP, CUR, MCR1 e SSB, foram diferentes de zero. Nyakaana e Arctander (1999) estudando populações de elefantes africanos encontraram, para duas populações, valores de F_{IS} de 0,06 e 0,09 e os classificaram como baixos. Na abelha *Bombus terrestris*, no Japão, foi detectado um leve endocruzamento sugerido pelo valor de $F_{IS}=0,048$ (Nagamitsu and Yamagishi, 2009). Carvalho-Zilse *et al.* (2009) para amostras de *Melipona scutellaris* de meliponários encontrou $F_{IS}=0,32$ e o classificou como alto, indicativo de forte endocruzamento. Comparados a esses

estudos nossos resultados para F_{IS} foram de baixos a moderados, o que segundo a literatura poderiam ser considerados como evidências de endocruzamento moderado.

Entretanto as interpretações dos resultados de EHW, deficiência de heterozigotos e F_{IS} devem ser usados com cautela, pois podem ser mascarados pela presença de alelos nulos. Alelos nulos ocorrem quando há mutações ou deleções no sítio de ligação dos *primers* (Lehmann *et al.*, 1996). Eles podem mostrar um excesso de homozigotos quando na verdade há alelos que não foram amplificados no indivíduo (Callen *et al.*, 1993). Como consequência observa-se altos valores de F_{IS} (Jones *et al.*, 1998), sendo interpretados como evidência de endocruzamento. Por definição o endocruzamento é a união não pan-mítica dos alelos decorrente de cruzamento entre indivíduos aparentados (Wright, 1922). Como consequência direta, ocorre a diminuição da variabilidade genética levando a população à depressão endogâmica (Zayed, 2009). Contudo este não parece ser o caso nos meliponários. Como os resultados mostraram alto Nar e Ne e ausência de estruturação populacional (dois efeitos opostos ao endocruzamento) entre as amostras do Paraná e entre as amostras de São Paulo, acreditamos que não se trata de endocruzamento. O endocruzamento detectado deve ser um artifício devido à presença de alelos nulos.

Mecanismos para evitar endocruzamento têm sido discutidos na literatura para vários organismos (Wright, 1943; Howard, 1960; Hamilton, 1964; Greenwood, 1980; Komdeur e Hatchwell, 1999; Szulkin e Sheldon, 2008). Em algumas espécies de abelhas do gênero *Bombus*, machos jovens são expulsos da colônia logo após a emergência evitando o cruzamento com rainhas virgens da mesma colônia, e diminuindo assim a probabilidade de endocruzamento (Plowright e Pallet, 1979; Foster, 1992). Em *Apis mellifera* machos de milhares de colônias se reúnem em áreas de agregação representando geneticamente toda a população (Jaffé *et al.*, 2009). Ainda, a poliandria presente nessa espécie contribui significativamente para minimizar o endocruzamento (Baudry *et al.*, 1998; Mueller *et al.*,

2012). Em outras espécies de abelhas as agregações de machos, oriundos de diferentes ninhos, têm sido apontadas como o principal mecanismo para evitar endocruzamento (Woyke, 1973; Page, 1980). Foi verificado em *Scaptotrigona mexicana* que os machos evitam as agregações mais próximas de suas colônias. Como consequência desse comportamento há a diminuição das chances de endocruzamento (Mueller *et al.*, 2012). O mecanismo de formação de agregações de machos, que garante o fluxo gênico, também é presente em *T. angustula* (Santos, 2012). Como descrito na introdução, o endocruzamento tem um efeito negativo adicional em abelhas devido à produção de machos diploides. Essa produção, embora negativa, é apontada como um fator evolutivo favorável ao desenvolvimento de sistemas de acasalamento que reduzem o endocruzamento (Page, 1980; Paxton, 2005). Em abelhas da tribo Euglossini a alta mobilidade e o fluxo gênico foram apontados como as causas da baixa frequência de machos diploides (Souza *et al.*, 2010). Por termos trabalhado apenas com operárias, nós não pudemos verificar diretamente a produção desses machos. Entretanto, os resultados de variabilidade genética nuclear e a ausência de endocruzamento nos levam a inferir que não há a produção de machos diploides nos meliponários.

Um estudo recente revelou que as práticas de manejo em *Apis mellifera* podem ser responsáveis pela alta diversidade genética encontrada em populações de apiários (Harpur *et al.*, 2012). Neste estudo os autores concluem que a importação regular de ninhos, junto ao aumento artificial destes (divisão de ninhos) e o transporte de colônias em grande escala geográfica são os responsáveis pela alta variabilidade genética em populações de apiários. Os mesmos fatores também explicam a ausência de diferenciação genética (Bourgeois *et al.*, 2008) e de endocruzamento nessas populações. Esse é o cenário observado em nosso estudo: alta variabilidade genética nuclear, ausência de diferenciação populacional e de endocruzamento.

5.3 CONCLUSÕES

Nossos resultados com os marcadores microssatélites indicaram ausência de endocruzamento, alta variabilidade genética nuclear e ausência de diferenciação populacional. As análises do DNAm_t indicaram o oposto (exceto o endocruzamento, inferido apenas pelos microssatélites). O fluxo gênico através dos machos é aventado como a principal explicação para o cenário observado. Diante desses resultados inferimos que a prática de divisão artificial de colônias afeta apenas a diversidade genética mitocondrial nos meliponários. Meliponários com práticas de meliponicultura diferentes apresentaram resultados diferentes. CUR importou ninhos de outras regiões o que elevou a diversidade genética mitocondrial. PED e AMP mostraram variabilidade genética mitocondrial e H mais altos do que os outros meliponários, pois não dividem artificialmente os ninhos.

Esses resultados são importantes para a meliponicultura. Isso porque um dos maiores problemas para o meliponicultor é encontrar e/ou obter ninhos, tendo muitas vezes que depredar árvores. Se o aumento do número de colônias através da divisão artificial de ninhos não causa diminuição da variabilidade genética nuclear, a necessidade de busca de ninhos na natureza pode ser diminuída. Ainda, mantendo-se a variabilidade genética nuclear, diminui-se o risco da produção de machos diploides e os problemas decorrentes de sua produção.

Dessa forma, baseado nos nossos resultados sugerimos que a implementação do meliponário deva ser feita o mais próximo da mata e dentro da área de distribuição natural da espécie escolhida. Isso garante a manutenção da variabilidade genética através dos machos, diminuindo também a necessidade de troca de colônias e transporte artificial de ninhos.

6. CONCLUSÕES

- A variabilidade genética nuclear nos meliponários é alta não sendo diferente do observado nas amostras naturais.
- A variabilidade genética mitocondrial nos meliponários é menor do que o observado nas amostras naturais.
- O fluxo gênico ocorre através dos machos.
- Os meliponários não estão sob endocruzamento.
- As práticas de meliponicultura influenciaram os resultados observados no que diz respeito ao transporte artificial de colônias (homogeneizou alguns meliponários com relação ao DNAm) e a divisão artificial de ninhos (responsável pela baixa variabilidade genética mitocondrial e baixo número de haplótipos observados na maioria dos meliponários).
- A maioria dos meliponários parece ter sido fundada por poucos ninhos.
- A divisão artificial de colônias parece não ter afetado a variabilidade genética nuclear dos meliponários.

7. RESUMO

Grande parte da flora tropical brasileira é polinizada por abelhas, com destaque àquelas pertencentes à tribo Meliponini (abelhas sem ferrão). A espécie *Tetragonisca angustula*, conhecida popularmente como jataí, tem sido o alvo principal dos meliponicultores dada a sua abundância, fácil manejo, docilidade e pureza do mel. Contudo as práticas de divisão de ninho nos meliponários podem aumentar a estruturação genética e o isolamento populacional, assim como o endocruzamento. Isso causa a diminuição da heterozigose populacional e da variabilidade genética. Populações naturais desta espécie já foram estudadas, contudo a variabilidade genética de amostras de meliponários ainda não foi avaliada. O objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética de *Tetragonisca angustula* provenientes de nove meliponários, fazendo uma correlação dessa variabilidade com as práticas de meliponicultura. O acesso a variabilidade genética foi realizado por meio da análise de nove loci de microssatélites e o sequenciamento parcial de dois genes mitocondriais. Um total de 430 indivíduos (um por ninho) foram amostrados em: Pedreira (PED), Amparo (AMP), ambos em São Paulo; Marechal Cândido Rondon (MCR1 e MCR2), São Miguel do Iguçu (SMI), Santa Helena (SHE1 e SHE2), Entre Rios do Oeste (ERO) e Curitiba (CUR), todos no Paraná. Cem indivíduos (SSB e PNI) coletados na natureza foram usados como controle da variabilidade genética. Os resultados mostraram alta diferenciação genética entre as amostras do Paraná e São Paulo, mas baixa se comparadas "intra-estado". Para o DNA mitocondrial (DNAMt) as amostras controle se mostraram diferenciadas em relação aos meliponários. A variabilidade genética nuclear foi alta e a mitocondrial foi baixa para a maioria dos meliponários. Não houve evidências de endocruzamento nos meliponários. A alta variabilidade genética nuclear, ausência de endocruzamento e a baixa diferenciação populacional são explicadas por fluxo gênico através de machos. A moderada diversidade genética mitocondrial em PED e AMP pode ser devido a ausência de práticas de meliponicultura. Em CUR esse mesmo resultado pode ser explicado pelo transporte artificial de colônias para esse meliponário. Para o restante dos meliponários a baixa variabilidade genética mitocondrial pode ser explicada pela prática de divisão de colônias. Esses resultados são importantes para a meliponicultura, pois indicam que as práticas de divisão de ninhos não afetam a variabilidade genética nuclear. Assim os problemas inerentes a baixa variabilidade genética nuclear e a estruturação populacional como endocruzamento e produção de machos diploides são mínimos ou inexistentes. Para isso sugerimos que a implementação do meliponário deva ser feita o mais próximo da mata e o local deve ficar dentro da distribuição da espécie escolhida para garantir o fluxo gênico através de machos.

8. ABSTRACT

Most of the Brazilian tropical flora is pollinated by bees, especially by those belonging to the tribe Meliponini (stingless bees). *Tetragonisca angustula* has been aim of Meliponini beekeepers, especially for its well valued honey and easy keeping and abundance. The practices of nest division in meliponaries can increase the genetic structure and population isolation as well as inbreeding, that leads to a decreasing in population heterozygosity and genetic variability. Natural populations of *T. angustula* have already been studied nonetheless the genetic variability of Meliponaries samples has not been assessed yet. This project aimed to measure the genetic variability of *T. angustula* maintained in nine meliponaries, correlated it to Meliponini beekeeping practices. The genetic variability will be assessed by nine microsatellite loci analysis and two partial mitochondrial gene sequencing (*COI* and *CytB*). A total of 430 individual (one per nest) were sampled in: Pedreira (PED), Amparo (AMP), both in São Paulo state, Marechal Cândido Rondon (MCR1 and MCR2), São Miguel do Iguaçu (SMI), Santa Helena (SHE1 and SHE2), Entre Rios do Oeste (ERO) and Curitiba (CUR), all in Paraná state. A hundred individuals (SSB and PNI) collected from nature were used for comparison. It was found high population differentiation between Paraná and São Paulo samples, but low by "intra-state" comparison. High mitochondrial genetic differentiation was found between control samples and meliponaries. The nuclear genetic variability was high and the mitochondrial was low for most of meliponaries. No inbreeding was detected in meliponaries. The high nuclear genetic variability, absence of inbreeding and low population differentiation can be explained by gene flow through males. The moderated mitochondrial genetic diversity in PED and AMP may be related to absence of the Meliponini beekeeping practices. CUR presented the same result that can be explained by artificial transportation of colonies to this meliponary. The low mitochondrial genetic variability detected on rest of the meliponaries may be related to colony division practices. These results are important for meliponiculture, because indicate that colony division practices do not affect the nuclear genetic variability. Thus the issues related to low nuclear genetic variability and population structure as inbreeding and diploid males production are almost absent. For this, we suggest that the meliponary implementation must be done as closest as possible of the forest and this location must be according to geographic distribution of the chosen species, in order to ensure the gene flow through males.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agoze, M. E., Drezen, J. M., Renault, S., Periquet, G. (1994). Analysis of the reproductive potential of diploid males in the wasp *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera : Ichneumonidae). *Bulletin of Entomological Research*, 84, 213–218.
- Aguilar, R., Ashworth, L., Galetto, L., Aizen, M. A. (2006). Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters*, 9, 968–980.
- Aidar, D. S. (1996). *A mandaçaia: biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de Melipona quadrifasciata Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Gentética.
- Allen-Wardell, G., Bernhardt, P., Bitner, R., Burquez, A., Buchmann, S., Cane, J., Allen, P., et al. (1998). The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conservation Biology*, 12, 8–17.
- Antunes, O. T., Calvete, E. O., Rocha, H. C., Nienow, A. A., Cecchetti, D., Riva, E., Maran, R. E. (2007). Produção de cultivares de morangueiro polinizadas pela abelha jataí em ambiente protegido. *Horticultura Brasileira*, 25, 94–99.
- Arias, M. C., Soares, A. E. E., Nóbrega, F. G. (1990). Improvements to the mitochondrial restriction maps for Italian and Africanized honey bees. *Brazilian Journal of Genetics*, 13, 501–507.
- Asada, S., Ono, M. (1997). Tomato pollination with Japanese native bumblebees (*Bombus* spp.). *Acta Horticulturae*, 437, 289–292.
- Asplen, M. K., Whitfield, J. B., De Boer, J. G., Heimpel, G. E. (2009). Ancestral state reconstruction analysis of hymenopteran sex determination mechanisms. *Journal of Evolutionary Biology*, 22, 1762–1769.
- Avery, P. J. (1984). The population genetics of haplodiploids and X-linked genes. *Genetical Research*, 44, 321–341.
- Bacelar-lima, C. G., Freire, D. C. B., Coletto-silva, A., Costa, K. B., Laray, J. P. B., Vilas-Boas, H. C., Carvalho-Zilse, G. A. (2006). Melitocoria de *Zygia racemosa* (Ducke) Barneby Grimes por *Melipona seminigra merrillae* Cockerell, 1919 y *Melipona compressipes manaosensis* Schwarz, 1932 (Hymenoptera, Meliponina) en la Amazonía Central, Brasil. *Acta Amazonica*, 36, 343–348.
- Bandelt, H.-J., Forster, P., Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37–48.
- Barni, G. S., Strapazzon, R., Guerra, J. C. V., Moretto, G. (2007). Mitochondrial genome differences between the stingless bees *Melipona rufiventris* and *Melipona mondury* (Apidae: Meliponini). *Genetics and Molecular Research*, 6, 8–14.
- Batalha-Filho, H., Waldschmidt, A. M., Campos, L. A. O., Tavares, M. G., Fernandes-Salomão, T. M. (2010). Phylogeography and historical demography of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie*, 41, 534–547.
- Baudry, E., Solignac, M., Garnery, L., Gries, M., Cornuet, J., Koeniger, N. (1998). Relatedness among honeybees (*Apis mellifera*) of a drone congregation. *Proceedings of the Royal Society B*, 265, 2009–2014.

- Bengtsson, B. O. (1978). Avoiding inbreeding: at what cost? *Journal of Theoretical Biology*, 73, 439–444.
- Beye, M., Hasselmann, M., Fondrk, M. K., Page, R. E., Omholt, S. W. (2003). The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell*, 114, 419–429.
- Bloch, G., Francoy, T. M., Wachtel, I., Panitz-cohen, N., Fuchs, S., Mazar, A. (2010). Industrial apiculture in the Jordan valley during Biblical times with Anatolian honeybees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 11240–11244.
- Borges, A. A., Campos, L. A. O., Salomão, T. M. F., Tavares, M. G. (2010). Genetic variability in five populations of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae) from Minas Gerais State, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 33, 781–784.
- Bourgeois, L., Sylvester, A., Danka, R., Rinderer, T. (2008). Comparison of microsatellite DNA diversity among commercial queen breeder stocks of Italian honey bees in the United States and Italy. *Journal of Apicultural Research*, 47, 93–98.
- Brito, R. M., Arias, M. C. (2010). Genetic structure of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) from Neotropical Atlantic rainforest. *Insectes Sociaux*, 57, 413–419.
- Brito, R. M., Francisco, F. O., Domingues-Yamada, A. M. T., Gonçalves, P. H. P., Pioker, F. C., Soares, A. E. E., Arias, M. C. (2009). Characterization of microsatellite loci of *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Conservation Genetics Resources*, 1, 183–187.
- Brosi, B. J. (2009). The complex responses of social stingless bees (Apidae: Meliponini) to tropical deforestation. *Forest Ecology and Management*, 258, 1830–1837.
- Brown, W. M. (1985). The mitochondrial genome of animals. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Plenus Press.
- Brown, W. M., George, M. J., Wilson, A. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 1967–1971.
- Bruening, M. H. (1990). *Abelha jandaira*. Mossoró: Coleção Mossoroense (RN), série C, v.557, (DIYII).
- Bruford, M. W., Bradley, D. G., Luikart, G. (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics*, 4, 900–910.
- Bull, J. J. (1983). *Evolution of Sex Determining Mechanisms*. Menlo Park, California: Benjamin/Cummings.
- Callen, D. F., Thompson, A. D., Shen, Y., Phillips, H. A., Richards, R. I., Mulley, J. C., Sutherland, G. R. (1993). Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*, 52, 922–927.
- Calvete, E. O., Rocha, E. C., Cechetti, D., Maran, R. E., Carli, W. (2003). Polinização entomófila de morangueiro cultivado em ambiente protegido. *Horticultura Brasileira*, 21, 281.
- Camargo, J. M. F., Pedro, S. R. M. (1992). Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. *Apidologie*, 23, 509–522.
- Camargo, J. M. F., Pedro, S. R. M. (2012). Meliponini Lepelletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D., Melo, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version*. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>.
- Cameron, E. C., Franck, P., Oldroyd, B. P. (2004). Genetic structure of nest aggregations and drone congregations of the southeast Asian stingless bee *Trigona collina*. *Molecular Ecology*, 13, 2357–2364.

- Campos, M. J. O. (1980). *Aspectos da sociologia e fenologia de Pereirapis semiauratus (Hymenoptera, Halictidae, Augochlorini)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos.
- Cane, J. H. (1997). Ground-nesting bees: the neglected pollinator resource for agriculture. *Acta Horticulturae*, 437, 309–324.
- Carneiro, M., Afonso, S., Geraldés, A., Garreau, H., Bolet, G., Boucher, S., Tircazes, A., Queney, G., Nachman, M. W., Ferrand, N. (2011). The genetic structure of domestic rabbits. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 1801–1816.
- Carvajal-Rodríguez, A., Uña-Alvarez, J. (2011). Assessing significance in high-throughput experiments by sequential goodness of fit and q-value estimation. *PLoS One*, 6, e24700.
- Carvajal-Rodríguez, A., Uña-Alvarez, J., Rolán-Alvarez, E. (2009). A new multitest correction (SGoF) that increases its statistical power when increasing the number of tests. *BMC bioinformatics*, 10, 209.
- Carvalho-Zilse, G. A., Costa-Pinto, M. F. F., Nunes-Silva, C. G., Kerr, W. E. (2009). Does beekeeping reduce genetic variability in *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini)? *Genetics and Molecular Research*, 8, 758–765.
- Carvalho-Zilse, G. A., Kerr, W. E. (2004). Substituição natural de rainhas fisogástricas e distância de vôo dos machos em Tiuba (*Melipona compressipes fasciculata* Smith, 1854) e Uruçu (*Melipona scutellaris* Latreille, 1811) (Apidae, Meliponini). *Acta Amazonica*, 34, 649–652.
- Castelo-Branco, L. S. D. (1845). Memória acerca das abelhas da Província do Piauí no Império do Brasil. *O Auxiliador da Indústria Nacional*, 2-3, 49–72.
- Chakraborty, R., Kimmel, M. (1999). Statistics of microsatellite loci: estimation of mutation rate and pattern of population expansion. In D.B. Goldstein, C. Schlotterer (Eds.). *Microsatellites: Evolution and Applications*. (pp. 139–150). New York: Oxford University Press.
- Chiari, W. C., Attencia, V. M., Ernesto, A., Fritzen, T., Alencar, V., Toledo, A., Terada, Y., Ruvolo-Takasusuki, M. C. C., Toral, F. L. B., Paiva, G. J. (2002). Avaliação de diferentes modelos de colméias para abelhas jataí (*Tetragonisca angustula* Latreille, 1811). *Maringá*, 24, 881–887.
- Clutton-Brock, J. (1987). *A natural history of domesticated Mammals*. Cambridge: Cambridge University Press, British Museum of Natural History.
- Cook, J. M. (1993). Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. *Heredity*, 71, 421–435.
- Cortopassi-Laurino, M., Imperatriz-Fonseca, V. L., Roubik, D. W., Dollin, A., Heard, T., Aguilar, I., Venturieri, G. C., Eardley, C., Nogueira-Neto, P. (2006). Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie*, 37, 275–292.
- Costa, R. G., Tavares, M. G., Dias, L. A. S., Campos, L. A. (2005). Isoenzyme variation in *Melipona rufiventris* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) in Minas Gerais State, Brazil. *Biochemical Genetics*, 43, 49–58.
- Couceiro, L., Maneiro, I., Ruiz, J. M., Barreiro, R. (2011). Multiscale genetic structure of an endangered seaweed *Ahnfeltiopsis pusilla* (Rhodophyta): implications for its conservation. *Journal of Phycology*, 47, 259–268.
- Crane, E. (1983). *The Archaeology of Beekeeping*. Ithaca, New York: Cornell University Press.
- Crawford, N. G. (2010). Smogd: Software for the Measurement of Genetic Diversity. *Molecular Ecology Resources*, 10, 556–557.

- Crozier, R. H. (1976). Counter-intuitive property of effective population size. *Nature*, 262, 384.
- Daily, G. C. (1997). *Nature's services: societal dependence on natural ecosystems*. Washington: Island.
- Delaney, D. A., Meixner, M. D., Schiff, N. M., Sheppard, W. S. (2009). Genetic characterization of commercial honey bee (Hymenoptera: Apidae) populations in the United States by using mitochondrial and microsatellite markers. *Annals of the Entomological Society of America*, 102, 666–673.
- Drummond, A. J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kearse, M., Markowitz, S., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T., Wilson, A. (2011). Geneious v5.4. Disponível em: <http://www.geneious.com/>
- Duarte, O. M. P., Gaiotto, F. A., Souza, A. P., Mori, G. M., Costa, M. A. (2012). Isolation and characterization of microsatellites from *Scaptotrigona xanthotricha* (Apidae, Meliponini): a stingless bee in the Brazilian Atlantic rainforest. *Apidologie*, 43, 432–435.
- Earl, D. A., VonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359–361.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792–1797.
- Engels, W., Imperatriz-Fonseca, V. L. (1990). Caste development, reproductive strategies and control of fertility in honeybees and stingless bees. In W. Engels (Ed.), *Social Insects: An Evolutionary Approach to Castes and Reproduction* (pp. 166–230). Berlin: Springer-Verlag, March.
- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M., Cornuet, J.-M. (1995). Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*, 140, 679–695.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.
- Excoffier, L., Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10, 564–567.
- Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J. K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567–1587.
- Fioravanti, C. (2010). As asas dos alimentos: abelhas ganham valor na produção agrícola. *Pesquisa FAPESP*, 171, 53–55.
- Foster, R. L. (1992). Nestmate recognition as an inbreeding avoidance mechanism in bumble bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 65, 238–243.
- Francini, I. B., Sousa, A. C. B., Sforça, D. A., Costa-Pinto, M. F. F., Campos, T., Nunes-Silva, C. G., Zucchi, M. I., Souza, A. P., Carvalho-Zilse, G. A. (2010). Isolation and characterization of microsatellite loci in the stingless bee *Melipona interrupta manaosensis* (Apidae: Meliponini). *Conservation Genetics Resources*, 2, 27–30.
- Francini, I. B., Sforça, D. A., Sousa, A. C. B., Campos, T., Cidade, F. W., Zucchi, M. I., Souza, A. P., Nunes-Silva C. G., Carvalho-Zilse, G. A. (2009). Microsatellite loci for an endemic stingless bee *Melipona seminigra merrillae* (Apidae, Meliponini) from Amazon. *Conservation Genetics Resources*, 1, 487–490.
- Francisco, F. O. (2012). *Estrutura e diversidade genética de populações insulares e continentais de abelhas da Mata Atlântica*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.

- Francisco, F. O., Arias, M. C. (2010). Inferences of evolutionary and ecological events that influenced the population structure of *Plebeia remota*, a stingless bee from Brazil. *Apidologie*, 41, 216–224.
- Francisco, F. O., Brito, R. M., Arias, M. C. (2006). Allele number and heterozygosity for microsatellite loci in different stingless bee species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Neotropical Entomology*, 35, 638–643.
- Francisco, F. O., Brito, R. M., Santiago, L. R., Gonçalves, P. H. P., Pioker, F. C., Domingues-Yamada, A.M.T., Arias, M. C. (2011). Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in the stingless bee *Plebeia remota* (Apidae: Meliponini). *Conservation Genetics Resources*, 3, 417–419.
- Francisco, F. O., Domingues-Yamada, A. M. T., Gonçalves, P. H. P., Brito, R. M., Pioker, F. C., Mateus, S., Arias, M. C. (2013). Characterization of microsatellite loci for the stingless bee *Scaura latitarsis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Journal of Hymenoptera Research*, 30, 7–11.
- Francisco, F. O., Silvestre, D., Arias, M. C. (2001). Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction maps. *Apidologie*, 32, 323–332.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. (2004). *A Primer of Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Freitas, B. M., Imperatriz-Fonseca, V. L., Medina, L. M., Kleinert, A. M. P., Galetto, L., Nates-Parra, G., Quezada-Euán, J. J. G. (2009). Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*, 40, 332–346.
- Freitas, G. S., Soares, A. E. E. (2004). *Procurando Irá: um passeio ecológico*. Ribeirão Preto: FFCL de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular ecology*, 18, 4541–4550.
- Gempe, T., Hasselmann, M., Schjøtt, M., Hause, G., Otte, M., Beye, M. (2009). Sex determination in honeybees: two separate mechanisms induce and maintain the female pathway. *PLoS Biology*, 7, e1000222.
- Giannini, T. C., Acosta, A. L., Garófalo, C. A., Saraiva, A. M., Alves dos Santos, I., Imperatriz-Fonseca, V. L. (2012). Pollination services at risk: Bee habitats will decrease owing to climate change in Brazil. *Ecological Modelling*, 244, 127–131.
- Gonçalves, P. H. P., Francisco, F. O., Brito, R. M., Domingues-Yamada, A. M. T., Pioker, F. C., Soares, A. E. E., Arias, M. C. (2011). A scientific note on the isolation and characterization of microsatellite loci of *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Apidologie*, 42, 560–563.
- Green, C.L., Franck, P., Oldroyd, B. P. (2001). Characterization of microsatellite loci for *Trigona carbonaria*, a stingless bee endemic to Australia. *Molecular Ecology Notes*, 1, 89–92.
- Greenwood, P. J. (1980). Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behaviour*, 28, 1140–1162.
- Grüter, C., Kärcher, M. H., Ratnieks, F. L. W. (2011). The natural history of nest defence in a stingless bee, *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae), with two distinct types of entrance guards. *Neotropical Entomology*, 40, 55–61.
- Grüter, C., Menezes, C., Imperatriz-Fonseca, V. L., Ratnieks, F. L. W. (2012). A morphologically specialized soldier caste improves colony defense in a neotropical eusocial bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 1182–1186.
- Hall, H. G. (1991). Distinguishing African and European Honeybee Matrilines Using Amplified Mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 4548–4552.

- Hamilton, W. D. (1964). The genetical evolution of social behaviour. *Journal of theoretical biology*, 7, 1–52.
- Hancock, J. M. (1999). Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In D.B. Goldstein, C. Schlotterer (Eds.). *Microsatellites: evolution and applications*. (pp. 1–9). New York: Oxford University Press.
- Harpur, B. A., Minaei, S., Kent, C. F., Zayed, A. (2012). Management increases genetic diversity of honey bees via admixture. *Molecular Ecology*, 21, 4414–4421.
- Harrison, R. G. (1989). Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *TREE*, 4, 6–11.
- Hartl, D. L. and Clark, A. G. (2007). *Principles of Population Genetics* (4th ed., p. 565). Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Hasselmann, M., Gempe, T., Schjøtt, M., Nunes-Silva, C. G., Otte, M., Beye, M. (2008). Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature*, 454, 519–522.
- Heard, T. A. (1994). Behaviour and pollinator efficiency of stingless bees and honey bees on macadamia flowers. *Journal of Apicultural Research*, 33, 191–198.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., deWaard, J. R. (2003). Barcoding animal life: *cytochrome c oxidase* subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 270, S96–S99.
- Hedrick, P. W. (2005). A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 59, 1633–1638.
- Hedrick, P.W., Parker, J. D. (1997). Evolutionary genetics and genetic variation of haplodiploids and x-linked genes. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28, 55–83.
- Heimpel, G.E., de Boer, J. G. (2008). Sex determination in the Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 53, 209–230.
- Heller, R., Siegismund, H. R. (2009). Relationship between three measures of genetic differentiation $G(ST)$, $D(EST)$ and $G'(ST)$: how wrong have we been? *Molecular ecology*, 18, 2080–2083.
- Hemmer, H. (1990). *Domestication: The decline of environmental appreciation*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B. K. (1996). *Molecular systematics. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Hogendoorn, K., Gross, C. L., Sedgley, M., Keller, A. (2006). Increased tomato yield through pollination by native Australian *Amegilla chlorocyanea* (Hymenoptera: Anthophoridae). *Journal of Economic Entomology*, 99, 828–833.
- Hopkins, I. (1914). History of the bumblebee in New Zeland: its introduction and results. *New Zeland Departament for Agriculture Industry and Commerce*, 46, 1–29.
- Howard, W. E. (1960). Innate and environmental dispersal of individual vertebrates. *American Midland Naturalist*, 63, 152–161.
- Hulin, V., Guillon, J. M. (2007). Female philopatry in a heterogeneous environment: ordinary conditions leading to extraordinary ESS sex ratios. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 1–11.

- Imperatriz-Fonseca, V. L., Kleinert-Giovannini, A., Cortopassi-Laurino, M., Ramalho, M. (1984). Hábitos de coleta de *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Boletim de Zoologia da USP*, 8, 115–131.
- Imperatriz-Fonseca, V. L., Matos, E. T., Ferreira, F., Velthuis, H. H. . (1998). A case of multiple mating in stingless bees (Meliponinae). *Insectes Sociaux*, 45, 231–233.
- Inoue, T., Sakagami, S.F., Salmah, S., Yamane, S. (1984). The process of colony multiplication in the Sumatran stingless bee *Trigona (Tetragonula) laeviceps*. *Biotropica*, 16, 100–111.
- Ishtiaq, F., Dutta, S., Yumnam, B., Jhala, Y. V. (2011). Low genetic diversity in the endangered great Indian bustard (*Ardeotis nigriceps*) across India and implications for conservation. *Conservation Genetics*, 12, 857–863.
- Itzá, W. J. M., Quezada-Euán, J. J. G., Medina, L. A. M., Enríquez, E., De la Rúa, P. (2010). Morphometric and genetic differentiation in isolated populations of the endangered Mesoamerican stingless bee *Melipona yucatanica* (Hymenoptera: Apoidea) suggest the existence of a two species complex. *Conservation Genetics*, 11, 2079–2084.
- Jaffé, R., Dietemann, V., Allsopp, M. H., Costa, C., Crewe, R. M., Dall’olio, R., De la Rúa, P., El-Niweiri, M. A. A., Fries, I., Kezic, N., Meusel, M.S., Paxton, R.J., Shaibi, T., Stolle, E., Moritz, R.F.A.. (2010). Estimating the density of honeybee colonies across their natural range to fill the gap in pollinator decline censuses. *Conservation Biology*, 24, 583–593.
- Jaffé, R., Dietemann, V., Crewe, R., Moritz, R. F. A. (2009). Temporal variation in the genetic structure of a drone congregation area: an insight into the population dynamics of wild African honeybees (*Apis mellifera scutellata*). *Molecular Ecology*, 18, 1511–1522.
- Jakobsson, M., Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23, 1801–1806.
- Jazen, D. H. (1980). *Ecologia vegetal nos trópicos*. São Paulo: EDUSP.
- Jones, A. G., Stockwell, C. A., Walker, D., Avise, J. C. (1998). The molecular basis of a microsatellite null allele from the White Sands Pupfis. *Journal of Heredity*, 89, 339–342.
- Jost, L. (2008). GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, 17, 4015–4026.
- Jost, L. (2009). Mismeasuring biological diversity: Response to Hoffmann and Hoffmann (2008). *Ecological Economics*, 68, 925–928.
- Jost, L. (2009). D vs . GST : Response to Heller and Siegmund (2009) and Ryman and Leimar (2009). *Molecular Ecology*, 18, 2088–2091.
- Kalinowski, S. T. (2005). Hp-Rare 1.0: a Computer Program for Performing Rarefaction on Measures of Allelic Richness. *Molecular Ecology Notes*, 5, 187–189.
- Kerr, W. E. (1996). *Biologia e manejo da tiúba: a abelha do Maranhão*. São Luís: EDUFMA.
- Kerr, W. E., Carvalho, G. A., Nascimento, V. A. (1996). *A abelha urucu: biologia, manejo e conservação*. Belo Horizonte: Fundação Acangáu.
- Kimura, M., Crow, J. F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49, 725–738.

- Klein, A.-M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B*, 274, 303–313.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, a, Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X., Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 6196–6200.
- Koling, D. F., Moretto, G. (2010). Mitochondrial discrimination of stingless bees *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini) from Santa Catarina state, Brazil. *Apidologie*, 41, 454–462.
- Komdeur, J., Hatchwell, B. J. (1999). Kin recognition : function and mechanism in avian societies. *TREE*, 14, 237–241.
- Kraus, F. B., Weinhold, S., Moritz, R. F. A. (2008). Genetic structure of drone congregations of the stingless bee *Scaptotrigona mexicana*. *Insectes Sociaux*, 55, 22–27.
- Kremen, C., Williams, N. M., Bugg, R. L., Fay, J. P., Thorp, R. W. (2004). The area requirements of an ecosystem service: crop pollination by native bee communities in California. *Ecology Letters*, 7, 1109–1119.
- Kremen, Claire, Williams, N. M., Thorp, R. W. (2002). Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 16812–16816.
- Lautenbach, S., Seppelt, R., Liebscher, J., Dormann, C. F. (2012). Spatial and temporal trends of global pollination benefit. *PLoS ONE*, 7, e35954.
- Lehmann, T., Hawley, W. A., Frank, H. C. (1996). An evaluation of evolutionary constraints microsatellite loci using null alleles. *Genetics*, 144, 1155–1163.
- Librado, P., Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.
- Lopes, D. M. (2004). *Diversidade e estrutura genética em populações de Melipona rufiventris e Melipona mondury (Hymenoptera : Apidae) por análise de microssatélites*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa.
- Lopes, D. M. (2008). *Análises moleculares em Melipona rufiventris e Melipona mondury (Hymenoptera: Apidae)*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa.
- Lopes, D. M., Oliveira Campos, L. A., Salomão, T. M. F., Tavares, M. G. (2010). Comparative study on the use of specific and heterologous microsatellite primers in the stingless bees *Melipona rufiventris* and *M. mondury* (Hymenoptera, Apidae). *Genetics and molecular biology*, 33, 390–393.
- Lopes, D. M., Silva, F. O., Fernandes-Salomão, T. M., Campos, L. A. O., Tavares, M. G. (2009). Microsatellite loci for the stingless bee *Melipona rufiventris* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology Resources*, 9, 923–925.
- Lopes, D. M., Silva, F. O., Fernandes-Salomão, T. M., Campos, L. A. O., Tavares, M. G. (2010). A scientific note on the characterization of microsatellite loci for *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, 41, 138–140.
- Lye, G. C., Lepais, O., Goulson, D. (2011). Reconstructing demographic events from population genetic data: the introduction of bumblebees to New Zealand. *Molecular Ecology*, 20, 2888–2900.

- Macfarlane, R. P., Gurr, L. (1995). Distribution of bumble bees in New Zealand. *New Zealand Entomologist*, 18, 29–36.
- MacKenzie, K., Javorek, S. (1997). The potential of alfalfa leafcutter bees (*Megachile rotundata* L.) as pollinators of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* L.). *Acta Horticulturae*, 437, 345–352.
- Malagodi-Braga, K.S., Kleinert, A. M. P. (2002). A produção de morangos sob efeito da polinização por jataí (*Tetragonisca angustula*). *Encontro Sobre Abelhas*, 5, 2002. Ribeirão Preto: Anais... Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras.
- Maletzky, A., Mikulicek, P., Franzen, M., Goldschmid, A., Gruber, H.J., Horak, A., Kyek, M. (2008). Hybridization and introgression between two species of crested newts (*Triturus cristatus* and *T. carnifex*) along contact zones in Germany and Austria: morphological and molecular data. *Herpetological Journal*, 18, 1–15.
- Mann, H. B., Whitney, D. R. (1947). On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The Annals of Mathematical Statistics*, 18, 50–60.
- Marino, J., Sillero-Zubiri, C., Johnson, P. J., Macdonald, D. W. (2012). Ecological bases of philopatry and cooperation in Ethiopian wolves. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66, 1005–1015.
- Meixner, M. D., Costa, C., Kryger, P., Hatjina, F., Bouga, M., Ivanova, E., Buchler, R. (2010). Conserving diversity and vitality for honey bee breeding. *Journal of Apicultural Research*, 49, 85–92.
- Michener, C. D. (2000). *The Bees of the World*. Baltimore: The John Hopkins University Press.
- Michener, C. D. (2007). *The Bees of the World* (Second.). Baltimore: The John Hopkins University Press.
- Miorin, P. L., Levy Junior, N. C., Custodio, A. R., Bretz, W. A., Marcucci, M. C. (2003). Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 913–920.
- Moretto, G., Arias, M. C. (2005). Detection of mitochondrial DNA restriction site Differences between the subspecies of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Neotropical Entomology*, 34, 381–385.
- Moritz, R. F. A., Kraus, F. B., Kryger, P., Crewe, R. M. (2007). The size of wild honeybee populations (*Apis mellifera*) and its implications for the conservation of honeybees. *Journal of Insect Conservation*, 11, 391–397.
- Moritz, C., Hillis, D. M. (1996). Molecular systematics: context and controversies. In Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.). *Molecular Systematics*. (pp. 1–13). Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Moritz, C., Dowling, T.E., Brown, W. M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 269–292.
- Moritz, R.F.A., Hawkins, C.F., Crozier, R.H., Mackinlay, A. G. (1986). A mitochondrial DNA polymorphism in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Experientia*, 42, 322–324.
- Moutou, K. A., Mamuris, Z., Firme, T., Kontou, M., Sarafidou, T., Stoumboudi, M. T. (2011). Patterns of variability at the major histocompatibility class I and class II loci in populations of the endangered cyprinid *Ladigesocypris ghigii*. *Conservation Genetics*, 12, 1159–1171.
- Mueller, M. Y., Moritz, R., Kraus, F. B. (2012). Outbreeding and lack of temporal genetic structure in a drone congregation of the neotropical stingless bee *Scaptotrigona mexicana*. *Ecology and evolution*, 2, 1304–1311.

- Muir, W. M., Wong, G-S., Zhang, Y., Wang, J., Groenen, M. A. M., Crooijmans, R. P. M. A., Megens, H-J., Zhange, H., Okimotof, R., Vereijkeng, A., Jungeriusg, A., Albersg, G. A. A., Lawleyh, C. T., Delanyi, M. E., MacEacherne, S., Cheng, H. H. (2008). Genome-wide assessment of worldwide chicken SNP genetic diversity indicates significant absence of rare alleles in commercial breeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 17312–17317.
- Muñoz, I., Dall’Olio, R., Lodesani, M., De la Rúa, P. (2009). Population genetic structure of coastal Croatian honeybees (*Apis mellifera carnica*). *Apidologie*, 40, 617–626.
- Nagamitsu, T., Yamagishi, H. (2009). Nest density, genetic structure, and triploid workers in exotic *Bombus terrestris* populations colonized Japan. *Apidologie*, 40, 429–440.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 3321–3323.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Neigel, J. E. (2002). Is Fst obsolete? *Conservation Genetics*, 3, 167–173.
- Neumann, P., Carreck, N. (2010). Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, 49, 1–6.
- Nogueira-Neto, P. (1954). Notas bionômicas sobre meliponíneos: III – Sobre a enxameagem. *Arquivos do Museu Nacional*, 42, 419–451.
- Nogueira-Neto, P. (1997). *Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão*. São Paulo: Nogueirapis.
- Nyakaana, S. e Arctander, P. (1999). Population genetic structure of the African elephant in Uganda based on variation at mitochondrial and nuclear loci: evidence for male-biased gene flow. *Molecular Ecology*, 8, 1105–1115.
- Oldroyd, B. P. (2007). What’s killing American honey bees? *PLoS Biology*, 5, e168.
- Oldroyd, B. P. (2012). Domestication of honey bees was associated with expansion of genetic diversity. *Molecular Ecology*, 21, 4409–4411.
- Oliveira, E. J. F., Freitas G. S., Fonseca, A. S., Sousa, A. C. B., Campos, T., Assis, A. F., Souza, A. P., Contel, E. P. B., Soares, A. E. E. (2009). Isolation and characterization of microsatellite markers from the stingless bee *Nannotrigona testaceicornes*. *Conservation Genetics Resources*, 1, 97–99.
- Orloci, L. (1978). *Multivariate analysis in vegetation research*. The Hague: Dr W. Junk B. V.
- Oxley, P. R., Hinhumpatch, P., Gloag, R., Oldroyd, B. P. (2010). Genetic evaluation of a novel system for controlled mating of the honeybee, *Apis mellifera*. *The Journal of Heredity*, 101, 334–338.
- Özdil, F., Yildiz, M. A., Hall, H. G. (2009). Molecular characterization of Turkish honey bee populations (*Apis mellifera*) inferred from mitochondrial DNA RFLP and sequence results. *Apidologie*, 40, 570–576.
- Packer, L., Owen, R. E. (2001). Population genetic aspects of pollinator decline. *Conservation Ecology*, 5, 4.
- Page, R. E. (1980). The evolution of multiple mating behavior by honey bee queens (*Apis mellifera* L.). *Genetics*, 96, 263–273.
- Pamilo, P., Varvio-Aho, S-L., Pekkarinen, A. (1978). Low enzyme gene variability in Hymenoptera as a consequence of haplodiploidy. *Hereditas*, 88, 93–99.

- Paxton, R. J. (2000). Genetic structure of colonies and a male aggregation in the stingless bee *Scaptotrigona postica*, as revealed by microsatellite analysis. *Insectes Sociaux*, 47, 63–69.
- Paxton, R. J. (2005). Male mating behaviour and mating systems of bees : an overview. *Apidologie*, 36, 145–156.
- Paxton, R. J., Weibschuh, N., Quezada-Euán, J. J. G. (1999). Characterization of dinucleotide microsatellite loci for stingless bees. *Molecular Ecology*, 8, 690–692.
- Paxton, R. J., Weißschuh, N., Engels, W., Hartfelder, K. (1999). Not only single mating in stingless bees. *Naturwissenschaften*, 86, 143–146.
- Peakall, R. O. D., Smouse, P. E. (2006). Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288–295.
- Pearse, Devon E., Crandall, K. A. (2004). Beyond Fst : Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics*, 5, 585–602.
- Pépin, L., Amigues, Y., Léplinge, A., Berthier, J. L., Bensaid, A., Vaiman, D. (1995). Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity*, 74, 53–61.
- Peters, J. M., Queller, D. C., Imperatriz-Fonseca, V. L., Roubik, D. W., Strassmann, J. E. (1999). Mate number, kin selection and social conflicts in stingless bees and honeybees. *Proceedings of the Royal Society B*, 266, 379–384.
- Peters, J. M., Queller, D. C., Imperatriz-Fonseca, V. L., Strassmann, J. E. (1998). Microsatellite loci for stingless bees. *Molecular Ecology*, 7, 784–787.
- Pietromonaco, S.F., Hessler, R.A., O'brien, T. W. (1986). Evolution of proteins in mammalian cytoplasmic and mitochondrial ribosomes. *Journal of Molecular Evolution*, 24, 110–117.
- Plowright, R. C., Pallet, M. J. (1979). Worker-male conflict an inbreeding in bumblebees (Hymenoptera: Apidae). *The Canadian Entomologist*, 111, 289–294.
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology Evolution*, 25, 345–353.
- Potts, S., Roberts, S., Dean, R., Marris, G., Brown, M., Jones, R., Neumann, P., et al. (2010). Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research*, 49, 15–22.
- Powell J.R., Caccone A., Amato G.D., Yoon, C. (1986). Rates of nucleotide substitution in *Drosophila* mitochondrial DNA and nuclear DNA are similar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 9090–9093.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- Quezada-Euán, J. J. G., Paxton, R. J., Palmer, K. A., Itzá, W. J. M., Tay, W. T., Oldroyd, B. P. (2007). Morphological and molecular characters reveal differentiation in a Neotropical social bee, *Melipona beecheii* (Apidae : Meliponini). *Apidologie*, 38, 247–258.
- Ramírez, S. R., Nieh, J. C., Quental, T. B., Roubik, D. W., Imperatriz-Fonseca, V. L., Pierce, N. E. (2010). A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56, 519–525.

- Rasmussen, C., Camargo, J. M. F. (2008). A molecular phylogeny and the evolution of nest architecture and behavior in *Trigona* s.s. (Hymenoptera : Apidae : Meliponini). *Apidologie*, 39, 102–118.
- Rasmussen, C., Cameron, S. A. (2007). A molecular phylogeny of the Old World stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the non-monophyly of the large genus *Trigona*. *Systematic Entomology*, 32, 26–39.
- Rasmussen, C., Cameron, S. A. (2010). Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99, 206–232.
- Ricketts, T. H., Regetz, J., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., Bogdanski, A., Gemmill-Herren, B., et al. (2008). Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? *Ecology Letters*, 11, 499–515.
- Ridley, J., Kolm, N., Freckelton, R. P., Gage, M. J. G. (2007). An unexpected influence of widely used significance thresholds on the distribution of reported P-values. *Journal of evolutionary biology*, 20, 1082–1089.
- Rosenberg, N. A. (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4, 137–138.
- Ross, K. G. (2001). Molecular ecology of social behaviour: analyses of breeding systems and genetic structure. *Molecular Ecology*, 10, 265–284.
- Ross, K. G., Fletcher, D. J. C. (1986). Diploid male production? a significant colony mortality factor in the fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 19, 283–291.
- Ross, K. G., Vargo, E. L., Keller, L., Trager, J. C. (1993). Effect of a founder event on variation in the genetic sex-determining system of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Genetics*, 135, 843–854.
- Roubik, D. W. (1992). *Ecology and Natural History of Tropical Bees*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rousset, F. (2008). Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103–106.
- Rousset, F., Raymond, M. (1995). Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics*, 140, 1413–1419.
- Ryman, N., Leimar, O. (2009). G_{st} is still a useful measure of genetic differentiation — a comment on Jost 's D. *Molecular Ecology*, 1, 2084–2087.
- Sakaguchi, S., Qiu, Y.-X., Liu, Y.-H., Qi, X.-S., Kim, S.-H., Han, J., Takeuchi, Y., Worth, J. R. P., Yamasaki M., Sakurai, S., Isagi, Y. (2012). Climate oscillation during the Quaternary associated with landscape heterogeneity promoted allopatric lineage divergence of a temperate tree *Kalopanax septemlobus* (Araliaceae) in East Asia. *Molecular ecology*, 21, 3823–3838.
- Santos, C. F. (2012). *Biologia reprodutiva de rainhas e machos de Tetragonisca angustula (Hymenoptera: Meliponini)*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.
- Savolainen, P., Zhang, Y.-P., Luo, J., Lundeberg, J., Leitner, T. (2002). Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*, 298, 1610–1613.
- Schiff, N. M., Sheppard, W. S. (1996). Genetic differentiation in the queen breeding population of the western United States accepted. *Apidologie*, 27, 77–86.
- Schmid-Hempel, P., Schmid-Hempel, R., Brunner, P. C., Seeman, O. D., Allen, G. R. (2007). Invasion success of the bumblebee, *Bombus terrestris*, despite a drastic genetic bottleneck. *Heredity*, 99, 414–422.

- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology*, 18, 233–234.
- Sgariglia, M. A., Vattuone, M. A., Sampietro Vattuone, M. M., Soberón, J. R., Sampietro, D. A. (2010). Properties of honey from *Tetragonisca angustula fiebrigi* and *Plebeia wittmanni* of Argentina. *Apidologie*, 41, 667–675.
- Sheppard, W. S. (1988). Comparative study of enzyme polymorphism in United States and European honey bee (Hymenoptera: Apidae) populations. *Annals of the Entomological Society of America*, 81, 886–889.
- Sheppard, W. S. (2012). Honey bee genetic diversity and breeding – towards the reintroduction of European germplasm. *American Bee Journal*, 152, 155–158.
- Sheppard, W. S., Arias, M. C., Shimanuki, H. (1994). Determination of mitochondrial DNA haplotypes from sting remnants of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Bulletin of Entomological Research*, 84, 551–554.
- Silveira, F. A., Melo, G. A. R., Almeida, E. A. B. (2002). *Abelhas Brasileiras Sistemática e Identificação* (1ª edição.). Belo Horizonte: Fernando A. Silveira.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. E., Flood, 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.
- Slaa, E. J. (2006). Population dynamics of a stingless bee community in the seasonal dry lowlands of Costa Rica. *Insectes Sociaux*, 53, 70–79.
- Smith, B. D. (1995). *The emergence of agriculture*. New York: WH Freeman.
- Sommeijer, M. (1999). Beekeeping with stingless bees: a new type of hive. *Bee World*, 80, 70–79.
- Souza, R. O., Del Lama, M. A., Cervini, M., Mortari, N., Eltz, T., Zimmermann, Y., Bach, C., Brosi, B. J., Suni, S., Quezada-Euan, J. J. E., Paxton, R. J. (2010). Conservation genetics of neotropical pollinators revisited: microsatellite analysis suggests that diploid males are rare in orchid bees. *Evolution*, 64, 3318–3326.
- Stouthamer, R., Luck, R. F., Werren, J. H. (1992). Genetics of sex determination and the improvement of biological control using parasitoids. *Environmental Entomology*, 21, 427–435.
- Strassmann, J.E., Solís, C.R., Peters, J.M., Queller, D. C. (1996). Strategies for finding and using highly polymorphic DNA microsatellite loci for studies of genetic relatedness and pedigrees. In J. D. Ferraris, S. R. Palumbi (Eds.) *Molecular Methods in Zoology and Evolution*. (pp. 163–178, 528–549). New York: Wiley-Liss.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *TREE*, 15, 199–203.
- Szulkin, M., Sheldon, B. C. (2008). Dispersal as a means of inbreeding avoidance in a wild bird population. *Proceedings of the Royal Society B*, 275, 703–711.
- Tavares, M. G., Dias, L. A. S., Borges, A. A., Lopes, D. M., Busse, A. H. P., Costa, R. G., Salomão, T. M. F., Campos, L. A. O. (2007). Genetic divergence between populations of the stingless bee urucu amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais? *Genetics and Molecular Biology*, 30, 667–675.
- Templeton, A. R. (2006). *Population Genetics and Microevolutionary Theory*. St. Louis, Missouri: A John Wiley Sons.

- Terada, Y. (1972). Homenagem a Warwick E. Kerr. In C. da Cruz- Landim, N. I. Hebling, E. de Lello, C.S. Takahashi (Eds.). *Exameagem em Frieseomelitta varia Lep. (Hymenoptera, Apidae)*. (pp. 293–299). Rio Claro.
- Thummajitsakul, S., Klinbunga, S., Sittipraneed, S. (2011). Genetic differentiation of the stingless bee *Tetragonula pagdeni* in Thailand using SSCP analysis of a large subunit of mitochondrial ribosomal DNA. *Biochemical Genetics*, 49, 499–510.
- Valtueña, F. J., Preston, C. D., Kadereit, J. W. (2011). Evolutionary significance of the invasion of introduced populations into the native range of *Meconopsis cambrica*. *Molecular ecology*, 20, 4318–4331.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., Shipley, P. (2004). Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535–538.
- Van Veen, J.W., Sommeijer, M. J. (2000a). Colony reproduction in *Tetragonisca angustula* (Apidae , Meliponini). *Insectes Sociaux*, 47, 70–75.
- Van Veen, J.W., Sommeijer, M. J. (2000b). Observations on gynes and drones around nuptial flights in the stingless bees *Tetragonisca angustula* and *Melipona beecheii* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Apidologie*, 31, 47–54.
- VanEngelsdorp, D., Meixner, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103 Suppl, S80–S95.
- Velthuis, H. W. W. (1997). *Biologia das abelhas sem ferrão*. São Paulo: USP e Universidade de Utrecht.
- Velthuis, H.H.W., Koedam, D., Imperatriz-Fonseca, V. L. (2005). The males of *Melipona* and other stingless bees, and their mothers. *Apidologie*, 36, 169–185.
- Viana, M. V. C., Miranda, E. A., De Francisco, A. K., Carvalho, C. A. L., Waldschmidt, A. M. (2011). Transferability of microsatellite primers developed for stingless bees to four other species of the genus *Melipodoi*:10.4238/2011.November.22.11
- Walsh, P. S., Metzger, D .A., Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10, 506–513.
- Watanabe, M. E. (1994). Pollination worries rise as honey bees decline. *Science*, 265, 1170.
- Weckworth, B. V., Musiani, M., McDevitt, A. D., Hebblewhite, M., Mariani, S. (2012). Reconstruction of caribou evolutionary history in Western North America and its implications for conservation. *Molecular ecology*, 21, 3610–3624.
- Weir, B .S., Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, 38, 1358–1370.
- Whiting, P. W. (1933). Selective fertilization and sex-determination in Hymenoptera. *Science*, 78, 537–538.
- Whiting, P. W. (1943). Multiple Alleles in Complementary Sex Determination of “*Habrobracon*”. *Genetics*, 28, 365–382.
- Wilson, E. O. (1971). *The insects societies*. Cambridge: Belknap. Harvard Univ. Press.
- Wittmann, D. (1985). Aerial defense of the nest by workers of the stingless bee *Trigona (Tetragonisca) angustula* (Latreille). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 16, 111–114.

- Wolstenholme, D. R. (1992). *Animal mitochondrial DNA: structure and evolution*. In: *Mitochondrial genomes. International Review of Cytology 141*. New York: D.R. Wolstenholme and K.W. Jeon Academic Press.
- Woyke, J. (1973). Reproduction in *Apis cerana* 1. Mating behavior. *Journal of Apicultural Research*, 11, 141–146.
- Wright, S. (1922). Coefficients of inbreeding and relationship. *The American naturalist*, 56, 330–338.
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28, 114–128.
- Wright, S. I., Bi, I. V., Schroeder, S. G., Yamasaki, M., Doebley, J. F., McMullen, M. D., Gaut, B. S. (2005). The effects of artificial selection on the maize genome. *Science*, 308, 1310–1314.
- Ximénez, F. (1967). *Historia natural del Reino de Guatemala. (Compuesta por el reverendo padre predicador genera Fray Francisco Ximénez, de la Orden de Predicadores Escrita em el pueblo de Sacapulas en el año de 1722)*. Guatemala: Editorial José de Pineda Ibarra.
- Zamora, O., Dominguez, R., Alaniz-Gutierrez, L., Quezada-Euán, J. J. G. (2008). Frequency of European and African-derived morphotypes and haplotypes in colonies of honey bees (*Apis mellifera*) from NWMexico. *Apidologie*, 39, 388–396.
- Zayed, A. (2009). Bee genetics and conservation. *Apidologie*, 40, 237–262.
- Zayed, A., Packer, L. (2005). Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 10742–10746.
- Zeder, M. A., Emshwiller, E., Smith, B. D., Bradley, D. G. (2006). Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology. *Trends in Genetics*, 22, 139–155.
- Zhai, S.-N., Comes, H.P., Nakamura, K., Yan, H.-F., Qiu, Y.-X. (2012). Late Pleistocene lineage divergence among populations of *Neolitsea sericea* (Lauraceae) across a deep sea-barrier in the Ryukyu Islands. *Journal of Biogeography*, 39, 1347–1360.

10. APÊNDICE

10.1 APÊNDICE A: MATERIAL SUPLEMENTAR DA SEÇÃO RESULTADOS-MICROSSATÉLITES

Apêndice A-1: Tamanho (pb) dos alelos e genótipos formados para cada indivíduo por meliponário e amostras naturais para cada locus de microsatélite amplificado.

Indivíduos	Locus																	
	Tang03		Tang11		Tang12		Tang17		Tang57		Tang60		Tang65		Tang68		Tang70	
PED_01	217	217	200	208	205	219	169	169	204	206	145	145	190	196	245	245	221	225
PED_02	223	225	204	208	205	215	163	163	196	210	147	147	192	196	245	247	223	225
PED_03	217	217	196	210	205	229	169	177	196	210	149	149	196	196	245	245	225	225
PED_04	217	217	184	200	219	221	161	163	198	204	147	155	190	196	249	249	225	225
PED_05	217	217	184	208	205	225	163	177	196	196	147	153	190	190	245	247	225	227
PED_06	217	217	184	192	219	223	163	169	198	206	145	147	190	196	245	247	225	225
PED_07	217	223	192	208	205	219	163	167	196	202	145	147	190	192	245	245	221	225
PED_08	217	223	200	206	199	219	169	177	196	208	145	151	190	192	245	247	221	225
PED_09	217	217	194	196	205	219	161	163	200	204	145	153	190	196	245	245	221	225
PED_10	217	221	184	184	225	227	163	177	200	200	145	147	188	196	245	247	225	225
PED_11	217	217	190	196	215	219	151	163	198	200	145	145	190	196	245	245	221	221
PED_12	217	217	176	182	205	217	159	161	196	198	147	147	190	198	245	247	223	225
PED_13	217	217	184	194	219	221	169	169	208	210	143	147	192	196	245	247	223	225
PED_14	217	229	184	196	221	223	163	177	198	198	147	149	192	196	245	247	221	225

PED_15	217	217	192	210	223	227	161	163	198	204	147	147	196	198	245	245	221	221
PED_16	217	217	200	210	203	219	161	163	198	200	133	151	190	196	245	245	225	225
PED_17	217	217	206	218	219	227	163	163	196	198	145	147	190	192	245	247	221	225
PED_18	217	217	198	198	221	225	161	161	196	204	145	151	182	190	247	247	223	225
PED_19	217	217	198	210	205	219	161	177	198	208	145	147	190	190	245	245	223	225
PED_20	217	217	184	204	205	219	163	169	196	200	141	145	190	196	245	245	221	225
PED_21	219	221	196	202	219	219	169	175	200	202	145	157	196	202	245	247	225	225
PED_22	217	217	192	212	219	219	163	167	198	208	147	149	192	196	245	247	225	225
PED_23	217	229	194	198	219	227	161	171	194	198	133	155	192	196	245	245	221	221
PED_24	217	217	186	196	205	221	163	175	202	208	145	151	188	192	245	245	221	225
PED_25	217	223	190	196	219	223	163	163	196	206	135	145	196	198	245	245	225	225
PED_26	217	217	186	190	205	229	163	169	200	200	141	147	188	196	245	247	221	225
PED_27	217	217	198	210	209	221	161	163	198	198	147	149	190	190	245	245	225	225
PED_28	217	217	184	200	217	219	163	169	198	200	147	149	192	196	245	245	225	225
PED_29	217	223	190	190	217	219	163	163	196	206	145	151	188	192	247	247	221	221
PED_30	217	217	194	208	219	223	165	169	198	198	147	149	190	196	245	245	221	225
PED_31	217	217	186	202	215	225	171	173	202	202	149	149	196	206	247	247	225	225
PED_32	217	217	200	204	219	227	161	165	198	202	145	153	190	190	245	245	221	225
PED_33	217	217	184	200	219	229	163	163	204	204	137	147	190	192	245	245	221	221
PED_34	217	219	186	186	219	223	163	163	200	202	139	141	190	198	247	247	225	225
PED_35	217	217	186	202	221	223	163	175	198	202	139	145	190	196	245	247	221	225
PED_36	217	225	196	208	215	215	169	169	196	208	145	147	192	196	245	245	221	225
PED_37	217	217	200	212	211	225	173	175	198	202	139	147	190	190	245	247	225	225
PED_38	217	217	182	186	227	227	163	175	202	204	141	145	190	190	245	245	225	225
PED_39	217	217	190	194	215	225	161	169	198	206	137	145	196	198	245	247	221	225
PED_40	217	217	196	202	205	205	163	163	198	200	145	151	190	190	245	245	221	225

PED_41	219	223	184	192	219	219	173	173	196	202	143	143	182	192	245	245	221	225
PED_42	217	217	176	200	219	221	163	165	194	198	147	147	192	194	247	247	221	221
PED_43	217	217	196	198	219	229	169	169	198	200	145	145	190	190	247	247	225	225
PED_44	217	217	198	202	225	227	163	169	196	202	145	147	196	196	245	247	223	225
PED_45	217	223	208	210	203	215	163	171	198	200	147	151	192	196	247	247	221	225
PED_46	217	217	202	208	203	205	163	163	198	198	145	147	190	196	245	245	225	225
PED_47	217	217	190	190	219	225	163	163	198	210	145	147	192	196	245	245	221	225
PED_48	217	217	192	194	217	221	163	169	194	206	137	137	190	192	245	247	225	225
PED_49	217	217	190	200	205	219	163	163	196	202	147	147	192	194	245	245	225	225
PED_50	217	217	206	208	215	219	169	171	184	186	145	145	190	196	245	247	225	225
SHE1_01	219	219	182	184	205	205	171	177	158	158	147	149	218	222	247	247	223	223
SHE1_02	219	219	184	186	197	205	169	177	158	158	149	161	202	218	247	247	221	223
SHE1_03	219	219	182	182	205	205	151	153	158	158	147	151	218	226	247	247	221	223
SHE1_04	219	219	184	186	197	205	151	153	154	158	149	149	212	228	247	249	223	223
SHE1_05	219	221	182	184	197	205	153	169	158	206	149	149	202	214	249	249	221	221
SHE1_06	219	219	184	184	197	205	153	159	158	180	147	149	232	236	247	247	223	223
SHE1_07	219	219	182	194	205	205	161	161	158	158	149	149	218	222	249	249	223	223
SHE1_08	219	219	182	184	205	205	153	173	158	158	147	147	224	226	245	247	221	221
SHE1_09	219	221	182	182	205	205	153	161	158	158	149	153	218	222	249	249	223	223
SHE1_10	219	219	180	184	205	221	151	153	158	158	147	147	210	214	247	249	223	223
SHE1_11	219	221	180	182	205	205	153	153	180	180	147	149	210	222	249	249	223	223
SHE1_12	219	219	182	182	205	205	153	153	158	210	147	149	226	228	249	249	221	223
SHE1_13	219	219	184	186	197	205	153	155	158	158	147	149	218	226	247	247	221	223
SHE1_14	219	221	182	184	195	205	153	155	158	158	145	149	218	220	249	249	223	223
SHE1_15	219	221	184	186	205	205	163	175	158	160	149	155	230	236	249	249	221	223
SHE1_16	219	219	182	182	205	205	153	153	158	158	147	161	202	220	249	249	223	223

SHE1_17	221	221	182	182	205	205	153	153	158	158	149	153	200	224	249	249	221	221
SHE1_18	219	219	184	186	205	205	153	153	160	160	147	151	204	222	249	249	223	223
SHE1_19	221	221	186	186	195	205	153	153	158	158	149	153	222	234	247	249	221	223
SHE1_20	219	219	194	196	199	205	153	153	158	180	149	151	206	226	247	249	221	223
SHE1_21	219	221	182	184	205	205	153	163	158	158	149	149	220	224	249	249	223	223
SHE1_22	221	221	182	182	205	207	171	171	158	158	147	149	214	222	247	249	221	223
SHE1_23	219	219	182	182	197	209	153	153	180	182	147	149	220	224	249	249	223	223
SHE1_24	219	219	182	182	205	207	151	171	158	158	147	151	220	222	247	249	223	223
SHE1_25	219	221	182	184	205	207	153	173	158	158	141	143	220	234	249	249	223	223
SHE1_26	219	221	182	182	205	205	151	153	158	182	149	151	222	222	249	249	223	223
SHE1_27	219	219	182	184	197	205	153	173	158	158	149	155	218	222	249	249	223	223
SHE1_28	219	219	182	184	205	205	153	171	158	158	147	149	222	224	249	249	223	225
SHE1_29	219	221	182	184	197	205	153	153	158	158	147	149	222	224	249	249	223	225
SHE1_30	219	219	182	196	197	205	153	155	158	158	147	151	194	216	247	247	223	223
SHE1_31	219	219	182	196	197	205	155	155	158	158	147	149	210	216	249	249	221	223
SHE1_32	219	219	182	184	205	205	151	153	158	158	155	161	226	236	247	251	221	223
SHE1_33	219	219	184	184	199	207	173	175	156	156	149	149	216	216	249	249	221	221
SHE1_34	219	221	184	184	207	211	151	153	156	156	147	149	220	222	249	249	223	223
SHE1_35	219	219	182	190	209	209	153	153	156	156	149	149	202	214	249	249	221	223
SHE1_36	219	219	184	184	199	207	151	155	156	156	145	149	214	234	247	249	221	223
SHE1_37	219	219	182	182	199	211	153	153	156	156	147	149	220	220	249	249	223	223
SHE1_38	219	219	184	184	207	207	153	153	156	156	149	149	218	218	249	249	223	223
SHE1_39	221	221	182	182	207	207	153	155	156	156	147	149	220	220	245	249	221	223
SHE1_40	219	221	180	182	197	199	173	173	156	180	143	151	198	216	247	249	223	223
SHE1_41	219	219	182	182	199	211	153	153	156	156	147	149	202	230	249	249	221	223
SHE1_42	219	219	182	186	199	211	153	153	156	156	149	151	202	202	249	249	221	223

SHE1_43	219	219	182	186	207	209	151	155	156	156	149	153	214	214	247	249	221	221
SHE1_44	219	221	182	184	207	207	153	153	180	180	151	151	216	216	249	249	223	225
SHE1_45	219	219	182	184	207	207	173	175	156	156	149	151	194	220	249	249	223	223
SHE2_01	219	219	182	184	207	207	151	153	156	156	149	151	214	214	249	249	221	223
SHE2_02	219	219	182	182	199	207	151	151	156	180	151	153	220	222	249	249	221	223
SHE2_03	221	221	184	186	199	207	153	153	156	156	149	149	220	226	249	249	221	223
SHE2_04	219	219	182	186	199	207	153	153	156	156	149	151	230	230	247	249	223	223
SHE2_05	219	219	182	184	207	219	153	155	156	180	149	151	220	222	247	249	223	223
SHE2_06	221	221	182	182	207	207	151	153	156	156	149	149	220	228	249	249	221	223
SHE2_07	219	221	182	192	199	207	153	169	154	156	149	149	190	210	249	253	221	223
SHE2_08	219	219	182	182	199	207	169	171	154	156	149	151	224	236	247	249	221	223
SHE2_09	221	221	182	182	207	209	151	153	156	180	149	149	190	222	249	249	221	223
SHE2_10	221	221	184	190	199	199	151	155	156	156	149	149	218	220	249	249	223	223
SHE2_11	219	219	180	184	199	207	153	177	156	180	149	153	194	202	247	249	223	223
SHE2_12	219	219	184	188	207	207	151	151	156	156	149	149	218	220	247	249	223	223
SHE2_13	219	219	186	188	207	207	153	153	154	154	149	149	218	220	249	249	221	223
SHE2_14	219	221	186	190	197	219	151	153	156	156	151	151	216	218	249	249	223	223
SHE2_15	219	225	182	184	207	207	151	155	180	182	149	149	224	228	249	249	221	223
SHE2_16	219	219	182	186	199	207	153	153	156	156	149	149	220	220	249	249	223	223
SHE2_17	219	221	182	182	207	219	153	167	156	156	149	149	220	220	247	249	221	223
SHE2_18	219	221	180	184	199	207	153	153	156	180	149	149	220	226	249	249	223	223
SHE2_19	221	221	182	182	209	209	173	175	156	156	149	149	220	234	247	247	223	223
SHE2_20	219	221	180	182	199	207	151	153	156	156	147	149	220	220	247	249	223	223
SHE2_21	219	221	182	182	199	209	153	153	156	180	149	153	218	226	249	249	223	223
SHE2_22	219	219	180	182	207	207	153	153	156	156	149	149	218	226	249	249	223	223
SHE2_23	221	223	182	192	207	209	151	169	154	156	147	155	190	196	249	249	221	223

SHE2_24	219	219	186	188	207	207	155	155	156	156	149	149	218	226	249	249	223	223
SHE2_25	217	217	180	180	207	207	153	155	154	154	149	153	220	224	249	249	221	223
SHE2_26	219	219	182	184	207	207	153	153	156	202	149	153	192	196	249	249	223	223
SHE2_27	219	219	182	184	207	207	151	153	156	182	151	151	204	220	249	249	223	223
SHE2_28	219	221	180	186	199	207	153	153	156	156	149	149	224	226	249	249	223	223
SHE2_29	219	221	182	184	199	213	153	169	154	156	147	149	198	220	247	249	221	223
SHE2_30	219	219	182	188	207	207	151	155	156	180	153	155	190	218	245	249	223	223
SHE2_31	219	219	180	182	207	207	153	167	156	180	149	149	218	220	247	247	221	223
SHE2_32	219	219	182	184	199	207	153	169	154	180	149	149	198	220	247	249	221	223
SHE2_33	219	221	186	188	199	207	151	153	156	156	149	155	220	226	249	249	223	223
SHE2_34	221	221	182	186	207	207	153	155	156	180	149	153	226	238	247	249	223	223
SHE2_35	221	221	182	184	199	207	153	153	156	202	147	149	190	226	249	249	221	223
SHE2_36	219	219	182	184	207	207	173	177	156	156	151	159	224	230	249	249	223	223
SHE2_37	221	221	182	186	199	207	153	153	180	204	149	149	220	220	249	249	221	223
SHE2_38	221	221	182	184	207	207	153	153	156	202	149	151	220	230	249	249	221	223
SHE2_39	219	219	184	184	207	207	153	153	156	156	147	149	220	224	247	249	221	223
SHE2_40	219	221	184	194	197	199	173	173	156	180	149	153	194	204	249	249	221	223
SHE2_41	217	221	182	184	207	207	153	171	156	156	149	153	194	194	247	247	223	223
SHE2_42	217	219	182	184	207	207	153	171	156	156	147	149	194	194	247	247	223	223
SHE2_43	219	219	182	182	207	213	151	153	180	180	153	153	190	218	247	249	223	223
SHE2_44	219	219	180	184	199	207	151	153	156	156	149	153	220	220	247	249	221	223
SHE2_45	219	219	180	182	197	207	153	153	156	180	149	153	220	226	247	249	223	223
SHE2_46	219	219	182	196	207	207	155	173	156	180	149	153	190	238	245	249	221	223
SHE2_47	219	223	180	184	207	207	151	153	156	156	149	151	220	226	249	249	221	223
SHE2_48	219	219	182	186	207	207	151	155	156	180	149	149	204	212	249	249	221	223
SHE2_49	219	219	182	184	207	207	153	175	156	156	147	149	202	216	249	249	221	221

SHE2_50	219	219	180	182	207	207	153	153	156	156	149	149	218	220	249	249	223	223
MCR1_01	219	219	182	184	205	205	151	151	180	200	147	151	206	224	247	247	223	223
MCR1_02	219	221	184	186	197	205	151	153	158	158	149	149	216	224	249	249	223	223
MCR1_03	219	219	182	194	205	205	153	153	158	158	151	155	222	236	247	249	223	223
MCR1_04	219	219	182	182	205	205	153	153	158	158	149	151	216	226	249	249	221	223
MCR1_05	217	219	182	184	205	207	153	153	158	158	149	153	218	222	249	249	221	223
MCR1_06	219	219	182	194	197	219	151	153	158	158	149	155	222	236	249	249	223	223
MCR1_07	219	219	184	184	205	205	151	173	158	202	149	149	218	220	249	249	221	223
MCR1_08	219	221	182	184	205	205	151	153	158	158	145	151	232	238	249	249	221	223
MCR1_09	219	219	182	186	197	205	153	153	158	158	149	151	220	224	247	249	223	223
MCR1_10	219	219	180	182	205	205	153	153	158	158	147	149	220	226	249	249	221	221
MCR1_11	219	219	186	210	197	205	153	153	158	158	149	151	220	220	247	249	223	223
MCR1_12	219	221	182	184	197	205	153	153	158	158	141	149	218	218	247	249	223	223
MCR1_13	219	221	184	186	205	207	151	153	160	160	145	149	214	224	247	249	221	223
MCR1_14	219	219	182	182	197	207	153	153	158	158	147	149	220	220	249	249	221	223
MCR1_15	217	219	182	184	197	205	151	151	158	180	149	149	226	234	247	247	221	223
MCR1_16	219	219	184	186	205	205	155	173	180	180	149	153	196	218	249	249	223	223
MCR1_17	219	219	182	184	205	205	151	153	158	180	141	149	208	216	249	249	223	223
MCR1_18	219	219	182	184	205	207	155	175	158	180	145	149	194	224	247	247	221	223
MCR1_19	221	221	180	184	205	205	153	153	180	180	147	149	208	220	249	249	221	223
MCR1_20	219	221	180	184	195	205	153	173	180	180	147	149	208	220	247	249	223	223
MCR1_21	219	219	182	182	205	209	153	171	158	158	149	149	220	228	247	251	221	225
MCR1_22	219	225	182	184	205	221	151	153	158	158	145	149	216	226	249	249	221	223
MCR1_23	219	219	182	184	205	205	151	153	180	180	141	149	216	222	249	249	223	223
MCR1_24	219	219	180	184	205	205	151	153	158	158	149	149	196	222	249	249	223	223
MCR1_25	221	221	180	186	205	205	151	173	158	158	139	149	194	224	249	249	223	223

MCR1_26	215	221	182	186	197	205	153	153	158	158	149	151	222	226	247	249	223	223
MCR1_27	219	221	182	182	197	207	151	153	158	180	149	149	216	220	249	249	223	223
MCR1_28	219	221	182	182	205	205	153	153	158	180	149	149	222	224	249	249	223	223
MCR1_29	219	219	182	182	205	207	151	173	158	158	149	151	224	234	249	249	223	225
MCR1_30	219	219	182	184	197	213	151	155	158	198	147	149	206	234	247	249	223	223
MCR1_31	219	219	182	184	197	205	153	153	158	158	149	149	226	230	247	249	221	223
MCR1_32	219	219	182	184	205	205	153	153	180	180	147	149	214	220	247	249	221	223
MCR1_33	219	219	182	182	197	205	153	175	158	158	151	153	206	228	247	249	223	223
MCR1_34	219	219	182	182	205	205	151	153	158	158	149	151	216	226	249	249	221	223
MCR1_35	219	219	182	184	205	219	151	151	180	206	149	149	212	220	247	249	221	223
MCR1_36	219	219	182	182	205	207	153	155	158	158	147	149	218	220	249	249	223	223
MCR1_37	219	219	182	186	197	205	151	153	180	200	147	149	194	202	247	249	223	223
MCR1_38	219	221	182	182	195	197	151	153	180	200	137	153	222	222	249	249	221	223
MCR1_39	219	219	182	186	205	205	153	155	180	180	149	153	196	220	249	249	223	223
MCR1_40	219	219	182	184	197	205	153	173	158	158	149	149	218	220	249	249	221	223
MCR1_41	219	221	180	182	195	205	153	153	158	180	147	149	202	220	249	249	223	223
MCR1_42	219	219	184	196	205	205	151	173	158	158	147	149	224	228	247	249	223	223
MCR1_43	219	219	182	194	197	205	153	153	158	158	147	149	214	224	249	249	221	221
MCR1_44	219	219	184	188	205	209	151	175	158	158	147	151	220	220	249	249	223	223
MCR1_45	219	219	182	184	205	207	153	153	158	158	149	149	194	224	249	249	221	223
MCR2_01	219	221	182	184	197	199	173	173	156	156	149	151	196	196	247	247	221	221
MCR2_02	219	219	182	182	199	207	151	151	156	156	147	153	202	222	247	249	223	225
MCR2_03	219	219	182	184	197	199	153	153	156	156	151	151	216	228	249	249	223	223
MCR2_04	219	219	182	184	199	207	153	153	156	156	147	149	212	216	249	249	223	223
MCR2_05	221	221	182	184	199	207	151	153	156	156	149	149	216	224	249	249	221	223
MCR2_06	219	219	182	184	207	207	171	173	156	206	149	149	198	230	247	249	221	223

MCR2_07	219	219	182	186	207	207	151	153	156	156	151	155	198	216	249	249	221	223
MCR2_08	219	219	186	190	207	209	153	153	156	156	157	157	222	226	249	249	221	221
MCR2_09	219	219	180	182	199	207	151	153	156	156	149	153	218	220	247	249	223	223
MCR2_10	219	219	182	184	199	207	153	153	156	156	149	149	196	216	249	249	221	223
MCR2_11	219	221	182	186	207	207	153	175	156	180	149	155	194	208	249	249	223	223
MCR2_12	219	219	184	184	207	207	153	153	156	156	149	153	202	202	249	249	223	223
MCR2_13	219	219	184	216	207	223	151	153	156	156	145	149	202	218	249	249	223	223
MCR2_14	219	219	184	196	207	207	173	173	156	156	147	161	220	228	249	249	221	223
MCR2_15	219	221	182	184	207	207	153	153	156	156	147	161	222	224	249	249	223	223
MCR2_16	219	221	186	194	207	221	151	151	180	180	147	155	220	220	249	249	221	223
MCR2_17	219	219	184	194	207	207	153	153	180	180	147	151	214	222	247	247	221	223
MCR2_18	219	219	182	182	207	209	153	153	156	156	149	153	202	220	249	249	221	221
MCR2_19	219	221	182	188	207	223	153	153	156	156	149	149	202	226	245	249	221	223
MCR2_20	219	219	184	184	207	207	153	175	156	180	145	151	220	228	249	249	223	223
MCR2_21	219	221	182	186	207	207	151	153	156	156	145	147	224	236	249	249	221	223
MCR2_22	219	221	184	200	207	207	153	153	156	180	143	153	206	206	249	249	221	221
MCR2_23	219	221	182	186	197	199	151	153	156	156	145	149	224	224	247	249	223	223
MCR2_24	219	219	184	184	207	207	153	153	156	182	149	149	222	226	249	249	223	223
MCR2_25	219	219	184	196	207	207	153	153	156	156	147	153	216	220	247	251	223	223
MCR2_26	219	219	182	182	207	207	153	153	156	156	151	151	202	218	247	249	221	223
MCR2_27	219	219	182	198	207	207	151	155	156	156	149	149	206	224	245	249	223	223
MCR2_28	217	219	182	188	209	219	153	177	156	156	147	149	216	230	249	249	223	223
MCR2_29	219	219	184	184	207	207	153	153	156	156	147	153	202	224	249	249	221	223
MCR2_30	219	221	182	184	199	207	153	153	156	156	149	153	220	224	247	249	221	221
MCR2_31	219	221	182	182	199	207	153	153	156	156	149	149	194	194	249	249	223	223
MCR2_32	219	219	182	184	199	199	153	153	156	156	151	151	218	228	249	249	221	223

MCR2_33	219	221	182	186	199	207	153	153	156	156	151	151	216	228	249	249	223	223
MCR2_34	219	221	182	182	197	207	151	153	156	202	149	153	202	224	249	249	221	223
MCR2_35	219	219	182	184	207	207	151	175	156	156	149	149	220	224	245	249	223	223
MCR2_36	219	219	184	196	207	219	153	153	156	156	149	153	220	226	247	249	223	223
MCR2_37	219	221	182	184	207	207	153	153	156	156	149	155	214	222	247	249	223	223
MCR2_38	219	219	184	184	207	209	153	153	156	180	149	151	222	224	249	249	221	223
MCR2_39	219	221	182	184	207	207	153	153	156	156	149	153	208	220	247	247	221	221
MCR2_40	217	217	182	188	207	209	153	171	156	156	149	149	222	224	249	249	223	223
MCR2_41	219	219	182	184	207	207	153	173	156	156	149	149	220	222	247	249	221	223
MCR2_42	219	221	182	186	197	207	151	153	156	180	149	151	194	216	249	249	221	223
MCR2_43	219	219	184	186	207	207	153	153	158	180	149	149	202	202	245	247	221	223
MCR2_44	219	219	182	184	207	207	153	183	156	156	149	149	220	224	247	249	221	221
MCR2_45	219	219	182	216	197	207	153	153	180	180	149	153	196	224	249	249	221	223
MCR2_46	223	223	182	184	199	207	153	153	156	156	149	153	220	224	247	249	221	221
MCR2_47	219	219	182	182	207	207	153	153	156	156	147	149	220	222	249	249	221	223
MCR2_48	219	219	182	182	207	209	153	153	156	156	147	151	220	220	249	249	223	223
MCR2_49	219	221	184	184	207	207	151	151	156	206	149	153	216	222	249	249	221	223
MCR2_50	217	219	182	184	199	205	153	153	156	156	153	153	222	224	249	249	221	223
ERO_01	221	221	184	186	207	207	153	153	156	156	145	147	198	220	247	249	223	223
ERO_02	219	219	184	184	209	209	153	153	156	156	137	153	222	224	249	249	223	223
ERO_03	219	219	182	202	207	207	153	153	156	156	147	153	190	218	249	249	223	223
ERO_04	219	221	182	182	207	207	153	153	156	180	149	149	196	196	247	249	223	223
ERO_05	219	221	182	182	207	207	153	153	156	180	147	149	196	196	249	249	223	223
ERO_06	219	221	182	184	207	207	153	167	156	180	147	149	216	216	247	249	221	223
ERO_07	221	221	182	182	213	221	153	155	156	156	149	163	218	230	249	249	221	223
ERO_08	219	219	182	182	227	227	153	173	180	180	147	147	218	226	249	249	223	223

ERO_09	219	221	182	192	207	207	153	173	156	156	141	149	224	224	249	249	223	223
ERO_10	219	219	182	182	207	221	153	153	156	156	149	149	196	222	249	249	223	223
ERO_11	219	221	182	182	207	207	153	169	156	180	149	149	222	224	249	249	221	223
ERO_12	219	219	182	182	199	207	153	153	180	180	149	149	222	224	247	249	223	223
ERO_13	217	219	182	184	199	207	153	173	156	156	147	153	224	230	249	249	223	223
ERO_14	221	221	182	186	199	207	153	153	156	156	149	153	214	224	249	249	223	223
ERO_15	219	221	182	184	207	207	173	179	180	202	153	155	220	220	249	249	223	223
ERO_16	219	219	182	186	199	207	151	153	156	204	143	149	206	218	247	249	221	223
ERO_17	219	219	182	182	207	221	153	153	156	156	147	149	196	222	249	249	223	223
ERO_18	219	219	182	182	219	221	153	153	156	156	149	149	218	222	249	249	223	223
ERO_19	219	221	182	182	207	209	153	153	156	180	149	149	222	222	249	249	223	223
ERO_20	219	219	182	182	207	209	153	173	156	180	149	149	218	218	249	249	221	223
ERO_21	217	219	182	182	199	207	153	153	156	156	147	149	220	220	249	249	223	223
ERO_22	219	221	182	182	207	207	153	153	156	158	149	153	218	218	247	249	223	223
ERO_23	217	219	182	186	199	207	153	175	156	156	149	149	220	220	249	249	223	223
ERO_24	219	219	182	186	207	207	169	173	156	156	149	151	202	224	249	249	223	223
ERO_25	219	219	182	186	207	207	153	153	156	180	147	151	230	230	249	249	223	223
ERO_26	219	221	184	186	207	207	151	153	156	156	145	151	194	194	249	249	221	223
ERO_27	219	221	180	182	207	209	151	153	156	180	149	149	222	222	249	249	223	223
ERO_28	219	221	182	182	207	209	153	153	156	156	149	149	216	218	249	249	223	223
ERO_29	219	221	182	182	207	207	151	173	156	156	149	153	208	218	249	249	221	223
ERO_30	219	221	182	184	197	199	153	153	156	156	147	147	220	238	247	249	221	223
ERO_31	219	219	182	186	197	199	153	173	156	156	149	149	202	202	249	249	223	225
ERO_32	219	221	186	186	199	207	153	155	156	156	151	153	200	226	249	249	221	223
ERO_33	219	219	180	182	207	207	153	173	156	156	149	149	194	222	247	249	223	223
ERO_34	219	219	184	184	197	207	153	173	156	156	147	149	224	226	249	249	221	223

ERO_35	219	219	182	182	207	207	151	155	156	156	149	153	218	220	249	249	221	223
ERO_36	219	219	182	194	199	207	153	155	156	156	151	153	200	200	247	249	223	223
ERO_37	219	219	182	186	207	207	153	173	156	158	149	149	202	202	249	249	223	223
ERO_38	219	219	186	186	197	199	153	155	156	156	147	149	194	194	249	249	223	223
ERO_39	219	219	184	184	199	207	167	173	156	156	147	151	218	220	249	249	221	223
ERO_40	217	219	180	182	207	207	151	153	156	156	149	153	228	230	249	249	221	221
ERO_41	217	219	182	186	207	207	153	173	156	180	151	153	222	230	249	249	223	223
ERO_42	219	221	182	184	207	207	153	153	156	156	147	149	222	222	249	249	223	223
ERO_43	219	221	182	182	199	207	153	153	156	156	149	149	224	224	249	249	223	223
ERO_44	219	219	182	182	199	207	153	153	156	156	147	149	214	214	249	249	223	223
ERO_45	219	221	182	186	199	219	153	169	156	156	149	149	224	224	249	249	223	223
ERO_46	219	219	180	182	207	207	153	153	156	156	147	153	220	220	249	249	223	223
ERO_47	219	221	182	182	199	207	153	153	156	156	147	149	224	224	249	249	223	223
ERO_48	219	219	180	184	197	207	173	175	156	156	149	153	220	220	249	249	223	223
ERO_49	219	221	182	194	207	207	169	175	156	156	149	155	224	224	249	249	223	223
ERO_50	217	221	182	182	199	209	153	169	156	156	149	149	214	216	249	249	223	223
SMI_01	219	219	182	182	207	207	155	155	156	156	141	149	190	198	247	249	223	223
SMI_02	221	223	182	182	207	209	151	153	156	182	147	151	196	196	249	249	223	223
SMI_03	209	219	182	196	207	207	151	151	156	180	151	151	210	222	249	249	221	223
SMI_04	209	219	184	196	207	207	151	175	156	156	153	153	222	222	249	249	221	223
SMI_05	219	219	182	186	207	207	153	153	156	156	145	145	196	200	249	249	221	221
SMI_06	219	221	182	184	199	207	153	153	156	156	149	149	196	196	249	249	223	223
SMI_07	219	219	182	182	197	207	151	151	156	180	149	149	218	222	249	249	223	223
SMI_08	219	219	182	198	209	211	151	153	156	182	149	155	194	214	249	249	221	223
SMI_09	219	219	182	192	207	207	151	151	156	156	147	149	224	224	247	249	223	223
SMI_10	219	219	182	182	199	199	151	153	156	156	149	151	220	230	247	249	223	225

SMI_11	219	221	182	186	207	219	151	153	156	180	147	151	220	220	249	249	223	223
SMI_12	219	219	182	186	207	209	153	171	156	156	149	149	220	220	247	247	223	223
SMI_13	219	219	182	184	197	209	153	153	156	156	149	151	226	226	247	249	223	223
SMI_14	219	221	182	184	197	207	163	177	156	156	137	145	214	218	249	249	221	223
SMI_15	219	221	182	184	199	207	153	153	156	156	149	149	222	238	249	249	221	223
SMI_16	219	219	182	184	207	207	151	151	156	156	149	153	226	226	247	249	223	223
SMI_17	219	219	184	188	207	207	153	153	156	180	149	149	218	222	247	247	223	223
SMI_18	219	219	184	184	197	207	153	153	156	180	149	151	208	224	247	249	221	223
SMI_19	219	221	184	184	199	207	151	155	156	156	149	149	222	226	249	249	223	223
SMI_20	219	221	184	186	205	207	151	153	180	182	149	149	202	220	247	249	221	223
SMI_21	219	221	184	184	197	207	151	175	156	156	143	151	194	212	247	249	223	223
SMI_22	219	221	184	192	207	211	151	173	156	180	149	155	196	214	249	249	221	223
SMI_23	219	219	182	182	207	207	151	153	156	180	149	149	196	222	249	249	223	223
SMI_24	219	221	182	194	207	211	151	151	156	180	141	151	234	236	247	249	223	223
SMI_25	219	219	182	182	207	207	151	151	156	156	149	151	218	218	249	249	221	223
SMI_26	219	219	184	184	199	207	153	153	156	156	149	153	220	230	249	249	223	225
SMI_27	219	221	182	186	207	207	153	155	156	156	139	149	210	230	249	249	223	223
SMI_28	217	219	182	184	199	207	151	153	156	156	141	149	222	228	247	249	223	223
SMI_29	219	221	184	186	207	207	153	173	156	156	149	149	196	196	247	247	223	223
SMI_30	219	221	186	194	199	207	151	151	156	180	147	149	214	214	247	249	223	223
SMI_31	219	221	184	184	207	207	151	153	156	156	151	161	218	218	249	249	221	223
SMI_32	219	221	184	188	207	207	153	153	156	156	147	151	232	232	249	249	223	223
SMI_33	219	221	182	182	207	207	173	173	156	180	149	149	198	234	247	249	223	223
SMI_34	219	221	182	182	199	207	153	153	156	156	139	149	216	216	249	249	223	223
SMI_35	219	219	182	196	199	207	153	153	156	156	151	155	224	226	249	249	223	223
SMI_36	221	223	184	186	207	207	151	153	156	156	149	149	198	212	249	249	223	223

SMI_37	219	221	182	198	199	207	151	153	156	156	149	149	236	238	249	249	221	223
SMI_38	219	219	184	198	207	207	151	151	156	156	149	155	194	194	249	249	223	223
SMI_39	219	219	182	182	207	207	151	151	156	182	149	151	218	220	249	251	221	223
SMI_40	209	219	182	182	199	199	153	155	156	180	149	149	218	222	249	249	223	223
SMI_41	219	219	186	186	207	207	151	153	156	156	145	147	218	218	249	249	221	223
SMI_42	219	221	182	186	199	199	153	153	156	182	147	147	218	220	249	249	221	223
SMI_43	221	221	182	184	199	207	151	153	156	156	149	149	216	222	249	249	221	223
SMI_44	221	221	182	182	207	207	153	153	180	180	147	149	194	194	249	249	223	223
SMI_45	219	219	182	184	199	207	153	153	156	156	149	149	214	224	249	249	223	223
SMI_46	219	219	182	182	207	207	151	151	156	208	149	155	194	194	247	249	223	223
SMI_47	219	219	182	186	207	207	153	153	156	156	149	149	196	200	249	249	221	223
SMI_48	217	219	182	184	207	207	151	175	156	156	149	149	222	222	249	249	221	223
SMI_49	219	221	182	184	207	207	153	177	156	180	147	149	220	222	249	249	223	223
SMI_50	219	219	184	184	207	207	153	153	180	180	151	151	218	218	249	249	221	223
CUR_01	219	219	182	184	207	207	169	173	156	180	149	161	226	226	249	249	221	221
CUR_02	219	219	182	184	199	207	173	175	156	156	141	149	224	230	249	249	221	221
CUR_03	219	219	182	184	207	207	151	155	156	156	141	147	224	224	249	249	221	223
CUR_04	219	219	184	186	207	209	153	155	156	180	149	161	194	194	249	249	223	223
CUR_05	219	221	182	184	207	207	151	153	156	156	145	151	226	228	249	249	223	225
CUR_06	221	221	182	184	197	207	151	153	156	156	141	149	214	224	249	249	223	223
CUR_07	219	219	182	184	207	207	153	173	156	156	151	157	222	222	249	249	223	223
CUR_08	219	221	182	184	207	207	151	173	156	156	141	147	194	226	249	249	221	223
CUR_09	219	219	184	184	207	209	153	153	156	156	141	149	194	226	249	249	223	223
CUR_10	219	219	184	186	207	207	153	153	156	156	147	149	220	222	249	249	221	221
CUR_11	219	219	182	182	207	209	153	153	156	156	149	151	194	194	249	249	223	223
CUR_12	219	221	184	194	207	209	153	171	156	156	141	149	216	230	249	249	221	223

CUR_13	219	219	184	184	207	207	153	153	156	156	147	147	230	230	247	249	223	223
CUR_14	219	219	184	184	207	207	153	153	156	156	147	149	194	218	247	251	223	223
CUR_15	219	221	182	186	199	209	151	169	156	180	147	149	214	218	249	249	221	223
CUR_16	219	219	184	184	207	207	153	153	156	156	149	149	230	230	247	249	223	223
CUR_17	219	219	182	184	207	207	153	169	156	180	149	149	226	226	249	249	221	223
CUR_18	221	221	182	182	207	209	153	153	156	156	141	149	226	226	249	249	223	223
CUR_19	219	221	182	186	207	223	153	161	156	198	147	149	220	224	245	249	223	225
CUR_20	219	219	182	184	207	207	153	153	156	156	147	151	198	198	249	249	221	223
CUR_21	219	219	182	184	207	207	169	173	156	180	147	161	194	226	249	249	221	223
CUR_22	219	219	182	182	207	209	151	153	156	182	141	149	212	212	247	249	223	223
CUR_23	217	223	182	198	217	225	161	161	186	200	147	161	192	198	245	245	225	225
CUR_24	219	219	184	186	207	209	151	153	156	204	149	149	220	232	249	249	221	221
CUR_25	219	221	182	184	207	223	151	155	156	180	147	151	194	196	245	249	221	223
CUR_26	219	219	182	184	199	207	169	175	156	156	149	149	220	222	249	249	221	223
CUR_27	219	219	182	182	207	207	153	169	156	180	149	153	194	224	249	249	223	223
CUR_28	219	219	184	200	209	223	153	161	156	192	143	147	192	198	245	249	223	223
CUR_29	219	219	190	198	215	215	161	173	200	200	135	149	188	194	245	247	223	225
CUR_30	219	219	182	182	207	207	151	175	156	180	147	149	212	226	249	249	223	223
CUR_31	219	219	182	184	207	207	151	169	156	182	149	155	222	222	249	249	223	223
CUR_32	219	219	182	184	199	207	151	153	156	156	139	147	202	224	249	249	223	223
CUR_33	219	219	182	186	197	207	151	175	156	156	147	151	194	230	249	249	223	223
CUR_34	219	219	182	184	207	209	153	173	156	156	141	143	218	220	249	249	221	223
CUR_35	219	219	182	182	207	207	153	173	156	180	149	153	216	230	249	249	223	223
CUR_36	219	219	182	184	207	209	151	153	156	180	141	141	214	220	249	249	221	223
CUR_37	219	219	182	184	207	211	153	169	156	156	143	145	194	224	249	249	223	223
CUR_38	219	219	184	184	207	209	153	175	156	156	147	149	194	220	249	253	221	223

CUR_39	219	219	184	184	207	207	151	173	156	156	145	149	226	228	249	249	221	223
CUR_40	219	219	184	184	207	209	153	153	156	156	147	149	220	226	249	249	221	223
CUR_41	219	219	184	184	207	207	153	153	156	156	147	149	194	218	247	249	223	223
CUR_42	219	219	182	184	199	207	153	153	156	156	149	151	236	238	249	249	223	223
CUR_43	219	219	182	184	199	207	151	173	156	156	149	149	224	226	249	249	221	223
CUR_44	219	219	182	184	207	207	153	173	156	156	151	155	222	224	249	249	221	223
CUR_45	219	219	182	182	207	207	153	171	156	180	147	149	194	230	249	249	223	223
AMP_01	217	217	184	202	205	225	169	169	196	198	137	149	190	196	245	245	225	227
AMP_02	217	219	176	184	231	231	161	169	204	204	145	151	196	198	245	245	221	221
AMP_03	217	219	188	202	207	219	163	167	198	208	145	153	196	196	245	247	221	225
AMP_04	217	217	184	184	207	219	163	163	198	200	149	153	190	196	245	245	221	225
AMP_05	217	217	190	212	219	223	165	167	200	202	143	147	196	196	245	245	221	225
AMP_06	221	223	192	200	207	227	163	173	194	196	137	151	190	196	245	247	221	225
AMP_07	217	217	200	202	219	225	163	169	202	208	139	151	190	192	245	245	221	225
AMP_08	217	223	200	202	213	223	169	175	198	208	139	139	196	196	245	245	223	223
AMP_09	217	219	186	200	205	221	163	169	196	196	137	145	196	198	245	245	225	225
AMP_10	217	219	176	184	219	225	171	171	198	204	141	145	188	194	245	245	223	225
AMP_11	217	219	184	190	219	223	163	169	194	202	145	149	190	196	245	247	221	225
AMP_12	217	223	186	202	227	227	167	171	200	204	137	145	192	192	247	249	225	227
AMP_13	217	219	184	184	223	227	163	169	194	200	139	155	190	198	245	247	221	225
AMP_14	217	217	190	198	205	221	161	169	180	200	149	151	190	196	247	247	221	221
AMP_15	217	217	184	200	225	229	163	169	198	200	149	151	196	196	245	247	225	225
AMP_16	217	223	204	210	225	229	173	173	202	206	135	151	188	192	245	245	221	223
AMP_17	217	217	196	196	217	227	161	169	204	204	139	141	190	196	245	245	223	225
AMP_18	217	217	184	200	223	227	159	163	196	200	149	151	188	190	245	245	223	225
AMP_19	217	217	184	206	213	219	163	167	196	202	137	147	190	192	245	247	223	227

AMP_20	217	217	184	184	221	225	153	169	200	206	143	149	196	196	245	247	225	225
AMP_21	217	217	186	204	217	221	163	163	194	204	135	149	196	196	245	247	223	225
AMP_22	217	217	184	198	225	225	159	169	196	198	143	147	190	198	245	245	223	225
AMP_23	217	217	196	206	211	223	163	171	202	208	145	153	190	194	245	247	221	225
AMP_24	217	217	198	198	213	225	161	167	198	202	137	155	190	196	245	247	221	225
AMP_25	217	217	192	192	217	219	163	163	196	198	137	145	196	196	245	245	223	227
AMP_26	217	217	182	200	229	233	163	163	198	200	145	155	188	190	245	245	223	225
AMP_27	217	217	190	196	211	221	161	169	210	210	139	155	190	196	245	247	223	225
AMP_28	217	217	184	184	205	223	159	171	204	210	149	153	190	196	245	245	221	221
AMP_29	217	223	200	206	217	219	163	173	196	202	151	151	190	196	245	247	221	223
AMP_30	217	217	196	202	223	225	163	169	196	200	145	151	188	188	245	247	225	225
AMP_31	217	217	192	192	213	229	161	167	196	198	145	151	190	190	245	247	221	225
AMP_32	217	223	194	200	219	223	169	173	202	208	139	147	196	196	245	247	223	225
AMP_33	217	223	184	202	219	221	163	163	194	198	135	151	190	210	245	247	223	225
AMP_34	217	219	200	204	207	231	161	169	196	202	147	149	190	196	245	245	221	225
AMP_35	217	217	194	198	213	229	161	163	196	202	133	147	192	196	245	245	225	225
AMP_36	217	217	192	192	223	223	163	163	196	196	139	151	188	190	245	245	223	225
AMP_37	217	223	188	190	219	221	163	169	202	204	143	143	190	196	245	245	225	225
AMP_38	217	217	200	204	221	221	159	169	196	206	149	149	196	198	245	247	221	221
AMP_39	217	223	186	190	207	217	163	169	196	206	145	145	192	196	245	245	221	225
AMP_40	217	221	184	200	217	231	167	169	198	202	143	145	190	190	247	247	221	225
AMP_41	217	217	194	194	217	219	163	163	196	200	139	143	192	196	245	247	221	225
AMP_42	217	217	184	184	217	219	169	169	194	200	143	149	196	196	245	249	221	225
AMP_43	217	219	198	202	219	221	157	161	196	206	137	151	190	198	245	247	221	223
AMP_44	217	217	184	194	219	227	171	173	196	206	145	153	196	196	245	245	221	225
AMP_45	217	219	184	200	213	219	163	163	198	206	145	151	190	196	245	245	221	221

SSB_01	219	219	182	194	221	225	161	161	202	204	141	141	196	196	249	251	225	225
SSB_02	221	221	204	208	211	225	161	161	198	200	139	145	196	196	249	251	223	225
SSB_03	219	223	182	220	221	225	149	149	198	198	141	153	190	192	251	253	223	225
SSB_04	219	221	196	222	221	225	161	161	202	202	141	151	190	196	249	251	223	223
SSB_05	219	225	192	194	211	229	163	165	198	200	137	141	196	196	249	249	225	225
SSB_06	221	221	182	200	211	211	161	165	200	202	139	145	196	196	249	251	223	225
SSB_07	219	219	194	200	225	227	167	167	192	200	131	161	190	192	249	251	225	225
SSB_08	219	221	182	188	211	217	161	161	200	204	137	141	196	196	249	251	223	225
SSB_09	221	221	182	184	211	227	151	161	192	198	139	147	192	192	249	251	225	227
SSB_10	219	219	182	182	223	225	163	163	194	202	151	153	196	196	249	253	223	225
SSB_11	219	219	182	196	211	211	161	161	200	202	141	153	192	196	249	249	223	223
SSB_12	219	219	196	208	211	223	151	161	196	200	141	151	192	196	249	249	223	225
SSB_13	221	221	192	192	211	221	161	169	192	200	147	153	192	196	249	251	223	223
SSB_14	221	225	180	194	223	223	161	163	200	200	139	143	192	192	249	251	225	225
SSB_15	219	221	192	196	213	225	149	161	192	198	141	161	196	196	249	249	225	227
SSB_16	219	221	190	200	223	225	161	163	196	202	139	153	192	196	251	251	223	225
SSB_17	219	221	182	208	223	229	161	161	200	202	143	155	196	196	249	249	223	225
SSB_18	221	223	190	194	221	225	151	163	180	200	141	163	190	196	251	251	223	225
SSB_19	221	221	200	208	219	221	161	161	200	200	151	155	192	196	249	251	223	225
SSB_20	219	219	198	202	207	211	163	163	180	180	141	141	192	196	249	251	225	225
SSB_21	219	221	200	204	221	223	159	161	198	200	133	153	194	196	249	251	223	225
SSB_22	219	221	184	204	219	221	161	161	186	200	137	139	196	196	251	251	223	223
SSB_23	219	221	198	200	219	225	161	161	200	202	141	147	192	196	249	251	223	225
SSB_24	221	225	182	204	221	227	161	165	180	196	145	161	192	196	251	251	225	225
SSB_25	219	221	184	204	219	223	161	161	186	192	137	139	192	196	249	249	223	223
SSB_26	221	223	182	182	225	231	151	161	192	202	139	139	192	192	251	251	225	225

SSB_27	219	225	194	200	223	223	149	161	198	200	133	141	196	196	249	251	225	225
SSB_28	219	219	182	182	223	225	165	167	194	194	141	153	196	196	249	249	223	225
SSB_29	219	221	190	204	211	221	161	161	192	194	139	141	190	196	249	251	225	225
SSB_30	221	225	180	194	223	223	161	161	192	200	139	153	192	196	249	251	225	225
SSB_31	219	221	194	206	223	225	161	171	200	200	141	151	196	196	249	251	223	225
SSB_32	223	225	182	194	225	225	161	161	198	200	141	145	192	196	249	251	225	225
SSB_33	219	219	180	204	201	227	161	161	186	200	139	153	196	196	249	249	225	225
SSB_34	219	219	192	198	225	227	159	161	196	200	141	141	196	196	249	249	225	225
SSB_35	221	223	182	206	221	225	161	161	194	198	137	139	190	196	249	251	225	225
SSB_36	221	221	182	182	221	223	151	165	200	202	141	141	192	196	249	251	225	225
SSB_37	219	223	182	184	225	227	161	165	192	200	139	145	192	196	249	249	225	225
SSB_38	219	221	182	190	211	225	161	161	200	200	145	163	192	196	249	251	223	225
SSB_39	221	221	182	206	225	227	161	163	192	194	139	141	190	196	249	251	223	225
SSB_40	221	223	182	200	225	225	151	153	200	202	145	145	192	196	249	251	223	225
SSB_41	219	221	180	182	223	233	161	163	200	200	141	145	196	196	249	251	225	225
SSB_42	219	219	184	202	223	223	161	161	200	200	141	153	192	196	249	251	225	225
SSB_43	219	225	182	194	207	211	161	161	200	200	141	143	196	196	251	251	223	225
SSB_44	219	221	204	210	223	225	161	161	200	202	139	145	196	196	251	251	223	223
SSB_45	219	221	194	194	201	219	149	163	194	194	151	153	190	196	249	251	225	227
SSB_46	219	225	202	202	221	225	149	161	192	198	153	153	196	196	251	251	225	225
SSB_47	219	221	204	208	207	215	161	161	200	202	145	155	196	196	249	251	223	225
SSB_48	219	221	198	200	221	223	161	161	198	200	139	153	192	194	249	251	225	225
SSB_49	219	221	202	206	225	225	151	161	200	202	133	145	196	196	249	249	225	225
SSB_50	221	223	190	192	213	223	161	169	186	198	145	149	190	192	249	251	225	225
PNI_01	219	221	186	198	207	221	153	163	198	208	141	149	222	234	249	253	223	225
PNI_02	221	223	184	184	197	207	153	175	158	158	149	149	216	216	253	253	225	225

PNI_03	221	221	182	186	199	207	151	153	158	158	149	149	216	216	253	253	225	225
PNI_04	221	221	184	188	207	207	151	153	158	158	149	149	222	230	251	253	225	225
PNI_05	221	221	184	186	199	207	153	153	158	158	149	155	232	232	253	253	225	225
PNI_06	223	223	182	184	221	225	153	177	158	158	149	149	212	214	253	253	223	225
PNI_07	221	221	184	188	199	221	153	173	204	204	155	157	222	222	253	253	223	225
PNI_08	221	221	182	184	199	207	153	153	158	204	151	151	196	196	253	253	225	225
PNI_09	221	221	182	184	207	209	153	173	158	158	149	149	220	220	253	253	225	227
PNI_10	219	219	198	200	221	225	163	163	202	206	141	149	190	190	249	249	227	227
PNI_11	221	223	182	186	197	199	153	153	158	158	145	149	212	222	253	253	225	225
PNI_12	221	221	182	184	207	209	151	153	158	158	149	149	220	220	253	253	223	225
PNI_13	223	223	184	188	207	207	153	153	158	158	149	149	196	222	253	253	225	225
PNI_14	221	223	182	182	207	211	153	153	158	158	149	149	218	218	251	253	225	225
PNI_15	221	221	184	184	197	207	153	171	158	158	149	151	214	218	251	253	223	225
PNI_16	221	221	184	184	207	207	153	153	158	158	145	149	218	234	251	251	225	225
PNI_17	221	223	182	186	207	207	153	153	158	158	143	159	210	210	253	253	225	225
PNI_18	223	223	188	196	199	209	153	153	158	158	149	155	214	230	251	253	225	227
PNI_19	219	221	182	182	207	207	153	155	158	158	147	149	222	224	253	253	225	229
PNI_20	219	223	182	184	211	221	153	171	158	206	149	149	190	190	249	253	225	227
PNI_21	221	221	182	200	207	207	173	175	158	160	147	149	222	226	251	253	225	225
PNI_22	221	221	182	182	207	207	151	173	200	200	149	153	218	218	253	253	225	227
PNI_23	221	221	184	184	207	209	153	153	158	158	149	153	216	218	253	253	223	225
PNI_24	221	221	182	184	199	207	151	153	180	182	145	151	202	216	253	253	225	225
PNI_25	221	221	182	184	207	207	153	155	158	158	145	149	218	218	251	253	225	225
PNI_26	221	221	182	182	209	223	155	173	158	158	149	151	194	218	253	253	225	225
PNI_27	221	221	182	184	199	207	153	173	158	158	143	147	220	226	249	253	223	225
PNI_28	221	221	182	186	207	223	151	153	158	158	149	151	222	238	251	253	223	225

PNI_29	221	221	184	186	199	207	151	153	158	158	141	153	194	204	251	253	223	225
PNI_30	221	223	182	186	199	199	153	153	158	158	149	149	222	226	251	253	223	225
PNI_31	221	221	182	184	207	209	151	153	158	180	145	149	194	194	253	253	223	225
PNI_32	221	221	182	182	207	209	153	153	158	202	149	151	196	196	253	253	223	225
PNI_33	221	223	182	198	207	207	153	175	158	202	145	149	220	220	253	253	225	225
PNI_34	221	223	182	182	207	211	153	153	158	184	149	149	196	218	251	253	225	225
PNI_35	221	221	182	182	199	207	151	153	180	180	125	149	224	226	253	253	225	225
PNI_36	221	225	182	182	207	207	153	153	158	188	139	149	218	220	253	253	223	225
PNI_37	221	221	182	184	199	207	153	169	180	182	149	149	214	214	251	253	225	225
PNI_38	221	221	182	186	207	207	153	153	158	158	141	149	196	196	251	253	225	225
PNI_39	221	221	186	196	199	207	145	153	158	206	149	149	200	200	251	253	225	225
PNI_40	221	225	166	166	207	209	151	151	158	158	149	153	194	194	253	253	225	225
PNI_41	221	221	184	186	207	209	153	153	158	158	149	149	220	220	253	253	225	227
PNI_42	221	221	182	182	197	207	151	153	158	158	147	147	222	222	251	253	223	225
PNI_43	221	221	182	184	207	207	153	153	158	202	139	151	222	222	253	253	225	225
PNI_44	221	221	184	186	207	209	153	153	158	158	149	149	194	194	253	253	225	227
PNI_45	221	221	182	196	207	207	151	153	158	158	147	151	218	218	253	253	225	225
PNI_46	221	223	182	182	207	207	153	153	158	202	145	155	218	218	253	253	225	225
PNI_47	221	221	182	184	207	207	171	173	158	158	143	149	204	204	253	253	223	225
PNI_48	221	221	182	194	207	207	153	153	158	180	149	151	226	228	253	253	223	225
PNI_49	223	223	184	204	199	207	151	173	158	180	147	147	218	220	253	253	225	225
PNI_50	219	219	184	200	207	223	163	167	198	202	147	149	190	190	249	249	223	227

PED: Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguçu.

Apêndice A-2: Tamanho (pb) e frequência dos alelos encontrados para cada locus por meliponário e amostras naturais.

Locus	Alelos	PED	SHE1	SHE2	MCR1	MCR2	ERO	SMI	CUR	AMP	SSB	PNI
Tang03	N	50	45	50	45	50	50	50	45	45	50	50
	209	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.030	0.000	0.000	0.000	0.000
	215	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	217	0.840	0.000	0.040	0.022	0.040	0.060	0.020	0.011	0.778	0.000	0.000
	219	0.030	0.778	0.630	0.800	0.760	0.680	0.680	0.867	0.100	0.440	0.070
	221	0.020	0.222	0.300	0.156	0.180	0.260	0.250	0.111	0.022	0.400	0.740
	223	0.070	0.000	0.020	0.000	0.020	0.000	0.020	0.011	0.100	0.080	0.170
	225	0.020	0.000	0.010	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.080	0.020
	229	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Tang11	N	50	45	50	45	50	50	50	45	45	50	50
	166	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020
	176	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000
	180	0.000	0.033	0.120	0.067	0.010	0.050	0.000	0.000	0.000	0.040	0.000
	182	0.020	0.489	0.430	0.489	0.420	0.620	0.460	0.422	0.011	0.240	0.420
	184	0.110	0.311	0.230	0.278	0.350	0.140	0.300	0.456	0.244	0.050	0.290
	186	0.070	0.100	0.110	0.100	0.090	0.150	0.120	0.067	0.044	0.000	0.120
	188	0.000	0.000	0.050	0.011	0.030	0.000	0.020	0.000	0.022	0.010	0.040
	190	0.090	0.011	0.020	0.000	0.010	0.000	0.000	0.011	0.067	0.050	0.000
	192	0.060	0.000	0.020	0.000	0.000	0.010	0.020	0.000	0.078	0.060	0.000
	194	0.060	0.022	0.010	0.033	0.020	0.020	0.020	0.011	0.056	0.120	0.010
	196	0.100	0.033	0.010	0.011	0.030	0.000	0.030	0.000	0.056	0.040	0.030
	198	0.070	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.030	0.022	0.067	0.040	0.030
200	0.100	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.011	0.144	0.090	0.030	

	202	0.060	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.089	0.050	0.000
	204	0.030	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.044	0.090	0.010
	206	0.030	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.040	0.000
	208	0.090	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000
	210	0.060	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.010	0.000
	212	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000
	216	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	218	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	220	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000
	222	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000
Tang12	N	50	45	50	45	50	50	50	45	45	50	50
	195	0.000	0.022	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	197	0.000	0.122	0.030	0.178	0.060	0.050	0.050	0.022	0.000	0.000	0.040
	199	0.010	0.078	0.200	0.000	0.150	0.170	0.170	0.067	0.000	0.000	0.150
	201	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000
	203	0.030	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	205	0.150	0.511	0.000	0.633	0.010	0.000	0.010	0.000	0.044	0.000	0.000
	207	0.000	0.167	0.670	0.089	0.670	0.620	0.690	0.678	0.056	0.030	0.580
	209	0.010	0.044	0.050	0.022	0.060	0.070	0.040	0.144	0.000	0.000	0.100
	211	0.010	0.044	0.000	0.000	0.000	0.000	0.030	0.011	0.022	0.140	0.030
	213	0.000	0.000	0.020	0.011	0.000	0.010	0.000	0.000	0.067	0.020	0.000
	215	0.080	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000	0.010	0.000
	217	0.040	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.089	0.010	0.000
	219	0.310	0.000	0.030	0.022	0.020	0.020	0.010	0.000	0.189	0.050	0.000
	221	0.090	0.011	0.000	0.011	0.010	0.040	0.000	0.000	0.111	0.140	0.050
223	0.070	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.033	0.122	0.210	0.030	
225	0.080	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.111	0.260	0.020	

	227	0.080	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.078	0.070	0.000
	229	0.040	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.056	0.020	0.000
	231	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.044	0.010	0.000
	233	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.010	0.000
Tang17	N	50	45	50	45	50	50	50	45	45	50	50
	145	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010
	149	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.060	0.000
	151	0.010	0.100	0.190	0.267	0.160	0.060	0.370	0.167	0.000	0.070	0.140
	153	0.000	0.533	0.520	0.556	0.700	0.640	0.470	0.456	0.011	0.010	0.610
	155	0.000	0.089	0.100	0.056	0.010	0.050	0.050	0.033	0.000	0.000	0.030
	157	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000
	159	0.010	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.044	0.020	0.000
	161	0.120	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.056	0.100	0.610	0.000
	163	0.420	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.344	0.110	0.040
	165	0.030	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.060	0.000
	167	0.020	0.000	0.020	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.078	0.030	0.010
	169	0.200	0.022	0.050	0.000	0.000	0.050	0.000	0.089	0.256	0.020	0.010
	171	0.040	0.056	0.030	0.011	0.020	0.000	0.010	0.022	0.067	0.010	0.030
	173	0.040	0.078	0.050	0.078	0.060	0.140	0.040	0.122	0.067	0.000	0.080
	175	0.050	0.033	0.020	0.033	0.030	0.030	0.030	0.056	0.011	0.000	0.030
177	0.060	0.022	0.020	0.000	0.010	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.010	
179	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
183	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
Tang57	N	50	45	50	45	50	50	50	45	45	50	50
	154	0.000	0.011	0.090	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	156	0.000	0.256	0.670	0.000	0.830	0.820	0.770	0.778	0.000	0.000	0.000
	158	0.000	0.567	0.000	0.667	0.010	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.710

	160	0.000	0.033	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010
	180	0.000	0.089	0.180	0.244	0.120	0.140	0.170	0.122	0.011	0.040	0.070
	182	0.000	0.022	0.020	0.000	0.010	0.000	0.050	0.022	0.000	0.000	0.020
	184	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010
	186	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.040	0.000
	188	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010
	192	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.110	0.000
	194	0.030	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.067	0.080	0.000
	196	0.160	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.222	0.040	0.000
	198	0.280	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.011	0.156	0.130	0.020
	200	0.140	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.033	0.133	0.390	0.020
	202	0.130	0.000	0.030	0.011	0.010	0.010	0.000	0.000	0.144	0.150	0.060
	204	0.080	0.000	0.010	0.000	0.000	0.010	0.000	0.011	0.100	0.020	0.030
	206	0.060	0.011	0.000	0.011	0.020	0.000	0.000	0.000	0.078	0.000	0.030
	208	0.060	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.056	0.000	0.010
210	0.040	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	
Tang60	N	50	45	50	45	50	50	50	45	45	50	50
	125	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010
	131	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000
	133	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.030	0.000
	135	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.033	0.000	0.000
	137	0.040	0.000	0.000	0.011	0.000	0.010	0.010	0.000	0.089	0.050	0.000
	139	0.030	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.020	0.011	0.100	0.170	0.020
	141	0.040	0.011	0.000	0.033	0.000	0.010	0.030	0.122	0.022	0.260	0.040
	143	0.030	0.022	0.000	0.000	0.010	0.010	0.010	0.033	0.089	0.030	0.030
	145	0.300	0.022	0.000	0.044	0.040	0.020	0.040	0.033	0.178	0.130	0.070
	147	0.310	0.256	0.070	0.144	0.120	0.190	0.100	0.222	0.067	0.030	0.090

	149	0.090	0.456	0.630	0.556	0.440	0.520	0.530	0.378	0.144	0.010	0.540
	151	0.070	0.122	0.120	0.122	0.150	0.070	0.160	0.089	0.167	0.060	0.100
	153	0.030	0.044	0.140	0.056	0.160	0.140	0.040	0.022	0.056	0.140	0.040
	155	0.020	0.033	0.030	0.022	0.040	0.020	0.050	0.022	0.044	0.030	0.040
	157	0.010	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.010
	159	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010
	161	0.000	0.033	0.000	0.000	0.020	0.000	0.010	0.044	0.000	0.030	0.000
	163	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000
Tang65	N	50	45	50	45	50	50	50	45	45	50	50
	182	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	188	0.040	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.078	0.000	0.000
	190	0.350	0.000	0.070	0.000	0.000	0.010	0.010	0.000	0.300	0.090	0.060
	192	0.190	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.089	0.260	0.000
	194	0.020	0.022	0.060	0.044	0.040	0.050	0.080	0.178	0.022	0.020	0.080
	196	0.310	0.000	0.020	0.033	0.040	0.060	0.100	0.011	0.433	0.630	0.080
	198	0.050	0.011	0.020	0.000	0.020	0.010	0.030	0.044	0.067	0.000	0.000
	200	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.030	0.020	0.000	0.000	0.000	0.020
	202	0.010	0.078	0.020	0.022	0.110	0.050	0.010	0.011	0.000	0.000	0.010
	204	0.000	0.011	0.030	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.030
	206	0.010	0.011	0.000	0.033	0.030	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	208	0.000	0.000	0.000	0.033	0.020	0.010	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000
	210	0.000	0.033	0.010	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.011	0.000	0.020
	212	0.000	0.011	0.010	0.011	0.010	0.000	0.020	0.033	0.000	0.000	0.020
	214	0.000	0.078	0.020	0.033	0.020	0.040	0.060	0.033	0.000	0.000	0.050
216	0.000	0.078	0.020	0.078	0.100	0.040	0.030	0.022	0.000	0.000	0.060	
218	0.000	0.111	0.110	0.078	0.040	0.130	0.140	0.044	0.000	0.000	0.170	
220	0.000	0.133	0.300	0.211	0.170	0.140	0.100	0.089	0.000	0.000	0.110	

	222	0.000	0.156	0.030	0.100	0.120	0.140	0.140	0.078	0.000	0.000	0.140
	224	0.000	0.067	0.060	0.122	0.160	0.170	0.050	0.111	0.000	0.000	0.020
	226	0.000	0.067	0.110	0.078	0.040	0.030	0.060	0.156	0.000	0.000	0.050
	228	0.000	0.022	0.020	0.033	0.050	0.010	0.010	0.022	0.000	0.000	0.010
	230	0.000	0.022	0.040	0.011	0.020	0.060	0.030	0.100	0.000	0.000	0.020
	232	0.000	0.011	0.000	0.011	0.000	0.000	0.020	0.011	0.000	0.000	0.020
	234	0.000	0.033	0.010	0.033	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.020
	236	0.000	0.033	0.010	0.022	0.010	0.000	0.020	0.011	0.000	0.000	0.000
	238	0.000	0.000	0.020	0.011	0.000	0.010	0.020	0.011	0.000	0.000	0.010
Tang68	N	50	45	50	45	50	50	50	45	45	50	50
	245	0.660	0.022	0.020	0.000	0.040	0.000	0.000	0.067	0.711	0.000	0.000
	247	0.320	0.256	0.220	0.233	0.190	0.090	0.190	0.067	0.267	0.000	0.000
	249	0.020	0.711	0.750	0.756	0.760	0.910	0.800	0.844	0.022	0.520	0.070
	251	0.000	0.011	0.000	0.011	0.010	0.000	0.010	0.011	0.000	0.460	0.160
	253	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.020	0.770
Tang70	N	50	45	50	45	50	50	50	45	45	50	50
	221	0.300	0.278	0.260	0.244	0.370	0.140	0.200	0.267	0.322	0.000	0.000
	223	0.060	0.689	0.740	0.733	0.620	0.850	0.780	0.678	0.189	0.310	0.170
	225	0.630	0.033	0.000	0.022	0.010	0.010	0.020	0.056	0.444	0.660	0.730
	227	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.044	0.030	0.090
	229	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010

N: Tamanho amostral; **PED:** Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

Apêndice A-3: Tamanho amostral (*N*), número de alelos (*Na*), heterozigose observada (*Ho*) e esperada (*He*) para cada locus por meliponário e amostras naturais. Todos os loci foram 100% polimórficos para todos os grupos amostrais.

Grupos amostrais	Locus	N	Na	Ho	He
PED	Tang03	50	6.000	0.260	0.287
	Tang11	50	17.000	0.900	0.924
	Tang12	50	13.000	0.880	0.845
	Tang17	50	11.000	0.680	0.758
	Tang57	50	11.000	0.820	0.843
	Tang60	50	13.000	0.740	0.794
	Tang65	50	9.000	0.800	0.74
	Tang68	50	3.000	0.360	0.462
	Tang70	50	4.000	0.500	0.509
SHE1	Tang03	45	2.000	0.267	0.346
	Tang11	45	7.000	0.600	0.651
	Tang12	45	8.000	0.556	0.685
	Tang17	45	11.000	0.578	0.685
	Tang57	45	8.000	0.200	0.604
	Tang60	45	9.000	0.778	0.707
	Tang65	45	20.000	0.822	0.913
	Tang68	45	4.000	0.267	0.428
	Tang70	45	3.000	0.400	0.447
SHE2	Tang03	50	5.000	0.300	0.511
	Tang11	50	9.000	0.800	0.732
	Tang12	50	6.000	0.500	0.506
	Tang17	50	9.000	0.620	0.676
	Tang57	50	6.000	0.480	0.509
	Tang60	50	6.000	0.540	0.563
	Tang65	50	21.000	0.820	0.867
	Tang68	50	4.000	0.340	0.389
	Tang70	50	2.000	0.480	0.385
MCR1	Tang03	45	5.000	0.289	0.335
	Tang11	45	8.000	0.756	0.668
	Tang12	45	8.000	0.622	0.557
	Tang17	45	6.000	0.578	0.61
	Tang57	45	7.000	0.267	0.494
	Tang60	45	9.000	0.756	0.649
	Tang65	45	19.000	0.889	0.902
	Tang68	45	3.000	0.333	0.375
	Tang70	45	3.000	0.422	0.402
MCR2	Tang03	50	4.000	0.360	0.388
	Tang11	50	11.000	0.740	0.690
	Tang12	50	8.000	0.520	0.520

	Tang17	50	8.000	0.340	0.479
	Tang57	50	6.000	0.200	0.296
	Tang60	50	9.000	0.640	0.740
	Tang65	50	17.000	0.840	0.897
	Tang68	50	4.000	0.320	0.385
	Tang70	50	3.000	0.440	0.479
ERO	Tang03	50	3.000	0.500	0.466
	Tang11	50	7.000	0.500	0.57
	Tang12	50	8.000	0.540	0.577
	Tang17	50	8.000	0.580	0.561
	Tang57	50	5.000	0.260	0.307
	Tang60	50	10.000	0.640	0.668
	Tang65	50	18.000	0.500	0.897
	Tang68	50	2.000	0.180	0.164
	Tang70	50	3.000	0.260	0.258
SMI	Tang03	50	5.000	0.520	0.473
	Tang11	50	8.000	0.620	0.681
	Tang12	50	7.000	0.460	0.490
	Tang17	50	8.000	0.460	0.637
	Tang57	50	4.000	0.360	0.376
	Tang60	50	11.000	0.560	0.676
	Tang65	50	22.000	0.600	0.919
	Tang68	50	3.000	0.280	0.324
	Tang70	50	3.000	0.400	0.351
CUR	Tang03	45	4.000	0.156	0.236
	Tang11	45	7.000	0.667	0.609
	Tang12	45	9.000	0.533	0.513
	Tang17	45	8.000	0.733	0.734
	Tang57	45	8.000	0.378	0.378
	Tang60	45	12.000	0.844	0.780
	Tang65	45	19.000	0.733	0.900
	Tang68	45	5.000	0.222	0.278
	Tang70	45	3.000	0.422	0.466
AMP	Tang03	45	4.000	0.422	0.375
	Tang11	45	16.000	0.756	0.884
	Tang12	45	13.000	0.889	0.896
	Tang17	45	11.000	0.733	0.789
	Tang57	45	10.000	0.889	0.863
	Tang60	45	12.000	0.889	0.883
	Tang65	45	7.000	0.689	0.703
	Tang68	45	3.000	0.467	0.423
	Tang70	45	4.000	0.733	0.661
SSB	Tang03	50	4.000	0.660	0.634
	Tang11	50	17.000	0.860	0.891

	Tang12	50	14.000	0.820	0.839
	Tang17	50	10.000	0.500	0.602
	Tang57	50	9.000	0.760	0.785
	Tang60	50	14.000	0.860	0.856
	Tang65	50	4.000	0.540	0.527
	Tang68	50	3.000	0.620	0.518
	Tang70	50	3.000	0.440	0.467
	Tang03	50	4.000	0.260	0.418
	Tang11	50	10.000	0.700	0.720
	Tang12	50	8.000	0.660	0.625
	Tang17	50	11.000	0.580	0.597
PNI	Tang57	50	12.000	0.360	0.484
	Tang60	50	12.000	0.640	0.679
	Tang65	50	20.000	0.440	0.910
	Tang68	50	3.000	0.340	0.377
	Tang70	50	4.000	0.480	0.430

PED: Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

Apêndice A-4: Número de alelos rarefeito para cada locus por meliponário e amostras naturais.

LÓCUS	PED	SHE1	SHE2	MCR1	MCR2	ERO	SMI	CUR	AMP	SSB	PNI
Tang03	5,972	2,0000	4,8909	5,0000	3,9909	3,0000	4,9811	4,0000	4,0000	4,0000	3,9909
Tang11	16,8712	7,0000	8,7818	8,0000	10,5803	6,7909	7,9712	7,0000	16,0000	16,5998	9,7886
Tang12	12,6992	8,0000	5,9894	8,0000	7,7818	7,8818	6,7992	9,0000	13,0000	13,5720	7,9894
Tang17	10,7901	11,0000	8,9720	6,0000	7,6902	7,8902	7,7901	8,0000	11,0000	9,7811	10,5977
Tang57	10,7992	8,0000	5,8902	7,0000	5,6909	4,7909	3,9000	8,0000	10,0000	8,9907	11,5712
Tang60	12,7795	9,0000	5,8993	9,0000	8,8817	9,5818	10,6901	12,0000	12,0000	13,7872	11,6900
Tang65	8,7818	20,0000	20,4348	19,0000	16,7627	17,3984	21,5341	19,0000	7,0000	3,9909	19,6356
Tang68	2,9909	4,0000	3,8909	3,0000	3,8999	2,0000	2,9000	5,0000	3,0000	2,9909	3,0000
Tang70	3,9000	3,0000	2,0000	3,0000	2,9000	2,9000	2,9909	3,0000	4,0000	2,9993	3,9000

PED: Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

Apêndice A-5: Número de alelos efetivos para cada locus por meliponário e amostras naturais.

LÓCUS	PED	SHE1	SHE2	MCR1	MCR2	ERO	SMI	CUR	AMP	SSB	PNI
Tang03	1,403	1,528	2,045	1,504	1,634	1,874	1,899	1,309	1,599	2,729	1,719
Tang11	13,228	2,868	3,734	3,011	3,226	2,328	3,135	2,557	8,617	9,208	3,574
Tang12	6,443	3,179	2,026	2,258	2,085	2,363	1,960	2,053	9,574	6,219	2,665
Tang17	4,139	3,171	3,090	2,563	1,920	2,277	2,752	3,760	4,731	2,511	2,483
Tang57	6,378	2,523	2,037	1,976	1,420	1,444	1,602	1,608	7,297	4,647	1,938
Tang60	4,854	3,412	2,289	2,846	3,843	3,010	3,088	4,535	8,526	6,935	3,115
Tang65	3,849	11,506	7,519	10,227	9,747	9,728	12,315	9,951	3,369	2,114	11,161
Tang68	1,857	1,749	1,636	1,599	1,625	1,196	1,479	1,385	1,732	2,073	1,604
Tang70	2,038	1,809	1,625	1,672	1,918	1,347	1,541	1,874	2,950	1,878	1,754

PED: Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

Apêndice A-6: Valores *P* (abaixo da diagonal) e valor de *U*₂ (acima da diagonal) obtidos no teste *U* de Mann-Whitney para número médio de alelos rarefeito por locus para todos os pares de amostras.

AMOSTRAS	PED	SHE1	SHE2	MCR1	MCR2	ERO	SMI	CUR	AMP	SSB	PNI
PED		31	26,5	29	27	25	26	33	40	37,5	36,5
SHE1	0,402		35,5	37,0	37,0	32,0	34,0	43,0	48,5	43,5	47,5
SHE2	0,216	0,659		45,0	43,0	38,5	42,0	48,0	51,0	46,0	51,0
MCR1	0,310	0,757	0,691		40,0	33,0	35,0	45,5	49,5	43,0	51
MCR2	0,233	0,757	0,825	0,965		36,5	39,5	47,0	50,0	45,5	51,5
ERO	0,171	0,453	0,860	0,508	0,724		44,5	52,5	53,5	49,0	56,5
SMI	0,200	0,566	0,895	0,627	0,930	0,724		51,0	52,0	47,5	52,5
CUR	0,508	0,825	0,508	0,659	0,566	0,289	0,354		44,5	39,5	43,5
AMP	0,965	0,480	0,354	0,427	0,402	0,251	0,310	0,724		36,0	36,5
SSB	0,791	0,791	0,627	0,825	0,659	0,453	0,536	0,930	0,691		43,5
PNI	0,724	0,536	0,354	0,354	0,331	0,158	0,289	0,791	0,724	0,791	

PED: Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

Apêndice A-7: Valores P (abaixo da diagonal) e valor de U_2 (acima da diagonal) obtidos no teste U de Mann-Whitney para número médio de alelos efetivos para todos os pares de amostras.

AMOSTRAS	PED	SHE1	SHE2	MCR1	MCR2	ERO	SMI	CUR	AMP	SSB	PNI
PED		26	26	25	24	23	24	25	45	41	25
SHE1	0,200		35,0	29,0	34,0	25,0	31,0	35,0	54,0	48,0	35,0
SHE2	0,200	0,627		36,0	34,0	34,0	32,0	38,0	58,0	57,0	41,0
MCR1	0,171	0,310	0,691		38,0	33,0	40,0	38,0	59,0	54,0	47,0
MCR2	0,145	0,566	0,566	0,825		36,0	38,0	39,0	57,0	58,0	46,0
ERO	0,122	0,171	0,566	0,508	0,691		49,0	46,0	61,0	58	52
SMI	0,145	0,402	0,453	0,965	0,825	0,453		40,0	59,0	55,0	46,0
CUR	0,171	0,627	0,825	0,825	0,895	0,627	0,965		57,0	57,0	44,0
AMP	0,691	0,233	0,122	0,102	0,145	0,070	0,102	0,145		32,0	26,0
SSB	0,965	0,508	0,145	0,233	0,122	0,122	0,200	0,145	0,453		27,0
PNI	0,171	0,627	0,965	0,566	0,627	0,310	0,627	0,757	0,200	0,233	

PED: Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2 ; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

Apêndice A-8: Valores *P* e seus erros-padrão (entre parêntesis) obtidos no teste exato de Equilíbrio de Hardy-Weinberg por locus por meliponário e amostras naturais, e global.

Amostras	Lócus									Global
	Tang03	Tang11	Tang12	Tang17	Tang57	Tang60	Tang65	Tang68	Tang70	
PED	0,0734 (±0,0001)	0,4458 (±0,0004)	0,8498 (±0,0002)	0,4918 (±0,0004)	0,6497 (±0,0002)	0,1310 (±0,0003)	0,2241 (±0,0002)	0,0060 (± 0,0000)	0,4038 (±0,0000)	0,0544
SHE1	0,1832 (±0,0000)	0,3975 (±0,0002)	0,0002 (± 0,0000)	0,9817* (±0,0001)	0,0000 (± 0,0000)	0,2347 (±0,0002)	1,0000* (±0,0001)	0,0064 (± 0,0000)	0,4936 (±0,0000)	A.S.
SHE2	0,0023 (± 0,0000)	0,4484 (±0,0003)	0,1796 (±0,0001)	0,1261 (±0,0002)	0,2147 (±0,0002)	0,1871 (±0,0001)	0,6397* (±0,0002)	0,5046 (±0,0000)	0,1404 (±0,0000)	0,0010
MCR1	0,2367 (±0,0001)	0,4132 (±0,0002)	0,8200 (±0,0003)	0,4161 (±0,0002)	0,0000 (± 0,0000)	0,7567 (±0,0003)	0,1650 (±0,0005)	0,2227 (±0,0000)	0,6782 (±0,0000)	0,1239*
MCR2	0,0047 (± 0,0000)	0,3978 (±0,0004)	0,4247 (±0,0000)	0,3734* (±0,0000)	1,0000* (±0,0001)	0,0042 (± 0,0000)	0,0780 (±0,0002)	0,1615 (±0,0000)	0,7181 (±0,0000)	0,0000
ERO	0,9174 (±0,0000)	0,6144 (±0,0002)	0,0049 (± 0,0002)	0,5024 (±0,0003)	0,1967 (±0,0001)	0,3119 (±0,0004)	0,0000 (± 0,0000)	1,0000 (±0,0000)	1,0000 (±0,0000)	A.S.
SMI	0,3324 (±0,0001)	0,8438 (±0,0001)	0,4205 (±0,0003)	0,0929* (±0,0000)	0,7970 (±0,0000)	0,0546 (± 0,0002)	0,0000 (± 0,0000)	0,4755 (±0,0000)	0,7880 (±0,0000)	A.S.
CUR	0,0017 (± 0,0000)	0,2936 (±0,0002)	0,1101 (±0,0003)	0,5933 (±0,0002)	0,0605 (±0,0002)	0,7149 (±0,0004)	0,0013 (± 0,0000)	1,0000* (±0,0001)	0,1269 (±0,0000)	0,0001
AMP	0,4609 (±0,0000)	0,1959* (±0,0001)	0,1654 (±0,0002)	0,1008 (±0,0002)	0,2765 (±0,0002)	0,3254 (±0,0002)	0,1459 (±0,0001)	0,4906 (±0,0000)	0,2582 (±0,0000)	0,5829*
SSB	0,8426 (±0,0000)	0,4760 (±0,0005)	0,2937 (±0,0004)	0,1132 (±0,0003)	0,1178 (±0,0001)	0,6444 (±0,0004)	0,9169 (±0,0000)	0,4040 (±0,0000)	0,4967 (±0,0000)	0,5109
PNI	0,0028 (± 0,0000)	0,1179 (±0,0002)	0,2562 (±0,0002)	0,3968 (±0,0006)	0,0014 (± 0,0000)	0,3844 (±0,0006)	0,0000 (± 0,0000)	1,0000* (±0,0000)	0,4135 (±0,0000)	A.S.

A.S.= Altamente significativo; * Valor *P* após a correção por SGoF, *P*<0,05 em negrito. **PED:** Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguçu.

Apêndice A-9: Valores *P* e seus erros-padrão (entre parêntesis) obtidos no teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, com hipótese alternativa de Deficiência de Heterozigotos, para cada locus por meliponário e amostras naturais, e global.

	Locus									Global
	Tang03	Tang11	Tang12	Tang17	Tang57	Tang60	Tang65	Tang68	Tang70	
PED	0,2871 (±0,0002)	0,2134 (±0,0004)	0,5087 (±0,0004)	0,0575 (±0,0001)	0,2704 (±0,0003)	0,0068 (±0,0000)	0,9046 (±0,0002)	0,0018 (±0,0000)	0,3566 (±0,0000)	0,0025 (±0,0002)
SHE1	0,1180 (±0,0000)	0,1959 (±0,0002)	0,6397* (±0,0001)	0,0067 (±0,0000)	0,0000 (±0,0000)	0,7487 (±0,0003)	0,9817* (±0,0002)	0,0151 (±0,0000)	0,2228 (±0,0000)	0,0000 (±0,0000)
SHE2	0,0069 (±0,0000)	0,8597 (±0,0002)	0,1496 (±0,0001)	0,0943 (±0,0001)	0,1103 (±0,0001)	0,2430 (±0,0001)	0,0045 (±0,0001)	0,1719 (±0,0000)	0,9883 (±0,0000)	0,0005 (±0,0000)
MCR1	0,1661 (±0,0002)	0,9558 (±0,0001)	0,9490 (±0,0001)	0,5270 (±0,0002)	0,0004 (±0,0000)	0,9920 (±0,0001)	0,4147 (±0,0006)	0,2249 (±0,0000)	0,6576 (±0,0000)	0,2676 (±0,0032)
MCR2	0,0006 (±0,0000)	0,8052 (±0,0005)	0,6064 (±0,0003)	0,0086 (±0,0000)	0,0929* (±0,0000)	0,0039 (±0,0000)	0,0058 (±0,0001)	0,1446 (±0,0000)	0,3169 (±0,0000)	0,0000 (±0,0000)
ERO	0,7236 (±0,0000)	0,0681 (±0,0001)	0,0095 (±0,0000)	0,8359 (±0,0002)	0,1290 (±0,0001)	0,5662 (±0,0004)	0,0000 (±0,0000)	1,0000 (±0,0000)	0,6523 (±0,0000)	0,0000 (±0,0000)
SMI	0,8213 (±0,0002)	0,2079 (±0,0002)	0,2618 (±0,0002)	0,0037 (±0,0000)	0,3943 (±0,0000)	0,0053 (±0,0000)	0,0000 (±0,0000)	0,2261 (±0,0000)	0,9087 (±0,0000)	0,0000 (±0,0000)
CUR	0,0151 (±0,0000)	0,8103 (±0,0003)	1,0000* (±0,0001)	0,4143 (±0,0002)	1,0000* (±0,0001)	0,8073 (±0,0004)	0,0003 (±0,0000)	0,0601 (±0,0001)	1,0000* (±0,0000)	0,0001 (±0,0000)
AMP	0,9348 (±0,0000)	0,0037 (±0,0000)	0,1654 (±0,0002)	0,0975 (±0,0002)	0,1490 (±0,0002)	0,4526 (±0,0003)	0,1740 (±0,0001)	0,7895 (±0,0000)	0,8022 (±0,0000)	0,1239* (±0,0004)
SSB	0,7644 (±0,0000)	0,1844 (±0,0004)	0,4078 (±0,0005)	0,0078 (±0,0000)	1,0000* (±0,0001)	0,5876 (±0,0004)	0,6861 (±0,0000)	0,9395 (±0,0000)	0,3133 (±0,0000)	0,5829* (±0,0011)
PNI	0,0061 (±0,0000)	0,3734* (±0,0001)	0,7894 (±0,0002)	0,1285 (±0,0002)	0,0003 (±0,0000)	0,1842 (±0,0003)	0,0000 (±0,0000)	0,1959* (±0,0000)	0,6043 (±0,0000)	0,0000 (±0,0000)

* Valor *P* após a correção por *SGoF*; *P*<0,05 em negrito. **PED**: Pedreira; **SHE1 e 2**: Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2**: Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO**: Entre Rios do Oeste; **SMI**: São Miguel do Iguaçu; **CUR**: Curitiba; **AMP**: Amparo; **SSB**: São Sebastião; **PNI**: Parque Nacional do Iguaçu.

Apêndice A-10: Tamanho (pb) e frequência de alelos privados encontrados para cada locus e meliponário e amostras naturais onde ocorreram.

Grupo amostral	Locus	Alelo	Frequência
PED	Tang03	229	0.020
PED	Tang11	218	0.010
PED	Tang12	203	0.030
PED	Tang65	182	0.020
MCR1	Tang03	215	0.011
MCR2	Tang11	216	0.020
MCR2	Tang17	183	0.010
ERO	Tang17	179	0.010
SMI	Tang03	209	0.030
AMP	Tang17	157	0.011
SSB	Tang11	220	0.010
SSB	Tang11	222	0.010
SSB	Tang12	201	0.020
SSB	Tang17	149	0.060
SSB	Tang60	131	0.010
PNI	Tang11	166	0.020
PNI	Tang17	145	0.010
PNI	Tang57	188	0.010
PNI	Tang60	125	0.010
PNI	Tang70	229	0.010

PED: Pedreira; **MCR1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

Apêndice A-11: Lista de indivíduos que apresentaram um ou mais alelos privados para cada um dos loci amplificados.

Indivíduos	Tang03	Tang11	Tang12	Tang17	Tang57	Tang60	Tang65	Tang68	Tang70									
PED_14	217	229	184	196	221	223	163	177	198	198	147	149	192	196	245	247	221	225
PED_16	217	217	200	210	203	219	161	163	198	200	133	151	190	196	245	245	225	225
PED_17	217	217	206	218	219	227	163	163	196	198	145	147	190	192	245	247	221	225
PED_18	217	217	198	198	221	225	161	161	196	204	145	151	182	190	247	247	223	225
PED_23	217	229	194	198	219	227	161	171	194	198	133	155	192	196	245	245	221	221
PED_41	219	223	184	192	219	219	173	173	196	202	143	143	182	192	245	245	221	225
PED_45	217	223	208	210	203	215	163	171	198	200	147	151	192	196	247	247	221	225
PED_46	217	217	202	208	203	205	163	163	198	198	145	147	190	196	245	245	225	225
MCR1_25	215	221	182	186	197	205	153	153	158	158	149	151	222	226	247	249	223	223
MCR2_13	219	219	184	216	207	223	151	153	156	156	145	149	202	218	249	249	223	223
MCR2_44	219	219	182	184	207	207	153	183	156	156	149	149	220	224	247	249	221	221
MCR2_45	219	219	182	216	197	207	153	153	180	180	149	153	196	224	249	249	221	223
ERO_15	219	221	182	184	207	207	173	179	180	202	153	155	220	220	249	249	223	223
SMI_3	209	219	182	196	207	207	151	151	156	180	151	151	210	222	249	249	221	223
SMI_4	209	219	184	196	207	207	151	175	156	156	153	153	222	222	249	249	221	223
SMI_30	209	219	182	182	199	199	153	155	156	180	149	149	218	222	249	249	223	223
AMP_43	217	219	198	202	219	221	157	161	196	206	137	151	190	198	245	247	221	223
SSB_3	219	223	182	220	221	225	149	149	198	198	141	153	190	192	251	253	223	225
SSB_4	219	221	196	222	221	225	161	161	202	202	141	151	190	196	249	251	223	223
SSB_7	219	219	194	200	225	227	167	167	192	200	131	161	190	192	249	251	225	225
SSB_15	219	221	192	196	213	225	149	161	192	198	141	161	196	196	249	249	225	227
SSB_27	219	225	194	200	223	223	149	161	198	200	133	141	196	196	249	251	225	225
SSB_33	219	219	180	204	201	227	161	161	186	200	139	153	196	196	249	249	225	225
SSB_45	219	221	194	194	201	219	149	163	194	194	151	153	190	196	249	251	225	227
SSB_46	219	225	202	202	221	225	149	161	192	198	153	153	196	196	251	251	225	225

PNI_19	219	221	182	182	207	207	153	155	158	158	147	149	222	224	253	253	225	229
PNI_35	221	221	182	182	199	207	151	153	180	180	125	149	224	226	253	253	225	225
PNI_36	221	225	182	182	207	207	153	153	158	188	139	149	218	220	253	253	223	225
PNI_39	221	221	186	196	199	207	145	153	158	206	149	149	200	200	251	253	225	225
PNI_40	221	225	166	166	207	209	151	151	158	158	149	153	194	194	253	253	225	225

PED: Pedreira; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

Hap 16 A	A	A	A
Hap 17	G	A	A
Hap 18	A	A A
Hap 19	. . G . G A . . T	G	A	A
Hap 20	G A	A A
Hap 21	G A	A
Hap 22	C	A	A
Hap 23	G . T	A	A . T
Hap 24	. G G T G G A	A A . A	A A T T . A G . A G . A G . T . . A . . A G .	
Hap 25	. G G A T G G A	A A . A	A A T T . A G . A G . A G . T C . A . . A G .	
Hap 26	. G G T G G A	A A . A	A A T T . A G . A G . A . . T . . A . . A G .	
Hap 27	A	A A T
Hap 28	. G G T G G G A	A A . A	A A T T . A G . A G . A G . T . . A . . A G .	
Hap 29	. G T T G G A	A A . A	A A T T . A G . A G . A G . T . . A . . A G .	
Hap 30	. G G T G G A	A A . A	A A T T G A G . A G . A G . T . . A . . A G .	
Hap 31	G	A	A
Hap 32	G	A	A . T
Hap 33	. G G T G T G A	A A . A	C A A T T . A G . A G . A G . T . . A . . A G .	
Hap 34 G G	A	A
Hap 35	. G G T G G	A A . A	A A T . A G . A G . A G . T . . A . . A G .	
Hap 36	. G G T T C G G G	A A . A	A A T . A G . A G . A G . T . . A . . A G .	
Hap 37	. G G T G G T A	A A . A	A A T . A G . A G . A G . T . . A . . A G .	
Hap 38	. G T G G A	A A . A	A A T . A G . A G . A . . T . . A . . A . .	
Hap 39	. G G T G G A	A A . A	A A T . A G . A G . A G . T . . A T . A G .	
Hap 40	G	A A . A	A A T . A G . A G . A G . T . . A . . A G .
Hap 41	. G G T G G A	A A . A	A A T . A G . A G . A G . T . . A . . A . .	
Hap 42	. G G T G G A	A A . A	A A T . A G . A G . A G . T . . A . T A G .	
Hap 43	C C C	A A . A	A A G

H27	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020
H28	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020
H29	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020
H30	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.040
H31	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.040
H32	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020
H33	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020
H34	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020
H35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.080
H36	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020
H37	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020
H38	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020
H39	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020
H40	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020
H41	0.000	0.000	0.060	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
H42	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000
H43	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.460	0.000
H44	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.120	0.000
H45	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000
H46	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.220	0.000
H47	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.060	0.000
H48	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000
H49	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000
H50	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000
H51	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.040	0.000
H52	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000

PED: Pedreira; **SHE1 e 2:** Santa Helena 1 e 2; **MRC1 e 2:** Marechal Cândido Rondon 1 e 2; **ERO:** Entre Rios do Oeste; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.

Apêndice B-4: Lista de haplótipos exclusivos e suas frequências por meliponário e amostras naturais.

Grupos amostrais	Haplótipos	Frequência dos Haplótipos
PED	H_15	0.120
PED	H_16	0.100
PED	H_17	0.100
PED	H_18	0.020
PED	H_19	0.020
PED	H_20	0.020
PED	H_21	0.020
PED	H_22	0.020
SHE2	H_41	0.060
MCR1	H_14	0.044

SMI	H_42	0.020
CUR	H_7	0.067
CUR	H_8	0.022
CUR	H_9	0.111
CUR	H_10	0.044
CUR	H_11	0.089
CUR	H_12	0.022
AMP	H_1	0.089
AMP	H_3	0.289
AMP	H_4	0.022
AMP	H_5	0.022
SSB	H_43	0.460
SSB	H_44	0.120
SSB	H_45	0.020
SSB	H_46	0.220
SSB	H_47	0.060
SSB	H_48	0.020
SSB	H_49	0.020
SSB	H_50	0.020
SSB	H_51	0.040
SSB	H_52	0.020
PNI	H_23	0.020
PNI	H_24	0.260
PNI	H_25	0.020
PNI	H_26	0.080
PNI	H_27	0.020
PNI	H_28	0.020
PNI	H_29	0.020
PNI	H_30	0.040
PNI	H_31	0.040
PNI	H_32	0.020
PNI	H_33	0.020
PNI	H_34	0.020
PNI	H_35	0.080
PNI	H_36	0.020
PNI	H_37	0.020
PNI	H_38	0.020
PNI	H_39	0.020
PNI	H_40	0.020

PED: Pedreira; **SHE2:** Santa Helena 2; **MRC1:** Marechal Cândido Rondon 1; **SMI:** São Miguel do Iguaçu; **CUR:** Curitiba; **AMP:** Amparo; **SSB:** São Sebastião; **PNI:** Parque Nacional do Iguaçu.