

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**ESTRUTURA POPULACIONAL, IDENTIFICAÇÃO VIRAL E
ESTUDO DE COMPOSTOS QUÍMICOS CUTICULARES EM
ABELHAS (HYMENOPTERA, APINAE)**

CÂNDIDA BEATRIZ DA SILVA LIMA

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO - 2017**

**ESTRUTURA POPULACIONAL, IDENTIFICAÇÃO VIRAL E
ESTUDO DE COMPOSTOS QUÍMICOS CUTICULARES EM
ABELHAS (HYMENOPTERA, APINAE)**

CÂNDIDA BEATRIZ DA SILVA LIMA

Engenheira Agrônoma

Universidade Estadual do Piauí, 2008

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

Co-orientadora: Dra. Fábiana de Mello Pereira

Co-orientadora: Profa. Dra. Lorena Andrade Nunes

Co-orientador: Prof. Dr. Stephen John Martin

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

FEVEREIRO - 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

L732e

Lima, Cândida Beatriz da Silva.

Estrutura populacional, identificação viral e estudo de compostos químicos cuticulares em abelhas (Hymenoptera, A pinae) / Cândida Beatriz da Silva Lima. – Cruz das Almas, BA, 2017.

119f.; il.

Orientador: Carlos Alfredo Lopes de Carvalho.

Coorientadora: Fábria de Mello Pereira.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Abelhas sem ferrão – Biologia. 2.Abelhas sem ferrão – Morfometria geométrica. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Nunes, Lorena Andrade. III.Martin, Stephen John. IV.Título.

CDD: 638.1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**ESTRUTURA POPULACIONAL, IDENTIFICAÇÃO VIRAL E
ESTUDO DE COMPOSTOS QUÍMICOS CUTICULARES EM
ABELHAS (HYMENOPTERA, APINAE)**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE
Cândida Beatriz da Silva Lima**

Realizada em 17 de Fevereiro de 2017

Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB
Examinador Interno (Orientador)

Prof. Dr. Bruno de Almeida Souza
Embrapa Meio Norte / Embrapa
Examinador Externo

Prof. Dr. Edilson Divino de Araújo
Universidade Federal de Sergipe / UFS
Examinador Externo

Dra. Elizabeth Amélia Alves Duarte
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB
Examinador Externo

Prof. Dr. Fábio Santos do Nascimento
Universidade de São Paulo / USP
Examinador Externo

Dra. Maria Emilene Correia de Oliveira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

A todos que usam a luz e o amor para ajudar na evolução da humanidade.

EPÍGRAFE

“Você pode dizer que eu sou um sonhador, mas eu não sou o único!”

“You can say I'm a dreamer, but I'm not the only one!”

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Soberano Deus, pelo dom da vida, sabedoria e força em todos os momentos, por me mostrar que o caminho guiado por Ele sempre é o melhor a seguir.

Ao Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho, mais que orientador, foi incentivador e amigo. Sempre com sua orientação, amizade, compreensão, confiança me incentivou muito nessa caminhada.

Ao Prof. Dr. Stephen Jonh Martin, que foi orientador, incentivador e proporcionou muitas oportunidades de novos conhecimentos, que me ensinou o que é ser um pesquisador, me mostrou o que eu realmente quero ser depois daqui. Às Co-orientadoras Dra. Lorena Andrade Nunes e Dra. Fábria de Mello, por contribuírem com seu conhecimento.

Ao Dr. Bruno de Almeida Souza, por toda ajuda na localização dos criadores de abelhas no Estado do Piauí e toda a ajuda no processo de coleta das amostras.

À todos os criadores de abelhas que contribuíram permitindo a coleta das abelhas para a realização deste trabalho.

À todos os funcionários da UFRB, todos vocês são fundamentais na nossa formação.

Às companheiras de trabalho Laura Brettell e Jessica Kevill, por compartilharem comigo conhecimentos, aprendizados, amizade, momentos de descontração e acima de tudo a simplicidade e união do verdadeiro trabalho em equipe, à todos da University of Salford por todo carinho e receptividade comigo, e em especial a Maria Emilene Correia (sempre Emi), por tudo, apoio, carinho, receptividade, enfim, por ter estado comigo “do outro lado do mundo”.

A minha família, minha Lúcia, por me mostrar sempre uma fortaleza, ao meu irmão Lúcio e à minha cunhada Mayra por todo apoio, amor, carinho, confiança e união em todos os momentos das nossas vidas e ao meu pai Carlos Valfredo, que virou estrela e estará sempre a brilhar lá no céu para me iluminar. À minha Maria por mesmo tão pequena ter me ensinado um sentido diferente da vida. A minha tia Socorro, meu anjinho da guarda e sua família linda (tio Ricardo, Vini e Gui) por todo carinho.

Ao Dr. Cherre Sade, muito mais que amigo, foi certamente um dos maiores incentivadores para minha jornada de um ano “do outro lado do mundo”. Sua amizade e contribuição com o meu trabalho é imensurável, muito obrigada por tudo. À Dra. Márcia de Fátima Ribeiro, sempre orientando, sempre sendo amiga, sempre por perto mesmo na distância geográfica.

À prima Gisela, por me amparar nos momentos difíceis e comemorar comigo nos momentos de alegria e aos tios Alice, Gabriel, Jussara e Cláudio por todo carinho, atenção, força de sempre, sem medir distância.

À minha abelhuda favorita, Fran, obrigada por toda admiração, por compartilhar comigo tantos momentos e por ser minha amiga, obrigada por tudo!

Aos companheiros do Leo Club Cruz das Almas, muito mais que companheiros, amigos, que levarei para toda vida, para sempre minha família, em especial Thami e Tiga.

Ao Alex Farrell, um amigo, um companheiro, um presente de Deus. Obrigada por ter me proporcionado os melhores momentos da minha vida. Thank you my love! À minha nova família “my Eglesh Family”, por se preocuparem comigo e com meu trabalho. Por me ensinarem tanto da vida.

À “Família Lima”, a confiança de vocês me motivou a cada segundo.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo de Doutorado no Brasil via Projeto CAPES/EMBRABA Edital 15/2014 (Proposta 209) - Embrapa Meio Norte. Ao CNPq (MEC/MCTI/CAPES/CNPQ/FAPS - BOLSA PESQUISADOR VISITANTE ESPECIAL - PVE 2014) pela concessão da bolsa de estudo de Doutorado Sanduiche na Inglaterra (200315/2015-3) e Suporte financeiro (400425/2014-9). À EMBRAPA Meio Norte por todo apoio e compreensão no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Grupo Insecta, por todo aprendizado adquirido nessa jornada, por toda a ajuda e amizade incansável e resistente a muitos tropeços. Um agradecimento especial ao José Maria que virou estrela, com certeza, agora está feliz com a realização de cada um de nós. Ele nos deixou aprendizados e muita saudade.

A cada um que vibrou e me incentivou nessa jornada todos os dias, muitas vezes até, sem entender o sentido, mas feliz por mim.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

REFERENCIAL TEÓRICO.....01

ARTIGO 1

IDENTIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES ISOLADAS DE *Melipona subnitida* DUCKE, 1910 (APIDAE: MELIPONINI) EM SUA ÁREA DE OCORRÊNCIA NATURAL.....42

ARTIGO 2

CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL DE *Melipona fasciculata* SMITH, 1854 (HYMENOPTERA, APIDAE) NA REGIÃO MEIO NORTE DO BRASIL.....60

ARTIGO 3

HIDROCARBONETOS CUTICULARES NO RECONHECIMENTO DE ESPÉCIES E DE COLÔNIAS DE *Melipona* spp. (HYMENOPTERA: MELIPONINI).....76

ARTIGO 4

DETECÇÃO DO VÍRUS DEFORMADOR DE ASAS DE *Melipona fasciculata* E *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE) NA REGIÃO MEIO NORTE DO BRASIL.....97

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....108

ESTRUTURA POPULACIONAL, IDENTIFICAÇÃO VIRAL E ESTUDO DE COMPOSTOS QUÍMICOS CUTICULARES EM ABELHAS (HYMENOPTERA, APINAE)

Autora: Cândida Beatriz da Silva Lima

Orientador: Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

RESUMO: As abelhas formam um dos mais importantes grupos de polinizadores e suas populações estão sofrendo declínio nos últimos anos. Vários fatores são apontados como causadores desse fenômeno, sendo a perda da diversidade de populações e o acometimento da saúde dos enxames de abelhas alguns destes. Com a finalidade de contribuir para o entendimento desses fatores, este trabalho objetivou avaliar e caracterizar populações de *Melipona subnitida* do Nordeste brasileiro e *M. fasciculata* do Estado do Piauí, pesquisar a presença do vírus deformador das asas das abelhas (DWV) em populações de *M. fasciculata* e *Apis mellifera* residentes nesse Estado e caracterizar o perfil de hidrocarbonetos em espécies do gênero *Melipona*. As populações de *M. subnitida* do estado do Piauí apresentaram divergência na forma e tamanho de asa em relação às populações dos demais Estados. As populações de *M. fasciculata* apresentaram variação entre forma e tamanho. A presença do vírus DWV foi detectada em todas as amostras de *M. fasciculata* e *A. mellifera* do estado do Piauí. Os resultados de perfis de hidrocarbonetos cuticulares mostraram diferenças entre as espécies do gênero *Melipona* estudadas, confirmando que usam diferentes componentes químicos como auxiliares em suas principais atividades. Esses resultados contribuem com novos conhecimentos sobre essas espécies, fornecendo subsídios importantes à conscientização quanto a preservação de habitats naturais, incentivo e educação para criação racional dessas abelhas.

Palavras-chave: Morfometria geométrica, desordem do colapso da colônia, abelhas-sem-ferrão, DWV, hidrocarboneto cuticular.

POPULATION STRUCTURE, VIRAL IDENTIFICATION AND STUDY OF CUTICULAR CHEMICAL COMPOUNDS IN BEES (HYMENOPTERA, APINAE)

Author: Cândida Beatriz da Silva Lima

Adviser: Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

ABSTRACT: Bees form one of the most important groups of pollinators and their populations are declining in recent years. Several factors are pointed out as causing this phenomenon, being the loss of diversity of populations and the health effect of some bee swarms. In order to contribute to the understanding of these factors, this work aimed to evaluate and characterize the populations of *Melipona subnitida* of the Brazilian Northeast and *M. fasciculata* of the State of Piauí, to investigate the presence of the virus of the wings of bees (DWV) in populations of *M. Fasciculata* and *Apis mellifera* resident in that State and characterize the hydrocarbon profile in species of the genus *Melipona*. The populations of *M. subnitida* of the state of Piauí presented divergence in the form and size of the wing in relation to the populations of the other States. The populations of *M. fasciculata* presented variation between form and size. The presence of DWV virus was detected in all samples of *M. fasciculata* and *A. mellifera* from the state of Piauí. The results of cuticular hydrocarbon profiles showed differences among the species of the genus *Melipona* studied, confirming that they use different chemical components as auxiliaries in their main activities. These results may contribute to the understanding of populations of the species studied, providing important insights on the conservation of natural habitats, incentive, and education for rational breeding of bee species.

Keywords: Geometric morphometrics, Colony Collapse Disorder, stingless bees, DWV, cuticular hydrocarbon.

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Importância das abelhas na polinização

A produção agrícola em países desenvolvidos é formada por 80% de espécies dependentes da polinização, quando comparada a produção em países em desenvolvimento (GARIBALDI et al., 2016). Estima-se que 5% a 8% da produção de culturas seja diretamente atribuída à polinização animal com um valor de mercado anual de US\$ 235 milhões a US\$ 577 milhões (FAO, 2014) (valor ajustado em dólares em 2015) em todo o mundo (LAUTENBACH et al., 2012).

A ação prestada pelos polinizadores é fundamental para conservação ambiental e para produção agrícola (BIESMEIJER et al., 2006; POTTS et al., 2010). Cerca de 75% da alimentação humana depende de plantas beneficiadas pela polinização (GARIBALDI et al., 2016). Entre os principais polinizadores bióticos encontram-se as abelhas, estas são responsáveis por cerca de 80% da polinização de plantas do grupo das angiospermas (OLLERTON et al., 2011).

O uso de abelhas como polinizadores de importância agrícola passou a ser explorado, no século XX, na América do Norte, onde as práticas agrícolas estavam em grande desenvolvimento (McGREGOR, 1976). Estudos que contribuísssem para o esclarecimento sobre a viabilidade do uso de abelhas solitárias para polinização de alfafa, maçã e amêndoas (PITTS-SINGER e CANE, 2011) também foram desenvolvidos nos Estados Unidos.

As interações entre planta e polinizador envolvem ganhos mútuos: os animais (polinizadores) coletam alimentos, principalmente pólen e néctar, e em contrapartida contribuem para a reprodução das plantas, formando frutos e sementes. Estima-se que aproximadamente 300.000 espécies de plantas são beneficiadas com o serviço de polinização (OLLERTON et al., 2011).

O papel das abelhas como polinizadoras na agricultura tem sido mais evidenciado nas últimas décadas, principalmente nos Estados Unidos e Canadá, com a viabilização do uso de outras abelhas, como por exemplo as solitárias, para polinização de alfafa, maçã e amêndoas (PITTS-SINGER e CANE, 2011).

As abelhas, principais polinizadores da maioria das culturas agrícolas e silvestres, podem ter suas populações prejudicadas por inúmeros fatores (FREITAS et al., 2009). A perda de habitat vem sendo apontada como um desses causadores do decréscimo de populações, a exemplo no Hemisfério Norte e Europeu, onde um declínio de populações de abelhas já foi evidenciado (POTTS et al., 2010).

As abelhas tem sofrido um declínio considerável em suas populações em todo o mundo, estando associado a vários fatores relevantes como, o uso indiscriminado de produtos químicos fitossanitários em culturas agrícolas, o manejo inadequado das colônias, abandono de apiários por parte dos apicultores e o aparecimento de doenças causadas por patógenos e parasitas (AIZEN et al., 2009; POTTS et al., 2010).

Estudos relatam que populações de *Apis mellifera* (principais polinizadores manejáveis) estão crescendo em ritmos mais lentos do que o necessário para os serviços prestados por elas (AIZEN et al., 2009; GARIBALDI et al., 2011; BECHER et al., 2014), sendo o mesmo constatado para populações de abelhas nativas (CAMERON et al., 2011; UEIRA-VIEIRA et al., 2015; LOS SANTOS et al., 2016).

O declínio das populações silvestres de polinizadores está associado a vários fatores, com destaque para a perda e fragmentação de habitats naturais (POTTS et al., 2010). Associadas aos declínios das populações de abelhas silvestres na última década, mortalidade sucessivas de colônias manejadas de *A. mellifera* tem sido registradas nos Estados Unidos (VANENGELSDORP et al., 2007, 2008, 2010, 2011), e em alguns países da Europa (LAURENT et al., 2015).

Os principais fatores que tem sido associado a esse declínio são estresses causados por patógenos, manejo inadequado das colônias, práticas agrícolas agressivas com o uso indiscriminado de agrotóxicos, má nutrição das abelhas, competição por recursos com espécies invasoras e a combinação entre estes fatores (VANENGELSDORP et al., 2009; MAUÉS et al., 2012).

Programas oficiais de levantamento sistemático da sanidade apícola, associados a pesquisas com foco nas avaliações dos possíveis impactos da fragmentação de habitats e das práticas agrícolas sobre as comunidades de abelhas devem ser implementados com urgência para que se conheçam as

causas de enfraquecimentos e perdas de colônias de abelhas (PIRES et al., 2016).

2. Abelhas sociais

As abelhas sociais destacam-se pelo hábito de viverem formando colônias constituídas normalmente por uma rainha, que é responsável pela postura de ovos e coesão da colônia pela liberação de feromônios, por dezenas de machos, cuja função é a fecundação da rainha e centenas de operárias, as quais desempenham funções de construção e manutenção da colônia, coleta e processamento de alimento, cuidados com a cria e defesa da colônia (NOGUEIRA-NETO, 1997; MICHENER, 2000). Nesse grupo destacam-se as abelhas eussociais, reunidas nas tribos Apini e Meliponini (MOURE, 2012; CAMARGO e PEDRO, 2013), que se caracterizam pela formação de ninhos perenes, além das demais características acima citadas.

Apini possui um único gênero, *Apis*, composto por 11 espécies que apresentam tamanho médio entre 1,2cm a 1,3cm, formam seus ninhos expostos ou em cavidades pré-existentes e no Brasil está representada por uma espécie, a *A. mellifera* (SILVEIRA et al., 2002).

Meliponini reúne as abelhas-sem-ferrão e suas espécies estão distribuídas em 60 gêneros (MICHENER, 2000; SILVEIRA et al., 2002; RASMUSSEN e CAMERON, 2010). Caracterizam-se por apresentarem tamanho que varia de 0,6cm a 1,5cm, seus ninhos são construídos em cavidades pré-existentes (ninhas abandonados de cupins e formigas, ocos de árvores, etc.) ou ninhos expostos (SILVEIRA et al., 2002, CARVALHO et al., 2014).

A espécie *A. mellifera* é apontada como polinizador de importância mundial (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012) destacando-se como um dos mais efetivos polinizadores e com maior número de interações com plantas (KLEIN et al., 2007). Em abelhas do gênero *Melipona* os serviços de polinização tem demonstrado potencial em diversas culturas, e principalmente em polinização por vibração (NUNES-SILVA et al., 2010).

2.1. *Apis mellifera* Linnaeus, 1758

Apis mellifera é representada por 10 subespécies na Europa, 12 subespécies na África e sete subespécies na Ásia (ALATTAL et al., 2014). As subespécies de *A. mellifera* apresentam características comportamentais e morfológicas diferentes (TOFILSKI, 2008), caracterizam-se por viverem em colônias numerosas, e devido aos interesses econômicos elas são consideradas como as “rainhas dos insetos” (WINSTON, 1991).

No Brasil, *A. mellifera* é um polihíbrido formado pelas subespécies europeias (*A. mellifera mellifera*, *A. mellifera ligustica*, *A. mellifera caucasica* e *A. mellifera carnica*) e africana (*A. mellifera scutellata*) (RANGEL et al., 2016). Na busca de ressaltar a sua agressividade, os americanos criaram o termo “killer bee” (abelhas assassinas), e mais tarde criou-se o termo “Africanizadas” (BREED et al., 2004).

Apresentando ciclo de vida mais curto, comportamento agressivo, tendência a enxameação e rápido crescimento populacional, a abelha africanizada se assemelha mais às abelhas africanas (DE JONG, 1996). Devido a esses fatores comportamentais a abelha africanizada ocasionou inicialmente um grande impacto na apicultura (GONÇALVES, 1992).

Os desenvolvimentos de novas técnicas de manejo e de estudos sobre biologia, comportamento e melhoramento permitiram que a apicultura brasileira passasse por melhorias nas práticas apícolas com as abelhas africanizadas (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012).

2.2. *Melipona* spp.

Além das africanizadas, as abelhas do gênero *Melipona* também apresentam potencial econômico e importância ecológica nos serviços ambientais (VENTURIERI et al., 2015). As Espécies de *Melipona* são consideradas importantes polinizadores de várias plantas cultivadas (DINIZ e BUSCHINI, 2016) e nativas, contribuindo para a polinização de 30% a 90% dessas espécies vegetais a depender do ambiente (KERR, 1997; MARTINS et al., 2015; POTTS et al., 2016).

A criação racional de abelhas-sem-ferrão é conhecida como meliponicultura, tem como finalidade a exploração dos produtos da colmeia, a preservação de espécies (VILLAS-BÔAS, 2012), e a criação tradicional onde as abelhas são mantidas e criadas em cortiços (truncos onde as formam colônias nidificadas) com finalidade de lazer e preservação ambiental (NOGUEIRA- NETO, 1997).

A manutenção de colônias dessas abelhas em diferentes regiões tem sido comprometida uma devido à falta de ações voltadas a preservação e conservação das espécies nativas principalmente aquelas encontradas na região Neotropical (MOURE, 2012). Nos diferentes biomas brasileiros, espécies de abelhas-sem-ferrão se destacam, especialmente ao nível da agricultura familiar. Dessa forma, no Nordeste do Brasil algumas espécies de *Melipona* se destacam devido a sua produtividade, tais como, *M. asilvai*, *M. fasciculata*, *M. quadrifasciata*, *M. scutellaris* e *M. subnitida*.

2.2.1. *Melipona asilvai* Moure, 1971

Conhecida popularmente como munduri, papa terra ou rajada, *M. asilvai* ocorre nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (CAMARGO e PEDRO, 2013), associada à habitats de mata seca, característicos do Bioma Caatinga (SIQUEIRA, 2005; SOUZA et al., 2009). Esses últimos autores caracterizaram o comportamento dessa espécie como tímido e com hábito de coletar grande quantidade de solo para a vedação das fendas nos seus ninhos.

No Estado da Bahia esta espécie já foi observada visitando flores de *Sida galheirensis* (Malvaceae), *Ziziphus cotinifolia* (Rhamnaceae), *Cardiospermum corindum* (Sapindaceae), *Solanum paniculatum* (Solanaceae) (AGUIAR, 2003) e *Helianthus annuus* (Asteraceae) (MACHADO e CARVALHO, 2006). De Melo et al. (2013) também observaram-a visitando flores de *Byrsonima gardneriana* (Malpighiaceae), *Copaifera coriacea* (Caesalpiniaceae), *Mimosa xiquexiquensis* (Mimosaceae). Lorenzon et al. (2003) relataram que na Serra da Capivara (Piauí) esta espécie visita *Ruellia paniculata* (Acanthaceae), *Gomphrena mollis*

(Amaranthaceae), *Loxopeterygium gardnerii* (Anacardiaceae), *Erythroxylum nummularia* (Erythroxylaceae) e *Chamaecrista flexuosa* (Caesalpiaceae).

A munduri possui potencial para produção de mel que varia entre 1,0 a 1,5 litros/caixa/ano. O pólen coletado por essa abelha tem potencialidade de ser usado como fonte de alimento protéico, a cera que pode ser usadas em artesanatos e a geoprópolis que também podem ser explorados, mas merecem ainda maiores estudos sobre sua composição e uso (SOUZA et al., 2009).

2.2.2. *Melipona fasciculata* Smith, 1854

Conhecida como tiúba ou uruçu-cinzenta, *M. fasciculata* é uma espécie criada com sucesso na sua área de ocorrência, a qual abrange os biomas de Mata Atlântica e Cerrado, com destaque de criação para região Nordeste do Estado do Pará e (CAMARGO e PEDRO, 2013, VENTURIERI et al., 2015).

Suas colônias são compostas por cerca de 1.000 operárias, os machos em algumas épocas são produzidos em abundância e sua principal tarefa é de fecundar as rainhas virgens durante o vôo nupcial (PEREIRA, 2012). A tradicional criação dessa espécie dá-se principalmente para a exploração de mel (VENTURIERI et al., 2003).

Além de produção de mel, a tiúba também pode ser utilizada para a polinização por vibração (VENTURIERI et al., 2015; NUNES-SILVA et al., 2013). Cerca de 79 espécies de plantas já foram identificadas sendo visitadas por *M. fasciculata*, e sua criação com manejo migratório em processo de recuperação florística vem sendo desenvolvido (PEREIRA, 2012).

Na Baixada Maranhense esta espécie foi observada visitando flores de: *Astrocaryum* sp. (Arecaceae), *Cassia occidentalis*, *Cassia* sp. (Fabaceae), *Combretum* sp. (Combretaceae), *Gustavia augusta* (Lecythidaceae), *Mimosa caesalpiniiifolia* (Fabaceae), *Mouriri acutiflora* (Melastomataceae), *Myrcia cuprea* (Myrtaceae), *Neptunia plena* (Fabaceae), *Attalea speciosa* (Arecaceae), *Ouratea castanaefolia* (Ochnaceae), *Tibouchina* sp. (Melastomataceae), *Senna alata* (Fabaceae), *Solanum* sp., *S. grandiflorum*, *S. Jamaicense* (Solanaceae), e *Spondias* sp. (Anacardiaceae) (CARVALHO et al., 2016).

Na região de sua ocorrência essas abelhas chegam a produzir em média 3,5 litros/caixa/ano de mel (VENTURIERI et al., 2015), são consideradas de manejo relativamente simples e adaptam-se facilmente a caixas de madeira e ambientes fechados como casas de vegetação (SLAA et al., 2006).

2.2.3. *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836

Melipona quadrifasciata apresenta duas subespécies: *M. quadrifasciata anthidioides* e *M. quadrifasciata quadrifasciata* (WALDSCHMIDT et al., 2002; CAMARGO e PEDRO, 2013). Conhecida popularmente por mandaçaia, no território brasileiro é encontrada ao longo da costa, nos estados de Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo (AIDAR, 2011; CAMARGO e PEDRO, 2013).

Esta espécie é caracterizada por coloração negra medindo cerca de 11mm de comprimento, suas colônias possuem entre 500 a 900 indivíduos (GUIBU et al., 1988). Seus ninhos são construídos em cavidades e possuem a entrada ornamentada com estruturas raiadas feitas de batume, uma mistura de barro e própolis (NOGUEIRA-NETO, 1997).

GUIBU et al. (1988) verificaram que as famílias vegetais mais visitadas por esta espécie, para a coleta de pólen e néctar foram Leguminosae, Melastomataceae, Myrtaceae e Solanaceae. Na região do Reconcavo Baiano, Carvalho et al. (2009) observaram, a partir de análise polínica do mel, que Mimosaceae, Myrtaceae e Solanaceae, foram as famílias botânicas que contribuíram de forma significativa na formação do mel e produção polinífera.

O mel produzido pela mandaçaia é procurado pelo seu sabor agradável, e sua produção pode chegar entre 1,5 L e 2,0 L de mel em épocas de boa florada (WALDSCHMIDT et al., 2002). No entanto, as mudanças ecológicas, expansão agrícola e urbana, queimadas, mudanças climáticas e o uso desordenado de agrotóxico no campo, colocou a abelha mandaçaia em ameaça de extinção na região de Caatinga (WALDSCHMIDT et al., 2002; MORETTO e ARIAS 2005; ARAUJO et al., 2016).

2.2.4. *Melipona scutellaris* Latreille, 1811

Melipona scutellaris, popularmente conhecida como uruçú, encontra-se restritamente distribuída a uma área que abrange Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe (CAMARGO e PEDRO, 2013).

Seus ninhos são construídos basicamente de cera pura ou cerume (cera, própolis e barro), a entrada é formada com barro e própolis moldando em forma de estrias ou sulcos (KERR et al., 1996). A população em uma colônia de *M. scutellaris* compreende cerca de 400 a 600 indivíduos (LINDAUER e KERR, 1960), medem entre 10 a 13mm de comprimento e apresenta massa corporal de 60 a 80mg. Essas características a definem como uma das maiores abelhas do gênero *Melipona* (KERR et al., 1996).

Apresenta importância ecológica oferecendo amplo benefício a agricultura por meio da polinização de diversas espécies vegetais: *Psidium guajava* (Myrtaceae), *Talisia esculenta* (Sapindaceae) (CASTRO, 2002; IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2006); *Persea americana* (Lauraceae), (CASTRO, 2002); *Grewia asiatica* (Malvaceae), *Euterpe oleracea* (Arecaceae), *Paulinia cupana* (Sapindaceae) (CASTRO, 2002); *Syzygium jambos* (Myrtaceae), *Eriobotrya japonica* (Maloideae) (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2006); *Capsicum annum* (Solanaceae) (ROSELINO et al., 2010).

A produção de mel de *M. scutellaris* é de 2,5 a 3,0 litros/colônia/ano, podendo chegar a produzir uma média de até 10 litros/colônia em épocas favoráveis. Esse mel é considerado medicinal, rico em princípios antibacterianos (MARTINS et al., 2011). No nordeste brasileiro, a criação desta espécie é considerada uma alternativa como atividade sustentável em áreas rurais fornecendo um complemento de renda para diversas famílias (CARVALHO-ZILSE et al., 2009).

2.2.5. *Melipona subnitida* Ducke, 1910

Melipona subnitida ou abelha jandaíra, ocorre em diversas regiões do Nordeste como os Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte (CAMARGO e PEDRO, 2013). Apesar

desses autores citarem a ocorrência da espécie também no Estado de Sergipe, incursões à campo não confirmaram esse registro (Informação Pessoal do Dr. Edilson Divino de Araújo, 2017). Trata-se de uma das principais espécies de abelhas-sem-ferrão de interesse econômico nesses Estados (JAFFÉ et al., 2015; KOFFLER et al., 2015), apresentando mel de alto valor comercial e de boa qualidade (LOPES et al., 2007).

A jandaíra é um meliponíneo típico do sertão, de fácil manejo, criado com fins lucrativos, o que tem contribuído para a sua conservação (MENEZES, 2006). A criação dessa abelha pode ser considerada sustentável, pois inclui a restauração ambiental por meio da preservação e plantio de árvores, que servem de locais para a sua nidificação (CÂMARA et al., 2004).

Nidificam preferencialmente em espécies vegetais como a imburana (*Commiphora leptophloeos*) e catingueira (*Poincianella pyramidalis*) (MARTINS et al., 2004), e mostrou eficiência na polinização de *Capsicum annuum* (Solanaceae) em ambiente protegido (CRUZ et al., 2013) e *Mimosa gemmulata* (Fabaceae) (SILVA et al., 2006). A preferência dessa abelha por algumas espécies vegetais nativas para forrageamento também mostram certa restrição, mesmo em ambiente rico em diversidade (SILVA et al., 2006), tornando a espécie sensível ao desmatamento e reduzindo a sua dispersão (NEVES et al., 2002).

Em colônias consideradas fortes, com população em torno de 1.000 abelhas, é possível obter produção média de mel de 1,5 a 2,5 litros/caixa/ano (FREITAS et al., 2010). O seu mel é considerado muito saboroso e com atribuições terapêuticas, sendo bastante procurado no mercado regional (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2013).

3. Estudos populacionais em abelhas

Apesar da importância das abelhas-sem-ferrão, o crescimento das atividades humanas com a exploração e a degradação de áreas naturais tem reduzido notoriamente essas populações e a polinização em diversas partes do mundo (BROWN e PAXTON, 2009). Dada a importância das espécies de abelhas, os estudos sobre suas populações, podem trazer informações importantes uma vez que discrimina e identifica diferenças e semelhanças entre as colônias nas

diferentes localizações geográficas de sua distribuição (LIMA-JUNIOR et al., 2012; KOCA et al., 2013; LIMA et al., 2014, 2015; ARAÚJO et al., 2016).

A identificação da diversidade específica, dos impactos causados pela pressão negativa da atividade humana, das doenças, da ação do tempo, do aprimoramento na identificação de espécies, dos estudos genéticos no âmbito de criar a definição de estratégias para conservação de populações das abelhas, do entendimento entre os benefícios prestados por abelhas e outros polinizadores são estratégias que necessitam ser priorizadas para ajudar compreender o impacto no declínio desses polinizadores (BROWN e PAXTON, 2009; Rader et al., 2016).

Devido a grande diversidade de espécies e a falta de dados sobre a sua distribuição geográfica torna-se um problema mensurar o declínio desses polinizadores (BROWN e PAXTON, 2009). Ferramentas que ajudem nos estudos de identificação e avaliação das populações de abelhas vêm sendo desenvolvidas e aplicadas, e contribuindo com atividades que possam direcionar as caracterizações das populações de abelhas ainda pouco conhecidas (FRANCOY e IMPERATRIZ-FONSECA, 2010).

Estudo tem relacionado o conhecimento sobre populações de abelhas, utilizando o SIG (Sistema de Informações Geográficas) associado a variáveis ambientais, permitindo identificar impactos causados pela ação do tempo em espécies de *Melipona* (BROWN e ALBRECHT, 2001). A avaliação entre fatores diretos como recursos alimentares, recursos de nidificação e riscos acidentais (ROULSTON e GOODELL, 2011) e indiretos como as mudanças climáticas (GOULSON et al., 2015) caracterizam populações de abelhas afetadas por esses fatores.

Análise sobre perturbações causadas pela ação humana (WINFREE et al., 2009), ninhos armadilha (SILVA et al., 2009), estudo do DNA mitocondrial (FRANCOY et al., 2009), estudos de variabilidade intra e interespecíficas de hidrocarbonetos cuticulares (NASCIMENTO e NASCIMENTO, 2012), morfometria associada ao comportamento da abelha (SOUZA et al., 2016) e morfometria geométrica aplicada à estudos populacionais em abelhas são importantes para identificar riqueza de diversidade em espécies e por contribuir no entendimento de

estrutura das populações de abelhas (FRANCOY e IMPERATRIZ-FONSECA, 2010, NUNES et al., 2013).

Nesse sentido, a morfometria geométrica vem sendo amplamente utilizada por não se limitar a variações maiores entre espécies, mas, variações intraespecíficas que permitem identificar a origem das colônias, discriminar colônias de diferentes localidades com eficiência no rastreamento geográfico e classificar colônias de uma espécie de abelha quando localizadas em diferentes países (FRANCOY et al., 2008; 2011).

Todas essas ferramentas são empregadas com o objetivo de contribuir com a avaliação da biodiversidade e caracterização das populações de abelhas de uma determinada região para fornecer informações sobre migração, colonização, fragmentação de habitats e principalmente conservação da biodiversidade.

As abelhas tem sofrido um declínio considerável em suas populações em todo o mundo, estando associado a vários fatores relevantes como, o uso indiscriminado de produtos químicos fitossanitários em culturas agrícolas, o manejo inadequado das colônias, abandono de apiários por parte dos apicultores e o aparecimento de doenças causadas por patógenos e parasitas (AIZEN et al., 2009; POTTS et al., 2010).

3.1. Morfometria geométrica

A morfometria geométrica é uma ferramenta de estudo quantitativo, definido pelas configurações de marcos anatômicos, que se caracterizam como pontos correspondentes em cada objeto entre e dentro das populações (DRYDEN e MARDIA, 1989). Além disso, as distâncias existentes entre os marcos anatômicos nesse método são determinadas por meio de coordenadas cartesianas fornecendo informações precisas sobre a sua posição relativa e permitindo a reconstrução da imagem estudada (FORNEL, 2012).

Entre os métodos diretos utilizados, se destaca a utilização de marcos anatômicos que representam as formas de uma maneira compreensiva por meio de dados numéricos e possibilita a utilização de vários testes estatísticos como,

Análise de Componentes Principais (ACP), Análise de Variáveis Canônicas (AVC), Análise Discriminante e Análise de Agrupamento (DI MARÉ e CORSEUIL, 2004).

A vantagem do uso das coordenadas cartesianas dos marcos anatômicos em relação a medidas lineares, é que estas incluem informação sobre as posições relativas, e deste modo permitem a reconstrução da forma estudada (ROHLF e MARCUS, 1993). Utilizando as grades de deformação é possível identificar a região da imagem que mais contribuiu para a discriminação da população (TOFILSKY, 2009).

As coordenadas cartesianas são utilizadas para que as ferramentas estatísticas, como a ACP, possam detectar padrões entre indivíduos, onde o primeiro componente contém o máximo possível de variação dos dados originais, não formando um grupo *a priori* (MONTEIRO e REIS, 1999).

Os primeiros estudos com morfometria geométrica em abelhas utilizando padrões de venação foram propostos utilizando uma estimativa generalizada de herdabilidade baseado na forma da asa em *A. mellifera* (MONTEIRO et al., 2002). Investigações utilizando a morfometria geométrica também foram realizadas para identificar variações morfológicas entre populações de abelhas africanizadas e subespécies ancestrais (FRANCOY et al., 2006, 2008). A partir de características das asas e da corbícula de *A. mellifera* Lepeletier provenientes de cinco regiões do Brasil foi possível observar a diferença significativa entre as populações em uma formação de grupos de acordo com a região geográfica de cada população (NUNES et al., 2012).

Em abelhas-sem-ferrão, um dos primeiros trabalhos realizados utilizando morfometria geométrica identificou diversidade entre duas populações de *Plebeia remota* (FRANCISCO et al., 2008). A técnica também foi eficiente na discriminação de populações de *Nannotrigona testaceicornis* (MENDES et al., 2007).

Em operárias de *M. beecheii* originadas de diferentes localidades México, Guatemala, El Salvador, Nicarágua e Costa Rica, foi possível por meio dessa ferramenta, realizar o rastreamento da origem geográfica dessa espécie (FRANCOY et al., 2011). Além disso, em *M. subnitida*, a utilização da morfometria geométrica, possibilitou a separação de populações em diferentes localidades do Brasil a partir de coordenadas cartesianas (BONATTI et al., 2014) bem como para

Scaptotrigona mexicana (HURTADO-BURILLO et al., 2016) e *M. quadrifasciata* (ARAÚJO et al., 2016).

A aplicação de ferramentas como a morfometria geométrica, para avaliação, caracterização e descrição de distribuição das populações já é efetivamente consolidada contribuindo com informações que ajudam na definição de planos de manejo, estratégias de conservação e preservação de espécies de abelhas (NUNES et al., 2008; BONATTI et al., 2014; LIMA et al., 2014).

A ampla utilização da morfometria geométrica nas três últimas décadas implicou no desenvolvimento de diversos programas para computadores e estes são disponibilizados gratuitamente facilitando o uso da técnica e tornando-a uma ferramenta mais consistente (KLINGEMBERG, 2015). Além dos estudos populacionais outros aspectos da ecologia e comportamento das abelhas tem sido objeto de investigação, como por exemplo, a comunicação química e as patologias associadas a esses insetos.

4. Hidrocarbonetos cuticulares em abelhas

A comunicação é um critério essencial para a manutenção da integridade das sociedades de insetos (WILSON, 1971). Os insetos conseguem detectar, discriminar e reagir diante uma gama de compostos químicos transmitidos por fontes biológicas que podem ser evidenciadas por órgãos de detecção de estímulos olfativos (SCHNEIDER, 1964).

Os hidrocarbonetos cuticulares são lipídios presentes na camada mais externa da cutícula dos insetos que tem como função primária a impermeabilização do tegumento, evitando a dessecação e agindo como barreira contra patógenos (LOCKEY, 1988). Outras funções desses compostos são o reconhecimento intra e interespecífico (HOWARD e BLOMQUIST, 2005), diferenciação sexual, e de castas (NUNES et al., 2009), diferenciação de atividade desenvolvidas no interior da colônia e reconhecimento inter e intra-colonial (NASCIMENTO e NASCIMENTO, 2012).

Os conhecimentos sobre as características dos hidrocarbonetos cuticulares em meliponíneos vêm crescendo nos últimos anos graças às descobertas de novas técnicas de extração e análise químicas (FERREIRA-

CALIMAN et al., 2010). A cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (CG-MS) tem sido amplamente utilizada (LANÇAS, 2009) e, juntamente com o estudo do comportamento, vem fornecendo subsídios para o entendimento dos aspectos sociobiológicos desses insetos (MARTIN et al., 2012).

Alguns estudos sobre hidrocarbonetos cuticulares mostraram-se promissores na identificação de populações distintas em *Plebeia remota* (FRANCISCO et al., 2008) e *M. marginata* (FEREIRA-CALIMAN et al., 2012).

Em Meliponini, os hidrocarbonetos foram relacionados à especificidade das interações entre plantas e a diversidade química aplicando uma análise de rede para ambos os níveis (LEONHARDT et al., 2011). Outra investigação foi realizada para detectar os efeitos dos componentes de hidrocarbonetos cuticulares produzidos endogena e ambientalmente adquiridos em abelhas-sem-ferrão que mostra a aceitação de todos os indivíduos da mesma espécie e a rejeição congênita não específica e cada abelha heterospecífica (SEPTANIL et al., 2012).

Por meio da análise de hidrocarbonetos cuticulares foi possível caracterizar a composição de espécimes diploides e haploides de *M. quadrifasciata* (BORGES et al., 2012). Um levantamento a partir de estudos já realizados avaliou se existiam padrões entre perfis de machos de abelhas-sem-ferrão que se agregavam com espécies próximas ou distantes e também se perfis de hidrocarbonetos nesses machos revelavam quaisquer semelhanças químicas entre seus odores masculinos (SANTOS et al., 2015).

5. Patologia em abelhas

As abelhas são alvo de vários patógenos, como bactérias, fungos e vírus, além de parasitas como ácaros, nematóides, insetos endoparasitas, amebas, acometendo desde larvas a indivíduos adultos (ELLIS e MUNN, 2005; RIBIÈRE et al., 2008). Uma das principais causas de morte nas abelhas está ligada a ocorrência de diversos vírus (FREIBERG et al., 2012).

A maioria dos vírus encontrados em abelhas são conhecidos há cerca de 50 anos e foram considerados inofensivos até 1980, quando o ácaro *Varroa destructor* se tornou um problema generalizado e considerado um dos principais

transmissores dos vírus, desde então, foram descobertos cerca de vinte vírus de fita simples de RNA em abelha e a maioria deles tem associação com os ácaros *Varroa*, que atuam como vetor físico ou biológico (Kevan et al., 2006). Esses vírus são pertencentes às famílias Discistroviridae e Iflaviridae e já foram identificados e caracterizados para abelhas do gênero *Apis*, ameaçando a saúde e o bem-estar desses indivíduos (CHEN et al., 2006; COX-FOSTER et al., 2007).

Os vírus de fita simples podem ser do tipo DNA (fsDNA) ou do tipo RNA (fsRNA), sendo que os compostos por uma fita simples de RNA podem ser caracterizados por ter a mesma orientação mRNA, denominado genoma de polaridade positiva ou de fita simples e outro com orientação inversa do mRNA chamado de polaridade negativa (FIELDS et al., 2005).

Vírus de RNA de cadeia simples e polaridade positiva são caracterizados por um genoma de cinco até 30 Kb (pares de base) e, em geral, os genomas são traduzidos em proteínas na primeira etapa da transcrição; o vírus de RNA de cadeia simples e polaridade negativa apresentam genomas que variam entre 10 a 20 Kb de extensão, e como estão no sentido negativo não são traduzidos diretamente e por isso necessitam da polimerase ou replicase para realizar a transcrição do genoma (FIELDS et al., 2005).

Entre os vírus de RNA os relacionados com mortalidade das abelhas são: vírus da paralisia aguda (*Acute Bee Paralysis Virus - ABPV*) (GOVAN et al., 2000), vírus realeira negra (*Black Queen Cell Virus – BQCV*) (LEAT et al., 2000), vírus da paralisia crônica (*Chronic Bee Paralysis Virus - CBPV*), vírus deformador da asa (*Deformed Wing Virus - DWV*) (TENTCHEVA et al., 2006), vírus israelense da paralisia aguda (*Israel Acute Paralysis Virus – IAPV*) (MAORI et al., 2007b), Kashmir vírus (*Kashmir Bee Virus - KBV*) (GENERSCH, 2010) e vírus da cria ensacada (*Sacbrood Virus - SBV*) (FEIBERG et al., 2012).

Dentre estes, o vírus DWV tem sido intensivamente investigado, por ser umas das viroses que mais infesta as abelhas e está na lista dos fatores responsáveis pelo desaparecimento de colônias em todo mundo, devido a interação da sua transmissão através do ácaro *Varroa destructor* (DE MIRANDA e GENERSCH, 2010; MARTIN et al., 2013).

O DWV foi detectado pela primeira vez em abelhas do gênero *Apis* em diversas partes do mundo e em *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758) que não

apresentam infestação por ácaro *V. destructor* (GENERSCH e AUBERT, 2010). O DWV recebe este nome pelo sintoma característico que causa nas abelhas, a deformação de suas asas ou o mau desenvolvimento nas abelhas recém-emergidas (DE MIRANDA e GENERSCH, 2010).

Além da transmissão pelo ácaro *V. destructor* (MIRANDA e GENERSCH, 2010), o DWV, pode ser verticalmente transmitido para as operárias através das rainhas infectadas por seus genitores ou por zangões no acasalamento, gerando uma prole contaminada com o vírus (CHEN et al., 2006; YUE et al., 2007). A transmissão de DWV também pode ocorrer através de trofalaxia para as larvas (YUE e GENERSH, 2005).

A transmissão do vírus por meio do ácaro ocorre na fase de pupa, quando os olhos ainda estão brancos e as asas não foram estendidas (YUE e GENERSCH, 2005; CRUZ-LANDIM, 2008). Quando as abelhas sobrevivem à infecção inicial, elas desenvolvem asa deformada, redução no tamanho do abdome e descoloração cuticular (YUE e GENERSCH, 2005).

Em *A. mellifera*, na ausência de *V. destructor*, a infecção é assintomática (YUE e GENERSCH, 2005) por outro lado colônias infestadas com o ácaro apresentam níveis virais elevados como perdas de colônias, comprometimento do desenvolvimento pupal e operárias sintomáticas (RYABOV et al., 2014).

As infecções virais em abelhas estão diretamente associadas ao declínio de colônias em abelhas *A. mellifera* (LEAL et al., 2010). E recentemente Ueira-Vieira et al. (2015) relataram a presença do vírus ABPV em populações de abelhas-sem-ferrão do Gênero *Melipona* no Brasil.

Estudos que envolvam a patogênese e imunidade em abelhas podem contribuir significativamente para uma melhor compreensão sobre a ação dos vírus nesses insetos, bem como, sobre a concepção de medidas de controle adequadas para as populações em risco de infecção (BAILEY et al., 1981). Com a aplicação de técnicas moleculares é possível o diagnóstico desses vírus, principalmente, em abelhas adultas revelando infecções simples ou multi virais (MARTIN et al., 2013; MORDECAI et al., 2015).

A reação em cadeia polimerase (PCR) fornece diagnóstico rápido e confiável na detecção de agentes etiológicos causadores de doenças em abelhas (GOVAN et al., 1999; DE GRAAF et al., 2008). A técnica multiplica um trecho

específico do DNA a partir de um fragmento do material biológico, até um ponto que sua concentração seja tão alta que possa ser facilmente detectável por métodos simples e clássicos de separação e identificação de substâncias. Como no caso da eletroforese em gel de agarose, possibilitando, assim, a verificação da presença ou ausência do material nucléico específico (PICCINI et al., 2002; RYBA et al., 2009).

A PCR monoespecífica é utilizada na diagnose de ácidos nucleicos específicos em materiais biológicos (BAKONYI et al., 2003), contudo, tratando-se de detecção de múltiplos materiais genômicos, essa técnica mostra-se um tanto precária devido a grande demanda de realizações de reações (PICCINI et al., 2002).

Os dois principais tipos de PCR baseiam-se em PCR convencional ou semiquantitativo e o qPCR, RT-q PCR qualitativo: o primeiro é caracterizado pela presença ou ausência de padrões de bandas específicas para o fragmento amplificado e desejado (primers utilizados) os quais são visualizado por eletroforese, já o PCR quantitativo (qPCR), permite estimar a quantidade de ácido desoxirribonucleico (DNA) que foi amplificada em comparação a um padrão (NOVAES et al., 2004).

A qPCR ou PCR em tempo real (Real-Time PCR) é uma técnica quantitativa que utiliza *primers* e desoxirribonucleicos fosfatados marcados por compostos fluorescentes, que permite visualizar por meio da amplificação do DNA, sem a necessidade de fazer a eletroforese em gel de agarose (NOVAES et al., 2004). A qPCR é uma técnica difundida na determinação da expressão gênica específica onde há necessidade de informações sobre a quantidade inicial de DNA nas amostra e quantas moléculas foram formadas durante a reação (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Essa técnica vem sendo amplamente utilizada na detecção, identificação e na presença viral das amostras possibilitando a quantificação do DNA viral, e o conhecimento dos padrões desse vírus em indivíduos sintomáticos ou assintomáticos (TENTCHEVA et al., 2004; FIEVET et al., 2006; MARTIN et al., 2012).

A junção de estudos morfométricos, detecção de vírus, bem como a caracterização de perfil de hidrocarbonetos em abelhas, pode contribuir na

elaboração de planos de manejo e conservação de espécies, a fim de manter a diversidade de abelhas em sua área de ocorrência natural, contribuindo com o fortalecimento das atividades apícolas e meliponícolas.

Dessa forma, o objetivo geral desse trabalho foi contribuir com informações sobre espécies de abelhas de interesse econômico na região Meio Norte do Brasil, caracterizando populações de abelhas, identificação do perfil de compostos cuticulares e detecção da presença do Vírus Deformador da Asa.

Especificamente, o estudo foi dividido nas seguintes etapas:

- Identificação de populações isoladas de *Melipona subnitida* Ducke, 1910 (Apidae: Meliponini) em sua área de ocorrência natural;
- Caracterização populacional de *Melipona fasciculata* Smith, 1854 (Hymenoptera: Apidae) na região Meio Norte do Brasil;
- Hidrocarbonetos cuticulares no reconhecimento de espécies e de colônias de *Melipona* spp. (Hymenoptera: Meliponini);
- Detecção do vírus deformador de asas em *Melipona fasciculata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) na região Meio Norte do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C. M. L. Utilização de recursos florais por abelhas (Hymenoptera, Apoidea) em uma área de Caatinga (Itaim, Bahia, Brasil). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 3, p. 457-467, 2003.

AIDAR, D. S. **A mandaçaia: Biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata***. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2011, 162 p.

AIZEN, M. A.; GARIBALDI, L. A.; CUNNINGHAM, S. A.; KLEIN, A. M. How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. **Annals of Botany**, v. 103, n. 9, p. 1579-1588, 2009.

ALTTAL, Y.; ALSHARHI, M.; ALGHAMDI, A.; ALFAIFY, S.; MIGDADI, H.; ANSARI, M. Characterization of the native honey bee subspecies in Saudi Arabia using the mtDNA COI–COII intergenic region and morphometric characteristics. **Bulletin of Insectology**, v. 67, n. 1, p. 31-37, 2014.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B. de; STRAMM, K. M.; HORITA, A.; BARTH, O. M.; SILVA, A.; ESTEVINHO, M. L.; Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 8, p.1698-1706, 2013.

ANDERSON, D. L. Kashmir bee virus—a relatively harmless virus of honey bee colonies. **American Bee Journal**, v. 131, p. 767-770, 1991.

ARAÚJO, E. D.; OLIVEIRA, R. G.; CALAZANS, H. C. M.; FRANÇA, C. C. S.; SANTOS, V.; JAIN, S.; BATISTA, M. V. A.; NUNES, L. A. Risk of local extinction and genetic diversity of *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) in a possible Northeastern limit of its distribution in Brazil. **Sociobiology**, v. 63, n. 2, p. 804-812, 2016.

BAKONYI, T.; DERAKHSHIFAR, I.; GRABENSTEINER, E.; NOWOTNY, N. Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1504–1510, 2003.

BAILEY, L.; BALL, B. V.; PERRY, J. N. The prevalence of viruses of honey bees in Britain. **Annals of Applied Biology**, v. 97, n. 1, p. 109-118, 1981.

BAILLEY, L.; WOODS, R. D. Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and Acute bee- paralysis viruses. **Journal of General Virology**, v. 37, p. 175-182, 1977.

BAILEY, L.; MILNE, R. G. Multiplication regions and interaction of Acute and Chronic bee paralysis viruses in adult honey bees. **Journal of General Virology**, v. 4, p. 9-14, 1969.

BAILEY, L.; GIBBS, A. J.; WOODS, R. D. Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis Mellifera* Linnaeus). **Virology**, v. 23, n. 3, p. 425-429, 1964.

BAILEY, L.; GIBBS, A. J.; WOODS, R. D. Two viruses from adult honey bees (*Apis Mellifera* Linnaeus). **Virology**, v. 21, n. 3, p. 390-395, 1963.

BECHER, M.; GRIMM, V.; THORBEEK, P.; HORN, J.; KENNEDY, P.J.; OSBORNE, J.L. Beehave: a systems model of honeybee colony dynamics and foraging to explore multifactorial causes of colony failure. **Journal of Applied Ecology**, v. 51, p. 470-482, 2014.

BIESMEIJER, J. C.; ROBERTS, S. P. M.; REEMER, M.; OHLEMULLER, R.; EDWARDS, M.; PEETERS, T.; SCHAFFERS, A. P.; POTTS, S. G.; KLEUKERS, R.; THOMAS, C. D.; SETTELE, J.; KUNIN, W. E. Parallel Declines in Pollinators

and Insect-Pollinated Plants in Britain and the Netherlands, **Science**, v. 313, p. 351-354, 2006.

BONATTI, V.; SIMÕES, Z. L. P.; FRANCO, F. F.; FRANCOY, T. M. Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. **Naturwissenschaften**, v. 101, n. 1, p. 17-24, 2014.

BORGES, A. A.; FERREIRA-CALIMAN, M. J.; NASCIMENTO, F. S.; CAMPOS, L. A. O.; TAVARES, M. G. Characterization of cuticular hydrocarbons of diploid and haploid males, workers and queens of the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. **Insectes Sociaux**, v. 59, n. 4, p. 479-486, 2012.

BREED, M. D.; DIAZ, P. H.; LUCERO, K. D. Olfactory information processing in honeybee, *Apis mellifera*, nestmate recognition. **Animal Behaviour**, v. 68, n. 4, 921-928, 2004.

BROWN, J. C.; ALBRECHT, C. The effect of tropical deforestation on stingless bees of the genus *Melipona* (Insecta: Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in central Rondonia, Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 28, p. 623-634, 2001.

BROWN, M. J. F.; PAXTON, R. J. The conservation of bees: a global perspective. **Apidologie**, v. 40, n. 3, p. 410-416, 2009.

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

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In: MOURE, J. S. URBAN, D.; MELO, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region-online version**. 2013. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acessado em 10 de outubro de 2015.

CAMERON, S. A.; LOZIER, J. D.; STRANGE, J. P.; KOCH, J. B.; CORDES, N.; SOLTER, L. F.; GRISWOLD, T. L. Patterns of widespread decline in North American bumble bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 2, p. 662-667, 2011.

CARVALHO, C. A. L.; SODRÉ, G. S.; FONSECA, A. A. O.; ALVES, R. M. O.; SOUZA, B. A.; CLARTON, L. Physicochemical characteristics and sensory profile of honey samples from stingless bees (Apidae: Meliponinae) submitted to a dehumidification process. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 1, p. 143-149, 2009.

CARVALHO, A. T.; KOEDAM, D. IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Register of a New Nidification Substrate for *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): The Arboreal Nest of the Termite *Constrictotermes cyphergaster* Silvestri (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 428-434, 2014.

CARVALHO, G. C. A.; RIBEIRO, M. H. M.; ARAÚJO, A. C. A. M.; BARBOSA, M. de M.; OLIVEIRA, F. Dos S.; ALBUQUERQUE, P. M. C. Flora de importância polínica utilizada por *Melipona* (*Melikerria*) *fasciculata* Smith, 1854 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) em uma área de floresta Amazônica na região da Baixada Maranhense, Brasil, **Oecologia Australis**, v. 20, n. 1, p. 58-68, 2016.

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

CASTRO, M. S. Bee fauna of some tropical and exotic fruits: potential pollinators and their conservation. In: KEVAN, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (Ogs). **Pollination bees**. The conservation link between agriculture and nature Ministry of Environment, Brasília, 2002, p. 275-288.

CHEN, Y. P.; PETTIS, J. S.; COLLINS, A.; FELDLAUFER, M. F. Prevalence and transmission of honeybee viruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 606-611, 2006.

COX-FOSTER, D. L.; CONLAN, S.; HOLMES, E. C.; PALACIOS, G.; EVANS, J. D.; MORAN, N. A.; QUAN, P. L.; BRIESE, T.; HORNING, M.; GEISER, D. M.; MARTINSON, D.; VANENGELSDORP, D.; KALKSTEIN, A. L.; DRYSDALE, A.; HUI, J.; ZHAI, J. CUI, L.; HUTCHISON, S. K.; SIMONE, J. F.; EGHOLM, M.; PETTIS, J. S.; LIPKIN, W. I. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, v. 318, p. 283-286, 2007.

CRUZ, D. D. O.; FREITAS, B. M. Diversity of bee species floral visitors and potential pollinators of oleaginous crops in Northeast of Brazil. **Ambiência**, v. 9, n. 2, p. 411-418, 2013.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: Morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2008. 408p. 2008

DE GRAAF, D. C.; BRUNAIN, M.; IMBERECHTS, H.; JACOBS, F. First molecular confirmation of Deformed Wing Virus infections of honeybees from a Belgian apiary reveals the presence of black queen cell virus and *Varroa destructor* virus 1. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v. 78, p. 101-105, June 2008.

DE JONG, D. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. **Bee World**, v. 77, n. 2, p. 67-70, 1996.

DE MELO, E. S. N. C.; LIMA, F. G.; GONÇALVES, B. B.; BERGAMINI, L. L.; BERGAMINI, B. A. R.; ELIAS, M. A. S.; FRANCESCHINELLI, E. V. Native bees pollinate tomato flowers and increase fruit production. **Journal of Pollination Ecology**, v. 11, n. 6, p. 41-45, 2013.

DE MIRANDA, J. R.; GENERSCH, E. Deformed wing virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, n. 1, p. 48-61, 2010.

DE MIRANDA, J. R.; DREBOT, M.; TYLER, S.; SHEN, M.; CAMERON, C. E.; STOLTZ, D. B.; CAMAZINE, S. M. Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 8, p. 2263-2270, 2004.

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

DINIZ, M. E. R.; BUSCHINI, M. L. T. Diversity of flower visiting bees of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) in fragments of Atlantic Forest in South Brazil. **Sociobiology**, v. 63, n. 3, p. 982-990, 2016.

DRYDEN, I. L.; MARDIA, K. V. The statistical analysis of shape data. **Biometrika**, v. 76, n. 2, p. 271-281, 1989.

ELLIS, J. D.; MUNN, P. A. The worldwide health status of honey bees. **Bee World**, v. 86, n. 1, p. 88-101, 2005.

EVANS, J. D. Genetic evidence for coinfection of honey bees by acute bee paralysis and Kashmir bee viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, n. 4, p. 189-193, 2001.

FAO. Faostat- Statistics Database. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/> Acessado em 10 setembro de 2016.

FEIBERG, M.; DE JONG, D.; MESSAGE, D.; COS-FOSTER, D. First report of sacbrood virus in honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 3310-3314, 2012.

FERREIRA-CALIMAN, M. J.; NASCIMENTO, F. S.; TUTARI, I. C.; MATEUS, N. P.; ZUCCHI, R. The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona*

marginata reflect task-related differences. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 800-804, 2010.

FERREIRA-CALIMAN, M. J.; ZUCCHI, R.; NASCIMENTO, F. S. Cuticular Hydrocarbons Discriminate Distinct Colonies of *Melipona marginata* (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). **Sociobiology**, v. 59, n. 3, p. 783, 2012.

FIEVET, J.; TENTCHEVA, D.; GAUTHIER, L.; MIRANDA, J.; COUSSERANS, COLIN, M. E.; BERGOIN, M. Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L. **Virology Journal**, v. 3, n. 16, p. 1-5, 2006.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (eds). **Fields Virology**, Fifth edition. Lippincott-Raven, 2005.

FORNEL, R.; CORDEIRO-ESTRELA, P. Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. In: MARINHO, J. R.; HEPP L. U.; FORNEL. (Org.). **Temas em Biologia**: Edição comemorativa aos 20 anos do Curso de Ciências Biológicas e aos 5 anos do PPG-Ecologia da URI Campus de Erechim. 1ed.Erechim: EDIFAPES, 2012, p. 101-120.

FRANCISCO, F. O.; NUNES-SILVA, P.; FRANCOY, T. M.; WITTMANN, D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ARIAS, M. C.; MORGAN, E. D. Morphometrical, biochemical and molecular tools for assessing biodiversity. An example in *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). **Insectes Sociaux**, v. 55, n. 3, p. 231-237, 2008.

FRANCOY, T. M.; GRASSI, M. L.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; MAY-ITZA, W. de J.; QUEZADA-EUAN, J. J. Geometric morphometrics of the wing as a tool for assigning genetic lineages and geographic origin to *Melipona beecheii* (Hymenoptera: Meliponini). **Apidologie**, v. 42, n. 4, p. 499-507, 2011.

FRANCOY, T. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A Morfometria geométrica de asas e a identificação automática de espécies de abelhas. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 317-321, 2010.

FRANCOY, T. M.; PRADO, P. R. R.; GONÇALVES, L. S.; COSTA, L. da F.; JONG, D. de. Morphometric differences in a single wing cell can discriminate *Apis mellifera* racial types. **Apidologie**, v. 37, p. 91-97, 2006.

FRANCOY, T. M.; SILVA, R. A. O.; NUNES-SILVA, P.; MENEZES, C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Gender identification of five genera of stingless bees (Apidae, Meliponini) based on wing morphology. **Genetics and molecular research**, v. 8, n. 1, p. 207-214, 2009.

FRANCOY, T. M.; WITTMANN, D.; DRAUSCHKE, M.; MÜLLER, S.; STEINHAGE, V.; BEZERRA-LAURE, M. A.; GONÇALVES, L. S. Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. **Apidologie**, v. 39, n. 5, p. 488-494, 2008.

FREIBERG, M.; DE JONG, D.; MESSAGE, D.; COX-FOSTER, D. First report of sacbrood virus in honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 3310-3314, 2012.

FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; MEDINA, L. M.; KLEINERT, A. D. M. P.; GALETTO, L.; NATES-PARRA, G.; QUEZADA-EUÁN, J. J. G. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, v. 40, n. 3, p. 332-346, 2009.

FREITAS, W. E.; AROUCHE, E. M. M.; SOARES, K. M.; MENDES, F. I. de B.; OLIVEIRA, V. R. de; LUCAS, C. R.; SANTOS, M. C. A. dos. Physical-chemical parameters of stingless bee (*Melipona subnitida*) honey after heat treatment. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 3, pp. 153-157, 2010.

GARIBALDI, L. A.; AIZEN, M. A.; KLEIN, A. M.; CUNNINGHAM, S. A.; HARDER, L. D. Global growth and stability of agricultural yield decrease with pollinator dependence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 14, p. 5909-5914, 2011.

GARIBALDI, L. A.; CARVALHEIRO, L. G.; LEONHARDT, S. D.; AIZEN, A. M.; BLAAUW, B. R.; ISAAC, R.; KUHLMANN, M.; KLEIJN, D.; KLEIN, A. M.; KREMEN, C.; MORANDIN, L.; SCHEPER, J.; WINFREE, R. From research to action: enhancing crop yield through wild pollinators. **The Ecological Society of America**, v. 12, n. 8, p. 439-447, 2016.

GENERSCH, E. American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 10-19, 2010.

GENERSCH, E.; AUBERT, M. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Veterinary Research**, v. 41, n. 6, p. 54, 2010.

GONÇALVES, L. S. Africanização das abelhas nas Américas, impactos perspectivas de aproveitamento do material genético. **Naturalia**, p. 126-134, 1992.

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Scienceexpress**, v. 347, Issue 6229, 2015.

GOVAN, V. A.; ALLSOP, M. H.; DAVISON, S. A. PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. **Applied and Environmental microbiology**, v. 65, n. 5, p. 2243-2245, 1999.

GOVAN, V. A.; LEAT, N.; ALLSOPP, M.; DAVISON, S. Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-infecting RNA viruses. **Virology**, v. 277, n. 2, p. 457-463, 2000.

GUIBU, L. S.; RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Exploração de recursos florais por colônias de *Melipona quadrifasciata* (Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 48, n. 2, p. 299-305, 1988.

HORNITZKY, M. A. Z. Prevalence of virus infections of honeybees in Eastern Australia. **Journal Apiculture Research**, v. 26, n. 3, p. 181-185, 1987.

HOWARD, R. W.; BLOMQUIST, G. J. Ecological, Behavioral, and Biochemical Aspects of Insect Hydrocarbons. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 371-393, 2005.

HURTADO-BURILLO, M.; JARA, L.; MAY-ITZA, W. de J.; QUEZEDA-EUÁN, J. J.; RUIZ, C.; RÚA, P. de L. A. A geometric morphometric and microsatellite analyses of *Scaptotrigona mexicana* and *S. pectoralis* (Apidae: Meliponini) sheds light on the biodiversity of Mesoamerican stingless bees. **Journal of Insect Conservation**, v. 20, p. 753-763, 2016.

IMPERATRIZ-FONSECA, V.K.; SARAIVA, A.M.; CANHOS, D.A.; ALVES, D.A. **Polinizadores No Brasil: Contribuição e Perspectivas Para Biodiversidade, Uso Sustentável, Conservação e Serviços Ambientais**. São Paulo, EDUSP, 2012. 488p.

IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; DE JONG, D.; SARAIVA, A. M. (eds.). **Bees as Pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting the best practices**. Holos Ed., Ribeirão Preto, 2006, 114p.

JAFFÉ, R.; POPE, N.; CARVALHO, A.T.; MAIA, U.M.; BLOCHTEIN, B.; CARVALHO, C.A.L.; CARVALHO-ZILSE, G.A.; FREITAS, B.M.; MENEZES, C.; RIBEIRO, M.F.; VENTURIERI, G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize stingless beekeeping. **PLoS ONE**, v.10, n.3:e0121157. doi:10.1371/journal.pone.0121157

KERR, J. T. Species richness, endemism, and the choice of areas for conservation. **Conservation Biology**, v. 11, p. 1094-1100, 1997.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação**. Fundação Acangaú, Belo Horizonte, 1996, 154p.

KEVAN, P. G.; HANNAN, M. A.; OSTIGUY, N.; GUZMAN-NOVOA E. A summary of the Varroa-virus disease complex in honey bees. **American Bee Journal**, v. 146, n. 8, p. 694- 697, 2006.

KLEIN, A. M.; VAISSIERE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops, **Royal Society: Biological Science**, v. 274, n. 1608, p. 303-313, 2007.

KLINGENBERG, C. P.; GRAHAM, J. H. Analyzing Fluctuating Asymmetry with Geometric Morphometrics: Concepts, Methods, and Applications. **Symmetry**, v. 7, p. 843-934, 2015.

KOCA, A. Ö.; KANDEMİR, I. Comparison of two morphometric methods for discriminating honey bee (*Apis mellifera* L.) populations in Turkey. **Turkish Journal of Zoology**, v. 37, n.2, p. 205-210, 2013.

KOFFLER, S.; MENEZES, C; MENEZES, P.R.; KLEINERT, A.M.P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; POPE, N.; JAFFÉ, R. Temporal variation in honey production by the stingless bee *Melipona subnitida* (Hymenoptera: Apidae): long-term management reveals its potential as a commercial species in Northeastern Brazil. **Journal Economic Entomology**, v.108, n.3, p.858-867, 2015.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LAURENT, M.; HENDRIKX, P.; RIBIERE-CHABERT, M.; CHAUZAT, M.-P. A pan-European epidemiological study on honeybee colony losses 2012-2014. 2015. Available at: <http://ec.europa.eu/food/animals/live_animals/bees/docs/bee-report_2012_2014_en.pdf>. Acessado em fevereiro de 2017.

LEAL, W. S.; BROMENSHENK, J. J.; HENDERSON, C. B.; WICK, C. H.; STANFORD, M. F.; ZULICH, A. W.; JABBOUR, R. E.; DESHPANDE, S. V.; MCCUBBIN, P. E.; SECCOMB, R. A.; WELCH, P. M.; WILLIAMS, T.; FIRTH, D. R.; SKOWRONSKI, E.; LEHMANN, M. M.; BILIMORIA, S. L. GRESS, J.; WANNER, K. W.; CRAMER Jr, R. A. Iridovirus and Microsporidian Linked to Honey Bee Colony Decline. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, p. e13181, 2010.

LAUTENBACH, S., SEPPELT, R., LIEBSCHER, J.; Dormann, C. F. Spatial temporal trends of global pollination benefit. **PLoS ONE**, v. 7, e35954, 2012.

LEAT, N.; BALL, B.; GOVAN, V.; DAVISON, S. Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 8, p. 2111-2119, 2000.

LEONHARDT, S. D., SCHMITT, T., BLÜTHGEN, N. Tree resin composition, collection behavior and selective filters shape chemical profiles of tropical bees (Apidae: Meliponini). **PLoS ONE**, v. 6, e23445, 2011.

LIMA-JUNIOR, C. A.; CARVALHO, C. A. L.; NUNES, L. A.; FRANCOY, T. M. Population Divergence of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Meliponina) in Two Restricted Areas in Bahia, Brazil. **Sociobiology**, v. 59, n. 1, p. 107-122, 2012.

LIMA, C. B. da S.; NUNES, L. A.; CARVALHO, C. A. L. De; RIBEIRO, M. de F.; SOUZA, B. A.; SILVA, C. S. B. Morphometric differences and fluctuating asymmetry in *Melipona subnitida* Ducke 1910 (Hymenoptera: Apidae) in different types of housing. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 4, p. 845-850, 2015.

LIMA, C. B. S.; NUNES, L. A.; RIBEIRO, M. de F.; CARVALHO, C. A. L. Population Structure of *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) at the Southern Limit of its Distribution Based on Geometric Morphometrics of Forewings. **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 478-482, 2014.

LINDAUER, M.; KERR, W. E. Communication between the workers of stingless bees. **Bee world**, v. 41, p. 29-71, 1960.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOCKEY, K. H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, v. 89, n. 4, p. 595-645, 1998.

LOPES, M. T. do R.; SILVA, J. O.; PEREIRA, F. de M.; CAMARGO, R. C. R.; NETO, J. M. V.; ROBEIRO, V. Q. **Atividade de Vôo de Abelhas Jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke, 1910) Instaladas em dois modelos de colméia**, p. 20, 2007. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/ INFOTECA-E).

LORENZON, M. C. A.; MATRANGOLO, C. A. R.; SCHOEREDER, J. H. Flora visitada pelas abelhas eussociais (Hymenoptera, Apidae) na Serra da Capivara, em Caatinga do Sul do Piauí, v. 32, n. 1, p. 27-36, 2003.

LOS SANTOS, R. T.; FIGUEROA, M. S.; GÓMEZ, E. H. G.; MONTERRUIBO, L. D. A.; RABANALES, M. R.; CONESA, J. G. Detection of begomovirus in the stingless bee *Trigona fuscipennis* visiting *Jatropha curcas* in the South of Mexico. **Journal of Apicultural Research**, v. 55, n. 2, p. 185-186, 2016.

MACHADO, C. S.; C. A. L. CARVALHO. Abelhas (Hymenoptera: Apoidea) visitantes dos capítulos de girassol no Recôncavo Baiano. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1404-1409, 2006.

MAORI, E.; PALDI, N.; SHAFIR, S.; KALEV, H.; TSUR, E.; GLICK, E.; SELA, I. IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. **Insect Molecular Biology**, v. 18, n. 1, p. 55-60, 2009.

MAORI, E.; LAVI, S.; MOZES-KOCH, R.; GANTMAN, Y.; PERETZ, Y.; EDELBAUM, O.; TANNE, E.; SELA, I. Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 12, p. 3428-3438, 2007a.

MAORI, E.; TANNE, E.; SELA, I. Reciprocal sequence Exchange between non-retro viruses and hosts leading to the appearance of new host phenotypes. **Virology**, v. 362, n. 2, p. 342-349, 2007b.

MAORI, E.; PALDI, N.; SHAFIR, S.; KALEV, H.; TSUR, E.; GLICK, E.; SELA, I. IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. **Insect Molecular Biology**, v. 18, n. 1, p. 55-60, 2009.

MARTIN, S. J.; HARDY, J.; VILLALOBOS, E.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; NIKALDO, S.; HIGES, M.; Do the honeybee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus act synergistically? **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 4, p. 506-510, 2013.

MARTIN, S. J.; HIGHFIELD, A. C.; BRETTELL, L. E.; VILLASBOAS, E. M.; BUDGE, G. E.; POWELL, M.; NIKAIIDO, S.; SCHOEDER, D. C. Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite. **Science**, v. 336, p. 1304-1306, 2012.

MARTINS, R. P.; PFÜLLER, E. E.; MARTINS, E. C. IMPORTÂNCIA AMBIENTAL DAS ABELHAS-SEM-FERRÃO. **RAMVI**, Getúlio Vargas, v. 02, n. 04, 2015.

MARTINS, C. F.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; KOEDAM, D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Tree species used for nidification by stingless bees in the Brazilian Caatinga (Serridó, PB; João Câmara, RN). **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, p. 1-8, 2004.

MARTINS, A. C. L.; RÉGO, M. M. C.; CARREIRA, L. M. M.; ALBUQUERQUE, P. M. C. Espectro polínico de mel de tiúba (*Melipona fasciculata* Smith, 1854, Hymenoptera, Apidae). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 2, p. 183-190, 2011.

MAUÉS M. M.; VARASSIN, I. G.; FREITAS, L.; MACHADO, I. C. S.; OLIVEIRA, P. E. A. M. A importância dos polinizadores nos Biomas brasileiros, conhecimento atual e perspectivas futuras para conservação. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CANHOS, D. A. L.; ALVES, D. De A.; SARAIVA, A. M. (Ogs). **Polinizadores no Brasil: Contribuição e Perspectivas para a Biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. São Paulo, 2012, 488p.

MCGREGOR, S. E. **Insecta Pollination of Cultivated Crop Plants**. Washington, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 1976, (U.S.D.A. Hand-book 496).

MENDES, M. F. M.; FRANCOY, T. M.; NUNES-SILVA, P.; MENEZES, C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Intra-populational variability of *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier, (Hymenoptera, Meliponini) using relative warp analysis. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 1, p. 147-152, 2007.

MENEZES, P. **Criação racional da abelha jandaira**. In: BRUENING, H. (Ed.). **Abelha jandaira**. 3. Natal-Brasil, p.121-135, 2006.

MICHENER C.D. **The Bees of the World**. John Hopkins University Press, Baltimore London. 2000, 913 p.

MIRANDA, J. R.; GENERSCH, E. Deforme wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 103, p.48-61, 2010.

MONTEIRO, L.R.; REIS, S.F. **Princípios de Morfometria Geométrica**. Holos, Ribeirão Preto. 1999, 188p.

MONTEIRO, L. R.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; REIS, S. F. Dos; ARAÚJO, E. D. Geometric estimates of heritability in biological shape. **Evolution**, v. 56, n. 3, p. 563-572, 2002.

MORDECAI, G. J.; BRETTELL, L. E.; MARTIN, S. J.; DIXON, D.; JONES, I. M.; SCHROEDER, D. Superinfection exclusion and the long-term survival of honey bees in Varroa-infested colonies. **International Society for Microbial Ecology**, v. 10, n. 5, p. 1182-1191, 2015.

MORETTO G.; ARIAS M. C. Detection of mitochondrial DNA restriction site differences between the subspecies of *Melipona quadrifasciata* Lepelletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 3, p. 381-385, 2005.

MOURE, J. S. Apini Latreille, 1802. In: MOURE, J. S., URBAN, D.; MELO, G. A. R. (Orgs). 2012. **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region** - online version. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acessado em 12 de novembro de 2016.

NASCIMENTO, D. L.; NASCIMENTO, F. S. Acceptance Threshold Hypothesis is Supported by Chemical Similarity of Cuticular Hydrocarbons in a Stingless Bee, *Melipona asilvai*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, n. 11, p. 1432-40, 2012.

NEVES, E. L.; VIANA, B. F. As abelhas eussociais (Hymenoptera, Apidae) visitantes florais em um ecossistema de dunas continentais no médio Rio São Francisco, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 46, n. 4, p. 571-578, 2002.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Nogueirapis. São Paulo. SP, 1997, 445p.

NOVAES, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real: Uma nova tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, v. 33, p. 10-13, 2004.

NUNES, L. A.; ARAUJO, E. D.; CARVALHO, C. A. L.; WALDSCHMIDT, A. M. Population divergence of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae) endemic to the semi-arid region of State of Bahia, Brazil. **Sociobiology**, v. 52, n. 1, p. 81-93, 2008.

NUNES, L. A.; ARAUJO, E. D.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. de C. C. Variation morphogeometrics of Africanized honey bees (*Apis mellifera*) in Brazil. **Iheringia**, Série Zoologia, v. 102, n. 3, p. 321-326, 2012.

NUNES, T. M.; TURATTI, I. C. C.; MATEUS, S.; NASCIMENTO, F. S.; LOPES, N. P.; ZUCCHI, R. Cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): differences between colonies, castes and age. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 589-595, 2009.

NUNES, L. A.; PASSOS, G. B.; CARVALHO, C. A. L.; ARAUJO, E. D. Size and shape in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera; Meliponini). **Brazilian Journal Biology**, v. 73, n. 4, p. 887-893, 2013.

NUNES-SILVA, P.; HRNCIR, M.; DA SILVA, C.I.; ROLDAO, Y.S.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The behaviour of *Bombus impatiens* (Apidae, Bombini) on tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill., Solanaceae) flowers: Pollination and Reward Perception. **Journal of Pollination Ecology**, v. 11, n. 5, p. 33-40, 2013.

NUNES-SILVA, P.; HRNCIR, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A polinização por vibração. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 140-151, 2010.

OLLERTON, J.; WINFREE, R., TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, n. 3, p. 321-326, 2011.

PEREIRA, F. de M. **Manual de Curadores de Germoplasma – Animal: Conservação de abelhas-sem-ferrão**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2012. 18 p.

PICCINI, C. D’ALESSANDRO, B.; ANTÚNEZ, K.; ZUNINO, P. Detection of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae* spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 8, p. 761–765, 2002.

PIRES, C. S. S.; PEREIRA, F. De M.; LOPES, M. T. Do R.; NOCELLI, R. C. F.; MLASPINA, O.; PETTIS, J. S.; TEIXEIRA, E. W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD?, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 422-442, 2016.

PITTS-SINGER, T. L.; CANE, J. H. The Alfalfa Leafcutting Bee, *Megachile rotundata*: The World's Most Intensively Managed Solitary Bee. **Annual review of entomology**, v. 56, p. 221-237, 2011.

POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W. E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.

POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NGO, H. T.; AIZEN, M. A.; BIESMEIJER, J. C.; BREEZE, T. D.; DICKS, L. V.; GARIBALDI, L. A.; HILL, R.; STTELE, J.; VANBERGEN, A. J. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, v. 540, p. 220-229, 2016.

RADER, R.; BARTOMEUS, I.; GARIBALDI, L. A.; GARRATT, M. P. D.; HOWLETT, B. G.; WINFREE, R.; CUNNINGHAM, S. A.; et al. Non-bee insects are

important contributors to global crop pollination, **PNAS**, v. 113, n. 1, p. 146-151, 2016.

RANGEL, J.; GIRESI, M.; PINTO, M. A.; BAUM, K. A.; RUBINK, W. L.; COULSON, R. N.; JOHNSTON, J. S. Africanização de uma abelha do mel feral (*Apis mellifera*) da população em South Texas: é que uma década faz a diferença? **Ecology Evolution**, v. 6, n. 7, p. 2158-2169, 2016.

RASMUSSEN, C.; CAMERON, S. A. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 99, n. 1, p. 206-232, 2010.

RIBIÈRE, M.; BALL, B. V.; AUBERT, M. Natural history and geographic distribution of honey bee viruses. In: AUBERT, M.; BALL, B. V.; FRIES, I.; MORITZ, R. F.; MILANI, N.; BERNARDINELLI, I. **Virology and the honey bee**, 1 edn, Edited by Luxembourg: European Communities 2008, p. 462.

ROHLF, J. F.; MARCUS, L. F. A revolution morphometrics. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 8, n. 4, p. 129-132, 1993.

ROSELINO, A. C.; HMCIR, M.; CRUZ-LANDIM, C.; GIURFA, M.; SANDOZ, C. J. Sexual dimorphism and phenotypic plasticity in the antennal lobe of a stingless bee *Melipona scutellaris*. **Journal of Comparative Neurology**, v. 523, p. 1461-1473, 2010.

ROULSTON, T. H.; GOODELL, K. The role of resources and risks in regulating wild bee populations. **Annual Review Entomology**, v. 56, p. 293-312, 2011.

RYABOV, E. V.; WOOD, G. R.; FANNON, J. M.; MOORE, J. D.; BULL, J. C.; CHANDLER, D.; MEAD, A.; BURROUGHS, N.; EVANS, D. J. Evans. A Virulent Strain of Deformed Wing Virus (DWV) of Honeybees (*Apis mellifera*) Prevails after *Varroa destructor*-Mediated, or In Vitro, Transmission. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 6, e1004230, 2014.

RYBA, S.; TITERAD, D.; HAKLOVA, M.; STOPKA, P. A PCR method of detecting American Foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in winter beehive wax debris. **Veterinary microbiology**, v. 139, n. 1-1, p. 193-196, 2009.

SANTOS, C. F.; FERREIRA-CALIMAN, M. J.; NASCIMENTO, F. S. An Alien in the Group: Eusocial Male Bees Sharing Nonspecific Reproductive Aggregations. **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 157, 2015.

SCHNEIDER, D. Insect Antennae. **Annual Review of Entomology**, v. 9, p. 103-122, 1964.

SEPTANIL, M. P. B.; MATEUS, S.; TURATTI, I. C.; NUNES, T. Mixed colonies of two species of congeneric stingless bees (Hymenoptera: Apinae, Meliponini) display environmentally-acquired and endogenously-produced recognition signals. **Physiological Entomology**, v. 37, n. 1, p. 72-80, 2012.

SILVA, M. C.; LOMANACO, C.; AUGUSTO, S. C.; KERR, W. E. Climatic and anthropic influence on size and fluctuating asymmetry of Euglossine bees (Hymenoptera, Apidae) in a semideciduous seasonal forest reserve. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 730-737, 2009.

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; LINS, A. C. da S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, da E. M. S.; FREITAS, B. M.; SANTOS, dos F. de A. R. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 507-511, 2006.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A.; ALMEIDA, E. A. **Abelhas Brasileiras. Sistemática e Identificação**. Araucária, Belo Horizonte, Brasil. 2002, 254 p.

SIQUEIRA, M. A criação tradicional de abelhas-sem-ferrão em potes de barro em Bonibal, Chapada Diamantina, Bahia. **Mensagem Doce**, n. 80, 2005.

SLAA, E. J. Population dynamics of a stingless bee community in the seasonal dry lowlands of Costa Rica. **Insectes Sociaux**, v. 53, p. 70-79, 2006.

SOUZA, A. R. S.; ARAÚJO, E. D.; GRAMACHO, K. P.; NUNES, L. A. Bee's morphometrics and behavior in response to seasonal effects from ecoregions. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, gmr.15027597, 2016.

SOUZA, B. de A.; CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M. de O.; DIAS, C. de S.; CLARTON, L. **Mundurí (*Melipona asilvai*): a abelha sertrosa**. (Série Meliponicultura 7), 2009. 46p.

TENTCHEVA, D.; GAUTHIER, L.; JOUVE, S.; CANABADY-ROCHELLE, L.; DAINAT, B.; COUSSERANS, F.; COLIN, M. E.; BALL, B. V.; BERGOIN, M. Polymerase chain reaction detection of Deformed wing virus (DWV) in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. **Apidologie**, v. 35, n. 4, p. 431-439, 2004.

TENTCHEVA, D.; GAUTHIER, L.; BAGNY, L.; FIEVET, J.; DAINAT, B.; COUSSERANS, F.; COLIN, M. E.; BERGOIN, M. Comparative analysis of Deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. **Apidologie**, v. 37, n. 1, p. 41-50, 2006.

TOFILSKI, A. Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honeybee subspecies. **Apidologie**, v. 39, n. 5, p. 558-563, 2008.

TOFILSKI, A. Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honeybee subspecies. **Apidologie**, v. 39, n. 5, p. 558-563, 2009.

UEIRA-VIEIRA, C.; ALMEIDA, L. O.; ALMEIDA, F. C. De; AMARAL, I. M. R.; BRANDEBURGO, M. A. M.; BONETTI, A. M. Scientific note on the first molecular detection of the acute bee paralysis virus in Brazilian stingless bees. **Apidologie**, v. 46, p. 628-630, 2015.

VANENGELSDORP, D.; HAYES JR. J.; UNDERWOOD, R. M.; CARON, D.; PETTIS, J. S. A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. **Journal of Apicultural Research**, v. 50, p.1-10, 2011.

VANENGELSDORP, D.; HAYES JR. J.; UNDERWOOD, R. M.; PETTIS, J. S. A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, p. 7-14, 2010.

VANENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B. K.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R.; TARPY, D. R.; PETTIS, J. S. Colony collapse disorder: a descriptive study. **PloS One**, v. 4, e6481, 2009.

VANENGELSDORP, D.; HAYES JR. J.; UNDERWOOD, R. M.; PETTIS, J. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. **PloS One**, v. 3, e4071, 2008.

VANENGELSDORP, D.; UNDERWOOD, R.; CARON, D.; HAYES JR., J. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006–2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America. **American Bee Journal**, v. 147, p. 599-603, 2007.

VENTURIERI, G. C.; BAQUERO, P. L.; COSTA, L. **Formação de Minicolônias de Uruçu-Cinzenta [*Melipona fasciculata* Smith 1858 (Apidae, Meliponini)]**. Belém, PA: Embrapa Amzônia Oriental, 2015, 28p.

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

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

WALDSCHMIDT, A. M.; MARCO-JUNIOR, P.; BARROS, E. G.; CAMPOS, L. A. O. Genetic Analysis of *Melipona quadrifasciata* LEP. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with rapd markers. **Journal Brazilian Biological**, v. 62, n. 4B, p. 923-928, 2002.

WILSON, E. O. **The Insect Societies**. Cambridge, Massachusetts: Belknap Press, 1971, 548 p.

WINFREE, R.; AGUILAR, R.; VÁZQUEZ, D. P.; LEBUHN, G.; AIZEN, M. A. A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. **Ecology**, v. 90, n. 8, p. 2068-2076, 2009.

WINSTON, M. L. **The biology of the honey bee**. Cambridge, MA: Havard University Press, 1991. 281p.

YUE, C.; GENERSCH, E. RT-PCR analysis of Deformed Wing Virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). **Journal of General Virology**, v. 86, n. 12, p. 3419-3424, 2005

ARTIGO 1

IDENTIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES ISOLADAS DE *Melipona subnitida* DUCKE, 1910 (APIDAE: MELIPONINI) EM SUA ÁREA DE OCORRÊNCIA NATURAL¹

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico *Journal of Hymenoptera Research*, em versão na língua inglesa.

**Identificação de populações isoladas de *Melipona subnitida* Ducke, 1910
(Apidae: Meliponini) em sua área de ocorrência natural**

Resumo: A perda de diversidade entre abelhas eussociais e a extinção de suas populações tornaram-se uma das principais preocupações no mundo. O declínio das populações de *Melipona subnitida*, tem aumentado devido a atividades com as suas populações como a extração predatória de ninhos, destruição dos seus habitats e variações climáticas. Conhecer as populações em sua área de ocorrência e isoladas pode dar uma visão geral das estratégias de monitoramento e conservação desta espécie. Neste estudo, utilizando a morfometria geométrica, foram analisadas dez colônias de *M. subnitida* oriundas do Estado do Piauí, Brasil. Posteriormente os resultados obtidos nestas colônias foram comparados com dados anteriormente publicados para esta espécie, de colônias oriundas dos Estados de Alagoas (31 colônias), Bahia (14 colônias) e Pernambuco (28 colônias), estados do Nordeste brasileiro. Avaliou-se uma possível existência de populações disjuntas devido as diferenças entre as regiões de ocorrência. As análises morfométricas sugeriram divergência dentro das populações de *M. subnitida* do Estado do Piauí. Observou-se uma disjunção entre as populações do Piauí e os demais estados. Essas diferenças foram associadas principalmente às divergências morfoclimáticas e a distância geográfica. A presença de perfis morfométricos em populações de diferentes biomas indica a necessidade de atenção especial nas estratégias de conservação da espécie de modo local e não generalizado, uma vez que ocorrem diferenças de acordo com a origem do inseto.

Palavras-chave: Jandaíra, variação populacional, abelha-sem-ferrão.

**Identification of isolated populations of *Melipona subnitida* Ducke, 1910
(Apidae: Meliponini) in their natural occurrence area**

Abstract: The loss of diversity among social bees and the extinction of their populations has become a major concern in the world. The decline of the populations of *Melipona subnitida* has increased due to activities with their populations such as the predatory extraction of nests, destruction of their habitats and climatic variations. Knowing the populations in their area of occurrence and isolated can give an overview of the strategies of monitoring and conservation of this species. In this study, using the geometric morphometry, ten colonies of *M. subnitida* from the State of Piauí, Brazil, were analyzed. The results obtained in these colonies were compared with data previously published for this species, from colonies from the states of Alagoas (31 colonies), Bahia (14 colonies) and Pernambuco (28 colonies), states of Northeast Brazil. A possible existence of disjoint populations was evaluated due to the differences between the regions of occurrence. The morphometric analysis suggested divergence within the populations of *M. subnitida* of the State of Piauí. It was observed a disjunction between the populations of Piauí and the other states. These differences were mainly associated with morpho-climatic divergences and geographical distance. The presence of morphometric profiles in populations of different biomes indicates the need for special attention in conservation strategies of the species in a local rather than generalized way since differences occur according to the origin of the insect.

Key words: Jandaíra, population variation, stingless bee.

INTRODUÇÃO

A Tribo Meliponini abrange as abelhas-sem-ferrão, dentre as quais o gênero *Melipona* é o mais abundante em espécies (Michener, 2007, Camargo e Pedro, 2013). *Melipona subnitida* conhecida popularmente como Jandaíra, endêmica do Nordeste brasileiro, é uma das abelhas nativas sem ferrão mais criadas racionalmente nessa região (Carvalho et al., 2014). Esta abelha é considerada um importante polinizador em culturas agrícolas e plantas nativas da Caatinga (clima semiárido e vegetação xerófila) (Andrade-Lima, 1981), e excelente na produção de mel e cera (Bruening 2006, Lopes et al., 2007).

A abelha Jandaíra apresenta registro de ocorrência nos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte (Camargo e Pedro, 2013). Apesar desses autores citarem a ocorrência da espécie também no Estado de Sergipe, incursões à campo não confirmaram esse registro (Informação Pessoal Dr. Edilson Divino de Araújo, 2017). Esta espécie nidifica preferencialmente em troncos ocos de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett (Burseraceae) e *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz (Fabaceae) (Martins et al., 2004, Bruening, 2006), onde mais de 75% dos ninhos já registrados foram nessas duas espécies botânicas (Martins et al., 2004, Barbosa 2013).

Devido à importância ecológica e econômica da jandaíra (Jaffé et al., 2015, Koffler et al., 2015), estudos populacionais, de comportamento (Koedam et al., 1999, Maia-Silva et al., 2013, 2016); identificação de nova estrutura para nidificação (Carvalho et al., 2014) e estrutura populacional utilizando ferramentas da biologia molecular têm sido intensificados para esta espécie (Bonatti et al., 2014),.

Recentemente a morfometria geométrica foi utilizada para estudos específicos para caracterizar populações de *M. subnitida* de diferentes regiões de sua distribuição natural (Bonatti et al., 2014, Lima et al., 2014; 2016). Embora as pesquisas sobre a população de abelhas tenham sido iniciadas há algum tempo, os estudos sobre a estrutura populacional de jandaíra ainda são escassos, especialmente de populações localizadas nos limites de distribuição da espécie e locais considerados isolados para suas populações.

Estes estudos são importantes para entender aspectos biológicos dessas populações e promover a sua conservação (Câmara et al., 2004, Bonatti et al., 2014). Dessa forma, a caracterização de populações disjuntas se torna importante por gerar informações sobre migração, colonização, fragmentação de habitats e conservação da biodiversidade.

O objetivo deste trabalho foi identificar a variação populacional de *M. subnitida* na sua área de ocorrência natural, provenientes do Estado do Piauí, avaliando se estas podem ser consideradas disjuntas de populações em sua área de ocorrência.

MATERIAL E MÉTODOS

Dez diferentes colônias de *M. subnitida* distribuídas em seis meliponários entre cinco cidades do estado do Piauí, Brasil (Tabela 1), em cada colônia, foram coletadas 10 operárias em dezembro de 2014.

Tabela 1. Origem, altitude e localização geográfica das amostras de *Melipona subnitida* no Estado do Piauí, Brasil.

Localidade	Altitude (m)	Latitude (S)	Longitude (O)	Número de colônias	Número de abelhas
Cajueiro da Praia	27	03°04'44,3"	41°26'10,6"	1	10
Camurupim	18	03°04'44,2"	42°26'10,5"	3	30
Parnaíba	63	02° 54' 18"	41° 46' 37"	2	20
Piracuruca	141	03°57'18,9"	41°45'00.1"	2	20
Sigefredo Pacheco	290	04°54'47,9"	41°44'02.2"	2	20

As abelhas coletadas foram transportadas para o laboratório do Grupo de Pesquisa Insecta, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, onde as asas anteriores direitas foram removidas e dispostas entre lâminas para microscopia e fotografadas com lupa microscópica (Leica® S8 APO) com câmera acoplada (Leica® DFC 295) para as análises dos padrões de venação. As fotografias foram transformadas no software tpsUtil versão 1.40 (Rohlf, 2008a), e dez marcos anatômicos foram marcados na junção das nervuras de cada asa utilizando o

software tpsDig versão 2.17 (Rohlf 2008b) para mensuração das medidas (Figura 1).

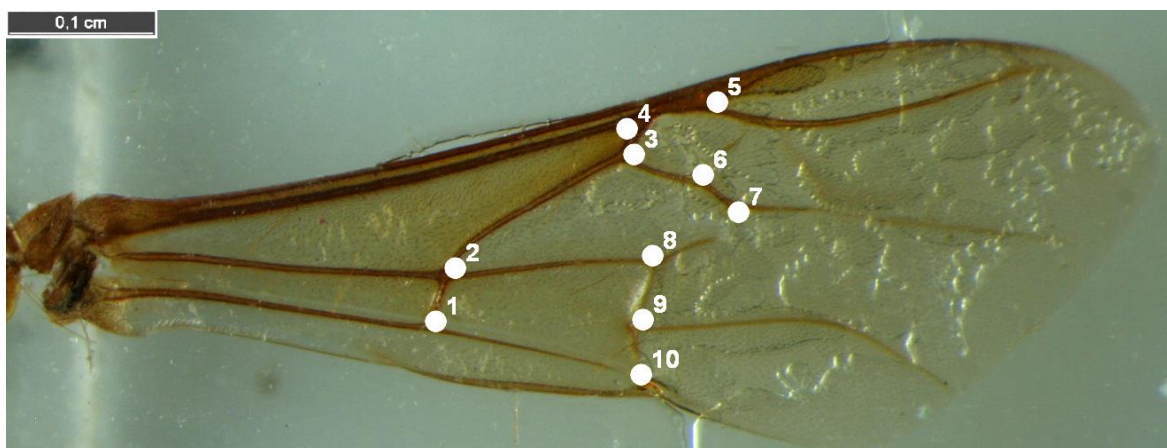


Figura 1. Asa anterior direita de *Melipona subnitida* com os 10 marcos anatômicos localizados na junção das veias, utilizados na análise morfométrica.

Os dados morfométricos em populações de *M. subnitida* oriundas de diferentes cidades dos estados de Alagoas, Bahia e Pernambuco (Lima et al., 2014) que estão descritas na Tabela 2 foram utilizadas como parâmetro de comparação.

Tabela 2. Origem e localização das amostras de *Melipona subnitida* nos estados de Alagoas, Bahia e Pernambuco (Lima et al., 2014).

Localidade/Estado	Altitude (m)	Latitude (S)	Longitude (O)	Número de colônias	Número de abelhas
Água Banca (AL)	380	9°10'24,7"	37°51'41,9"	9	121
Cumaru (PE)	348	8°1'58,5"	35°45'3,11"	6	55
Exu (PE)	887	7°20'22,6"	39°54'58,5"	3	30
Joá (BA)	243	9°31'08,8"	38°25'36,7"	6	83
Mata Grande (AL)	424	9°11'09,3"	37°50'09,8"	12	150
Passira (PE)	160	7°55'37,8"	35°30'14,0"	5	47
Riacho das Almas (PE)	413	8°3'40,7"	35°49'9,62"	6	60
São José (BA)	243	9°39'04,8"	38°22'43,2"	8	102
Taquaritinga do Norte (PE)	785	7°56'14,1"	36°7'05,7"	8	32

As análises estatísticas foram realizadas utilizando uma média por colônia. Para cada colônia foi utilizado um número médio entre 10 a 15 asas, a depender da disponibilidade de indivíduos por colônias. Por meio da Análise de Componentes Principais, da Análise de Variáveis Canônicas, da Distância de D²

de Mahalanobis e da Distância de Procrustes, os dados obtidos foram usados como variáveis e confrontados. Foram realizadas análises comparativas dentro das populações de abelhas coletadas no Estado do Piauí e entre estas e as populações de *M. subnitida* dos estados de Alagoas, Bahia e Pernambuco. As análises foram realizadas utilizando o programa MorphoJ versão 1.03 (Klingenberg, 2011). Além disso, foram realizados testes de Mantel e análises de agrupamento, pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) utilizando o Software Past 2.17.

RESULTADOS

Populações de *M. subnitida* do Estado do Piauí

Os três primeiros componentes principais explicaram 79,11% da variação total entre as populações do Piauí: CP1= 33,94%; CP2= 25,96%, PC3= 19,20% (Figura 2).

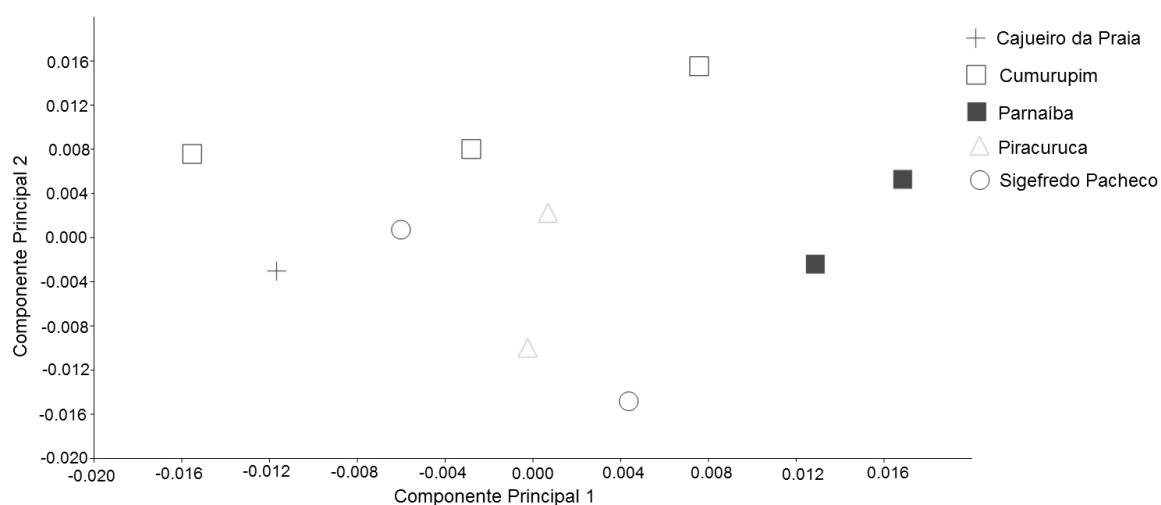


Figura 2. Dispersão gráfica das seis populações de *Melipona subnitida* em relação a eixos cartesianos estabelecidos por componentes principais (ACP1, ACP2) obtidas a partir da forma da asa.

Com base na distância de Mahalanobis e Procrustes (Tabela 3), foi possível observar diferença significativa ($P < 0,0001$) onde a maior distância ocorreu entre as populações dos municípios de Parnaíba e Cajueiro da Praia, enquanto a menor distância morfológica ocorreu entre as populações dos

municípios de Sigefredo Pacheco e Piracuruca com valor de dissimilaridade de 2,11.

Tabela 3. Distâncias de Mahalanobis (metade superior da matriz) e distância Procrustes (metade inferior da matriz) entre as populações de *Melipona subnitida* do Estado do Piauí, Brasil, calculadas a partir da análise de variável canônica.

	CPR	CUM	PAR	PIR	SIG
CPR		2,521	4,801	3,522	2,674
CUM	0,017		4,218	3,312	2,824
PAR	0,029	0,022		2,866	3,106
PIR	0,019	0,019	0,019		2,110
SIG	0,014	0,018	0,019	0,012	

Legenda: CPR- Cajueiro da Praia; CUM- Cumurupim; PAR- Parnaíba; PIR- Piracuruca; SIG- Sigefredo Pacheco.

Por meio do dendrograma baseado em UPGMA (Figura 3) foi possível observar a formação de quatro grupos entre essas populações. É importante ressaltar que três grupos são formados por populações localizadas na região litorânea do Piauí, que mesmo estando próximos geograficamente não são agrupados entre si. O Coeficiente de Correlação Coofenética (CCC) foi de 76% indicando uma boa representação gráfica.

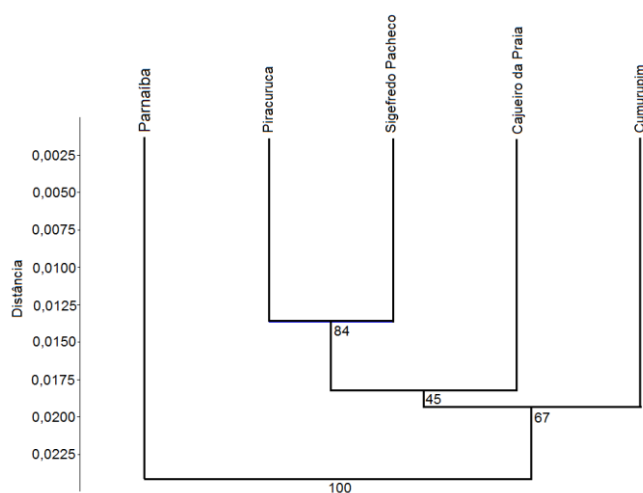


Figura 3. Dendrograma gerado pelo UPGMA com as distâncias de Procrustes a partir de médias entre colônias de *Melipona subnitida* em cinco localidades distintas estado do Piauí, Brasil (CCC = 76%).

Populações de *M. subnitida* dos estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco e Piauí

A Análise de Variável Canônica mostra a formação de três grupos, onde há sobreposição entre as populações da Bahia e Pernambuco, com o primeiro componente principal explicando 61,42% da variação total entre os indivíduos (Figura 4). No primeiro eixo canônico o Estado do Piauí se difere do Estados de Bahia e Alagoas e no segundo Alagoas se difere de Bahia e Pernambuco. Essa sobreposição pode está associada semelhança morfoclimáticas e a proximidade geográfica entre essas localidades.

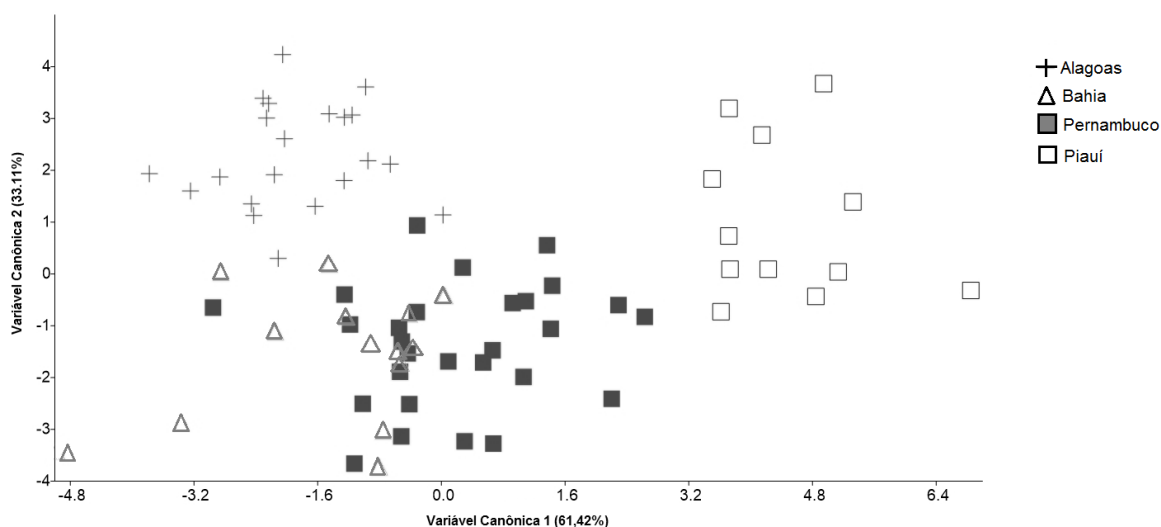


Figura 4. Dispersão gráfica de quatro populações de *Melipona subnitida* em relação a eixos cartesianos estabelecidos por variáveis canônicas (VC1 VC2) obtidas a partir da forma das asas.

As distâncias de Mahalanobis variaram de 1,40 (entre Bahia e Pernambuco) para 3,78 (entre Alagoas e Piauí), enquanto as distâncias de Procrustes variaram de 0,01 (entre Bahia e Pernambuco) e 0,02 (entre Alagoas e Piauí) mostrando que a menor distância morfológica ocorreu entre os estados de Bahia e Pernambuco enquanto a maior distância foi registrada entre os estados de Alagoas e Piauí ($P < 0,0001$).

No teste de validação cruzada as classificações que apresentaram maior êxito foram entre Alagoas (98,0%) e Piauí (99,0%); Bahia (94,5%) e Piauí (98,0%) e Pernambuco (92,8%) e Piauí (95,0%) significativamente diferentes entre si

($P < 0,0001$) definindo corretamente grande porcentagem dos indivíduos dentro de seus respectivos grupos. As populações de Bahia (71,8%) e Pernambuco (77,6%) foram as que tiveram menor índice de acerto na classificação dos indivíduos em seus grupos, apesar dessas populações apresentam alguma semelhança em sua morfologia e são significativamente diferentes ($P < 0,0001$). Na validação cruzadas as taxas de classificação correta para as populações de Alagoas, Bahia e Pernambuco foram de 85,0%, 87,0% e 88,9% respectivamente.

O teste de Mantel revelou que não há significância entre as correlações de tamanho x altitude e forma x altitude ($P > 0,05$). Por outro lado, tanto o tamanho ($P < 0,0001$) quanto forma ($P < 0,0001$) estavam significativamente diferentes quando correlacionados à distância geográfica em populações de *M. subnitida*.

No dendograma de proximidade morfológica (UPGMA), as populações das localidades do Piauí foram agrupadas em um ramo e as populações pertencentes as localidades dos Estados de Alagoas, Bahia e Pernambuco foram agrupadas em outro ramo. No ramo das populações do Piauí a subdivisão foi mantida em relação a análise individual do estado mostrando que independentemente de análises entre esses grupos, essas populações são diferentes das demais. As populações de Alagoas, Bahia e Pernambuco foram agrupadas em sub-ramos. O coeficiente de correlação cofenética foi de 85% indicando que o dendograma é uma boa representação gráfica (Figura 5) .

contexto, Vijayakumar e Jayaraj (2013), mostraram que fatores como temperatura e umidade relativa afetaram a diversidade morfológica de abelhas-sem-ferrão da Índia.

A diferenciação evidenciada através das populações mais próximas sugere que *M. subnitida* do Estado do Piauí esteja em uma fase de diferenciação populacional apesar da curta distância geográfica. A diferença morfológica dessa população pode ser considerada linhagens evolutivas independentes, onde o padrão da diversificação corresponde ao mecanismo de isolamento incluindo as diversidades morfoclimáticas da região (Bonatti et al., 2014).

Estudo semelhante mostrou que populações de *Bombus ephippiatus*, apresentaram divergência morfológica dentro de suas populações em toda área de sua distribuição geográfica com evidências de que essa espécie apresenta linhagens evolutivas independentes (Duennes et al., 2016). Hurtado-Burillo et al. (2016) também encontraram diferenças fenóticas significativas utilizando caracteres de asas em populações de *Scaptotrigona mexicana* dentro de uma mesma área de distribuição.

Populações de *M. subnitida* dos estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco e Piauí

Os resultados sugerem que há formação de grupos que separam as populações que ocupam uma área considerada isolada. Esta conclusão baseia-se na separação entre as populações do Estado do Piauí das populações dos Estados de Alagoas, Bahia e Pernambuco. A variabilidade morfológica encontrada entre as populações de Alagoas e Piauí podem ser facilmente explicadas por uma distinção referente as características ambientais. Alagoas está localizado na região do Sertão nordestino, caracterizado por um clima semiárido (muito quente com chuvas escassas) e vegetação preponderante de Caatinga (CPRM, 2014). E o Piauí está localizado na região de Meio-Norte, com clima tropical úmido e períodos de chuva variados (CEPRO, 2016).

Em estudo realizado entre populações de *Tetragonula iridipennis* os contrastes ambientais influenciaram no desenvolvimento de variação morfológicas (Francoy et al., 2015), o mesmo pode estar acontecendo entre as populações de *M. subnitida*.

A formação de grupos que separam as populações do Piauí das populações dos demais estados deixa claro que existe uma separação natural desses grupos por variação morfoclimática com características ambientais diferentes, sugerindo que as populações do Piauí são populações disjuntas. Resultados semelhantes foram observados em colônias de *M. scutellaris* amostradas no Estado da Bahia a partir de regiões com diferentes condições ambientais (Nunes et al., 2007). Em outro estudo com *M. scutellaris* também foi observado que as populações oriundas de dois fragmentos, área de mata decidual isolada por está contornada por uma vasta área de caatinga e outra oriunda de fragmento de Mata Atlântica que não encontra-se isolada (Lima-Junior et al., 2015).

Considerando a divergência entre essas populações, também é possível associar a uma variação biogeográfica, além do isolamento geográfico entre os locais de origem das populações, Riacho das Almas e Parnaíba (878 km em linha reta), populações de abelhas com maiores distâncias geográficas tem maiores índices de variabilidade morfológica, uma vez que a distância de enxameação dos meliponíneos é curta (Kerr et al., 1996) e a distância de vôo em abelhas-sem-ferrão está associada ao tamanho do corpo e apresentam distância máxima de vôo de 2 km de raio da sua colônia de origem (Araújo et al., 2004).

A distância geográfica entre esses ambientes pode ser considerada como fator que impede a troca de material genético entre as colônias, e devido a distância geográfica, a probabilidade de ter ocorrido troca entre colônias pelos produtores é praticamente nula. Semelhante aos nossos resultados para *M. subnitida*, a relação entre distância geográfica, tamanho e forma da asa de abelhas, foram encontradas para *M. scutellaris* Letreille (Nunes et al., 2007); *M. subnitida* (Bonatti et al., 2014; Lima et al., 2014); *M. mandacaia* (Prado-Silva et al., 2016) e *M. quadrifasciata* (Araujo et al., 2016).

CONCLUSÃO

Os resultados apontam para a disjunção entre as populações de *M. subnitida* estudadas. As populações do Estado do Piauí mostram que essas populações estão isoladas entre si e quando comparadas com populações de

outras regiões, essas diferenças entre forma e tamanho podem ser associadas à distância geográfica e também as diferenças entre as variações morfoclimáticas da região onde cada população se encontra.

REFERÊNCIAS

Andrade-Lima D (1981) The Caatinga dominium. *Revista Brasileira de Botânica* 4: 149-153.

Araújo ED, Costa M, Chaud-Neto J, Fowler HG (2004) Body size and flight distance in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): inference of flight range and possible ecological implications. *Brazilian Journal Biology* 64:563-568.

Araujo ED, Oliveira RG, Calazans HCM, França CCS, Santos V, Ribeiro GT, Jain S, Batista MVA, Nunes LA (2016) Risk of local extinction and genetic diversity of *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) in a possible Northeastern limit of its distribution in Brazil. *Sociobiology* 63(2): 804-812.

Barbosa FM, Alves RMO, Souza BA, Carvalho CAL (2013) Nest architecture of the stingless bee *Geotrigona subterranea* (Friese, 1901) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Biota Neotropical* 13:147-152.

Bonatti V, Simões ZLP, Franco FF, Francoy TM (2014) Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. *Naturwissenschaften* 101:17-24.

Bruening H (2006) *Abelha Jandaíra*. Natal: SEBRAE/RN, 138 p.

Câmara JQ, Souza AH, Vasconcelos WE, Freitas RS, Maia PHS, Almeida JC, Maracajá PB (2004) Estudos de Meliponíneos, com ênfase a *Melipona subnitida* D. No município de Jandaíra, RN. *Revista de Biologia e Ciência da Terra* 4:20.

Camargo JMF, Pedro SRM (2013) Meliponini Lepeletier, 1836. In.: J.S Moure, D. Urban GAR. Melo (Orgs) Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acessado em 12 de novembro de 2016.

Carvalho AT, Koedam D, Imaratriz-Fonseca VL (2014) Register of a New Nidification Substrate for *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): The Arboreal Nest of the *Termite Constrictotermes cyphergaster* Silvestri (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae). *Sociobiology* 61(4):428-434, 2014.

Fundação Centro de Pesquisas Econômicas e Sociais do Piauí- Disponível em: <http://www.cepro.pi.gov.br/index.php>>. Acessado em 20 de outubro de 2016.

CPRM: Serviço Geológico do Brasil <<http://www.cprm.gov.br/>>. Acessado em: 25 de novembro de 2016.

Duennes MA, Petranek C, de Bonilla, EP. D. Mérida-Rivas, J, Martinez-López O Sagot P, Cameron, S. A. (2016). Population genetics and geometric morphometrics of the *Bombus ephippiatus* species complex with implications for its use as a commercial pollinator. *Conservation Genetics* DOI: 10.1007/s10592-016-0903-9.

Francoy TM, Bonatti V, Viraktamath S Rajankar BR (2015) Wing morphometrics indicates the existence of two distinct phenotypic clusters within population of *Tetragonula iridipennis* (Apidae: Meliponini) from India. *Insect Socioux* 63:2015.

Hurtado-burillo M, Jara I May-Itza w de J, Quezada-Euán J J, Ruiz C, Rúa P. de la (2016) A geometric morphometric and microsatellite analyses of *Scaptotrigona mexicana* and *S. pectoralis* (Apidae: Meliponini) sheds light on the biodiversity of Mesoamerican stingless bees. *Journal of Insect Conservation* 20:753-764.

Jaffé R, Pope N, Carvalho AT, Maia UM, Blochtein B, Carvalho CAL, Carvalho-Zilse GA, Freitas BM, Menezes C, Ribeiro MF, Venturieri G, Imperatriz-Fonseca VL (2015). Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize stingless beekeeping. PLoS ONE 10. n.3:e0121157. doi:10.1371/journal.pone.0121157.

Kerr WE, Carvalho GA e Nascimento V.A. (1996). Abelha Uruçu: Biologia Manejo e Conservação. Belo Horizonte- MG, Ancagau. 143p.

Klingenberg CP (2011) MorphoJ: In integrated software package for geometric morphometrics. Molecular Ecology Resources 11:353–357.

Koedam D, Contrera FAL, Imperatriz-Fonseca, VL (1999) Clustered male production by workers in the stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponinae). Insectes Sociaux (Printed ed) 46(4).

Koffler S, Menezes C, Menezes PR, Kleinert AMP, Imperatriz-Fonseca VL, Pope N, Jaffé R (2015) Temporal variation in honey production by the stingless bee *Melipona subnitida* (Hymenoptera: Apidae): long-term management reveals its potential as a commercial species in Northeastern Brazil. Journal Economic Entomology 108 (3): 858-867.

Lima CBS, Nunes, L A, Ribeiro MF, Carvalho CAL (2014) Population Structure of *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) at the Southern Limit of its Distribution Based on Geometric Morphometrics of Forewings. Sociobiology 61(4): 478-482.

Lima CBS, Nunes, L A, Carvalho CAL Ribeiro, Ribeiro MF, Souza BA, Silva CB (2016) Morphometric differences and fluctuating asymmetry in *Melipona subnitida* Ducke 1910 (Hymenoptera: Apidae) in different types of housing, Brazilian Journal of Biology 76:845-850.

Lima-Junior C, Carvalho CAL, Nunes LA, Santos W da S. Variação morfométrica entre populações disjuntas de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). (2015) *Interciencia* 60(5):324-329.

Lopes MT do R, Silva JO, Pereira F de M, Camargo RCR de, Vieira-Neto JM, Ribeiro VQ (2007) Atividade de Vôo de Abelhas Jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke, 1910) Instaladas em dois modelos de colméia, (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/ INFOTECA-E) 20p.

Maia-Silva C, Hrncir M, Imperatriz-Fonseca VL, Schorkopf DLP (2016) Stingless bees (*Melipona subnitida*) adjust brood production rather than foraging activity in response to changes in pollen stores. *Journal of Comparative Physiology. Journal of Comparative Physiology* 1:10.

Maia-Silva C, Hrncir M, koedam D, Machado RJP, Imperatriz-Fonseca VL (2013) Out with the garbage: the parasitic strategy of the mantisfly *Plega hagenella* mass-infesting colonies of the eusocial bee *Melipona subnitida* in northeastern Brazil. *Naturwissenschaften* 100:101-105.

Martins CF, Cortopassi-Laurino M, Koedam D, Imperatriz-Fonseca VL (2004) Espécies arbóreas utilizadas para nidificação por abelhas-sem-ferrão na caatinga (Seridó, PB; João Câmara, RN). *Biota Neotropical* 4(2):1-8.

Michener, C.D. (2007). *The Bees of the World*. 2nd Ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 953 p.

Nunes LA, Pinto MFFC, CarneiroP, Pereira DG, Waldschmidt AM (2007) Divergência genética em *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae) com base em caracteres morfológicos. *Bioscience Journal* 23:1-9.

Prado-Silva A, Nunes LA, Alves RM de O, Carneiro PLS, Waldschmidt AM (2016) Variation of fore wing shape in *Melipona mandacaia* Smith, 1863 (Hymenoptera,

Meliponini) along its geographic range. *Journal of Hymenoptera Research* 48:85-94.

Rohlf FJ (2008a) tpsUtil. For windows version 1.40. Department of Ecology and Evolution. State University of New York. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>. Acessado em 10 de junho de 2013.

Rohlf FJ (2008b) tpsDig. For windows version 2.17. Department of Ecology and Evolution. State University of New York. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>. Acessado em Acessado em 10 de junho de 2013.

Vijayakumar K, Jayaraj R (2013) Geometric morphometry analysis of three species of stingless bees in India. *International Journal for Life Sciences and Educational Research* 1(2):91-95.

ARTIGO 2

CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL DE *Melipona fasciculata* SMITH, 1854 (HYMENOPTERA, APIDAE) NA REGIÃO MEIO NORTE DO BRASIL¹

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico *Apidologie*, em versão na língua inglesa.

CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL DE *Melipona fasciculata* SMITH, 1854 (HYMENOPTERA, APIDAE) NA REGIÃO MEIO NORTE DO BRASIL

RESUMO: *Melipona fasciculata* é uma importante espécie de abelha-sem-ferrão, criada principalmente para produção de mel. Nos últimos anos além da produção de mel ela tem sido utilizada com sucesso na polinização de plantas que necessitam de polinização por vibração. O manejo inadequado de colônias e a fragmentação de locais de nidificação podem diminuir consideravelmente as populações de *M. fasciculata* e conseqüentemente levar a perda de diversidade dessa espécie. O conhecimento sobre a estrutura das suas populações pode contribuir com o entendimento sobre sua distribuição geográfica e adaptações de acordo com as variações de clima, relevo e vegetação. Foram coletadas abelhas operárias de seis municípios localizados no Semiárido Piauíense e utilizadas técnicas de morfometria geométrica em suas asas anteriores para verificar diversidade fenotípica entre local de amostragem e morfologia das asas. Foram observadas correlações significativas entre variáveis (forma e tamanho de asas e distância geográfica) ($P < 0,000$), sugerindo que a divergência entre as populações foi devido a distância geográfica e fatores ambientais entre os locais de amostragem. A fragmentação dos habitats de populações de *M. fasciculata* tem dificultado o fluxo gênico entre as suas populações, dessa forma, espera-se que os resultados desse trabalho possam colaborar com a criação de meios viáveis para a conservação dessa espécie em sua área de ocorrência natural, por meio da conscientização sobre criação racional e manejo adequado a fim de preservar a sua diversidade genética e contribuir para a geração de renda aos meliponicultores.

Palavras-Chave: Meliponicultura, abelha tíuba, morfometria geométrica.

The characterisation of the population of the *Melipona fasciculata* Smith, 1854 (Hymenoptera, Apidae) in the Meio Norte region of Brazil

ABSTRACT: *Melipona fasciculata* is an important species of bee-stinging, mainly created for honey production. In recent years besides honey production it has been successfully used in pollinating plants that require vibration pollination. Poor management of colonies and fragmentation of nesting sites can considerably reduce populations of *M. fasciculata* and consequently lead to loss of diversity of this species. Knowledge about the structure of their populations can contribute to the understanding of their geographical distribution and adaptations according to variations of climate, relief and vegetation. Worker bees were collected from six municipalities located in the semi - arid region of Piauí and geometric morphometry techniques were used in their anterior wings to verify phenotypic diversity between sampling sites and wing morphology. Significant correlations were observed between variables (shape and size of wings and geographic distance) ($P < 0.000$), suggesting that the divergence among populations was due to geographic distance and environmental factors between the sampling sites. The fragmentation of the habitats of populations of *M. fasciculata* has hampered gene flow among their populations, so it is expected that the results of this work may contribute to the creation of viable means for the conservation of this species in its natural occurrence area. Through awareness of rational breeding and proper management in order to preserve their genetic diversity and contribute to the generation of income to meliponicultures.

Key words: Meliponiculture, tiuba bee, geometric morphometrics.

INTRODUÇÃO

Por meio da polinização as abelhas-sem-ferrão realizam um papel significativo na manutenção dos ecossistemas e na produção agrícola na região Neotropical (Slaa et al. 2006; Heard 1999). No entanto, atividades como o desmatamento, principalmente pela derrubada de árvores utilizadas como locais de nidificação, a exploração predatória de ninhos de abelhas e o manejo inadequado em colônias (Silva 2005; Brown e Paxton 2009) tornam-se uma grande preocupação.

Melipona fasciculata conhecida popularmente como tiúba ou uruçú-cinzenta, ocorre entre Norte e Nordeste do Brasil, entre os Estados do Maranhão, Mato Grosso, Pará, Piauí e Tocantins (Camargo e Pedro 2013). Essa espécie é importante na produção de mel (Venturieri et al. 2003) chegando a produzir entre 3,5 litros/colônia/ano até 7 litros/colônia/ano. Além de uma excelente produtora de mel, tiúba também tem sido utilizada na polinização de solanaceas em casas de vegetação (Nunes-Silva et al. 2013) e em ambientes abertos foram observadas como boas polinizadoras em culturas de açaí, manga, melão, melancia, dentre outras (Slaa et al. 2006; Venturieri et al. 2012).

Considerando a importância econômica, social e ecológica de *M. fasciculata* na sua região de ocorrência natural, estudos sobre seu comportamento e produtividade (Venturieri et al. 2015), e principalmente sobre caracterização populacional devem ser realizados para melhor entender as populações e promover a sua conservação.

A morfometria geométrica tem se mostrado eficaz na identificação e avaliação da diversidade de populações (Nunes et al., 2013; Lima et al., 2014; Lima-Júnior et al., 2015; Araújo et al., 2016), na detecção de relações entre populações de animais e suas localizações geográficas (Klingenberg 2015). Utilizando coordenadas cartesianas essa técnica identifica configurações de referência em vários caracteres morfológicos (Klingenberg 2002), e fornecem posições relativas de cada ponto tornando possível a reconstrução da identificação de formas (Rohlf, Marcus, 1993; Rohlf 1998).

O estudo sobre variações em populações de abelhas utilizando dados morfológicos, comparando característica entre espécies e populações (Garay,

Dias 2001; Lima Júnior et al. 2015; Lima et al. 2014) são geralmente realizados utilizando, características da asa, devido à sua alta herdabilidade e por não sofrerem alterações ambientais (Diniz-Filho, Bini 1994). Uma provável desvantagem dessa técnica é que as estruturas biológicas a serem estudadas precisam estar completamente intactas. No entanto, essa desvantagem não é considerada um fator crítico (Lyra et al. 2010).

Embora pesquisas sobre população de abelhas tenham sido iniciadas há algum tempo, os estudos sobre estrutura populacional de abelhas-sem-ferrão especialmente em sua área de ocorrência natural, podem ser considerados escassos. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi caracterizar as populações de *M. fasciculata* em seis municípios da região Semiárida do Estado do Piauí com base na morfometria geométrica das asas anteriores.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados 164 operárias oriundas de 17 colônias de *M. fasciculata*, distribuídas em sete meliponários entre seis municípios do Estado do Piauí, com diferentes distâncias geográficas (Tabela 1) consideradas de ocorrência natural da espécie. As coletas foram realizadas em dezembro de 2014 (Tabela 2, Figura 1).

Tabela 1. Distância geográfica em linha reta em quilômetros (km) entre os pares de municípios onde foram coletadas amostras de *Melipona fasciculata* da região Meio Norte do Brasil.

	Distância Geográfica (Km)				
	ITA	MDP	PIR	TER	URU
GUA	284	250	120	182	213
ITA		525	330	462	107
MDP			210	70	463
PIR				164	292
TER					395

Legenda: GUA: Guadalupe; ITA: Itaueira; MDP: Murici dos Portelas; PIR: Piracuruca; TER: Teresina; URU: Uruçuí.

Tabela 2. Origem e localização geográfica das amostras de *Melipona fasciculata* da região Meio Norte do Brasil.

Localidade	N	Nº de Colônias	Coordenadas Geográfica	Altitude (m)	Clima/Relevo
Guadalupe	18	2	05°02'18,7"/42°48'07,0"	142	Tropical /Cerrado
Itaueira	10	1	07°36'14,6"/43°01'30,0"	260	Tropical semiárido/ Cerrado
Murici dos Portelas	28	3	03°01'09,9"/41°46'55,6"	77	Tropical /Planície litorânea
Piracuruca	58	6	04°55'10,5"/41°43'13,6"	291	Tropical /Meio Norte
Teresina	20	2	03°30'33,2"/42°11'40,4"	106	Tropical /Meio Norte
Uruçuí	30	3	06°48'23,6"/43°34'41,0"	281	Tropical /Cerrado

Legenda: N: número de operárias coletadas por localidade visitada

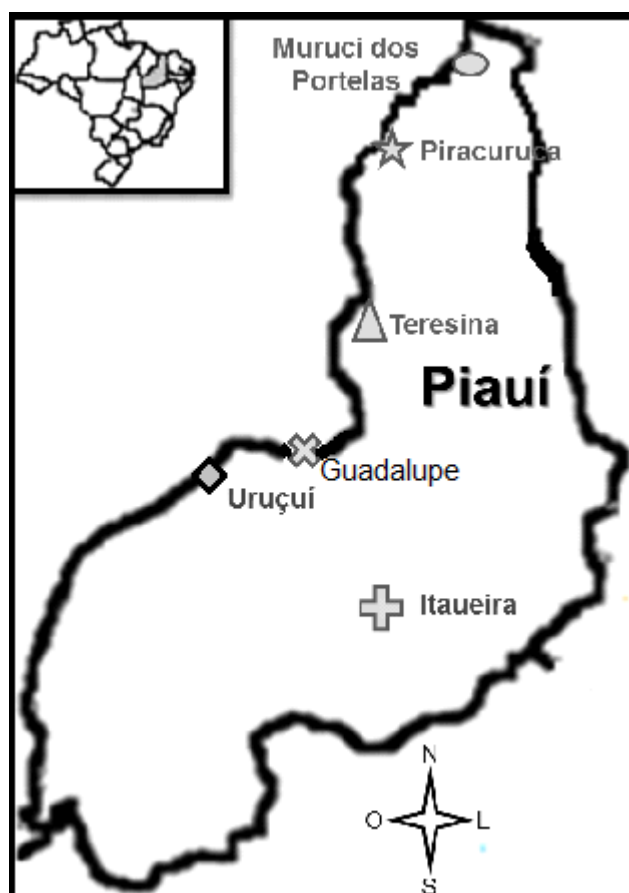


Figura 1. Origem e localização geográfica das amostras de *Melipona fasciculata* da região Meio Norte do Brasil. Adaptado: <http://splink.cria.org.br/mapper>

As asas anteriores direita foram removidas e dispostas entre lâminas para microscopia e fotografadas com câmera digital acoplada a um estereomicroscópio

para as análises dos padrões de venação. As fotografias foram transformadas em formato tps no software tpsUtil versão 1.40 (Rohlf 2008a), foram utilizados 13 marcos anatômicos (Figura 2) na junção das nervuras de cada asa a partir do tpsDig versão 2.17 (Rohlf 2008b).

Foram realizadas análises multivariadas, como Análise de Componente Principal (PCA), a Análise de Variáveis Canônicas, Distância de D^2 de Mahalanobis, Distância de Procrustes e Validação Cruzada para verificar a existência de variação entre as populações, essas análises foram realizadas no MorphoJ versão 1.03 (Klingenberg 2011). Além disso, foram realizadas as análises de agrupamento, pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e o teste de Mantel utilizando distância geográfica em linha reta, tamanho e forma das asas das abelhas, utilizando o Software Past 2.17.



Figura 2. Asa anterior direita de *Melipona fasciculata* mostrando os 13 marcos anatômicos localizados na junção das veias das asas, que foram utilizadas na análise morfométrica.

RESULTADOS

A análise de variável canônica definiu os grupos em que a população em estudo pertence. Foi possível observar os pontos que distinguem a separação dos grupos de *M. fasciculata* (Figura 3).

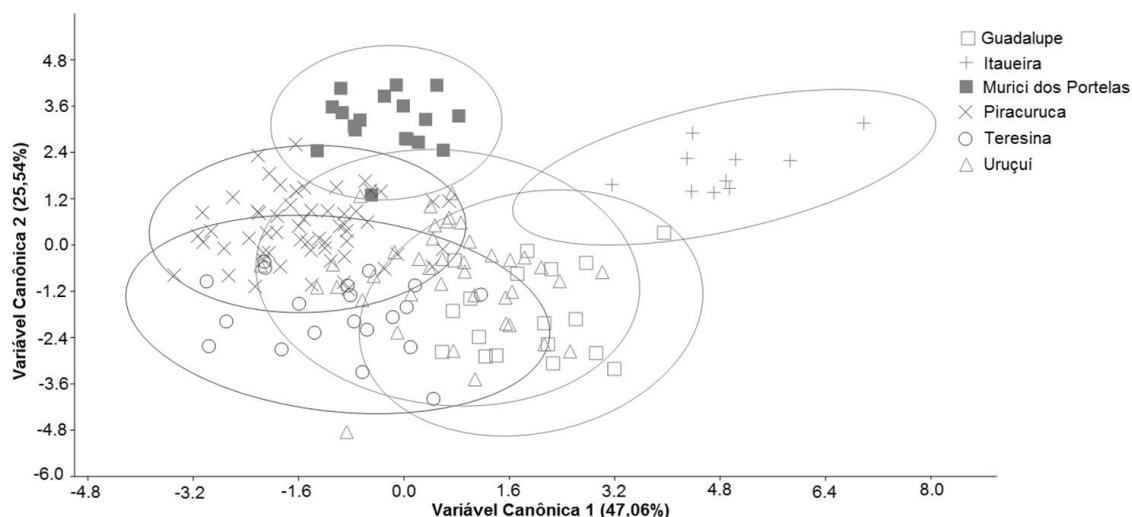


Figura 3. Representação gráfica da disposição relativa das populações de *Melipona fasciculata* das cidades de Guadalupe, Itaeira, Murici dos Portela, Piracuruca, Teresina e Uruçuí, obtida a partir das análises de variáveis canônicas dos 13 pontos anatômicos nas junções de nervuras das asas anteriores direita.

Com base na distância de Mahalanobis e Procrustes (Tabela 3), observou-se que a menor proximidade ocorreu entre as populações dos municípios de Itaeira e Teresina, enquanto a menor diferença morfológica ocorreu entre as populações de Piracuruca e Teresina, com um valor de dissimilaridade de 2,32.

Tabela 3. As distâncias de Mahalanobis (metade superior da matriz) e distância de Procrustes (metade inferior da matriz) entre as populações de *Melipona fasciculata*, calculados a partir da análise de variável canônica.

	GUA	ITA	MDP	PIR	TER	URU
GUA		4,89	4,55	3,83	4,02	2,77
ITA	0,021		6,08	6,41	6,77	5,51
MDP	0,018	0,024		3,42	4,92	3,77
PIR	0,013	0,026	0,012		2,32	2,86
TER	0,012	0,027	0,017	0,007		3,11
URU	0,011	0,023	0,013	0,012	0,013	

Legenda: GUA: Guadalupe; ITA: Itaeira; MDP: Murici dos Portelas; PIR: Piracuruca; TER: Teresina; URU: Uruçuí.

A estruturação também foi revelada pelas Distâncias de Mahalanobis que caracteriza uma distância em linha reta e pela Distância de Procrustes que

compreende uma distância geodesica. Dessa forma, foi observada variação morfológica entre as populações de Itauera e Murici dos Portelas que também pode ser observado no gráfico de canônica.

Na validação cruzada, a classificação dos indivíduos que teve menor êxito ocorreu entre as populações de Guadalupe e Itauera com 66% e 50% respectivamente. A populações que apresentaram maior valor na classificação de indivíduos foi a população de Itauera e Piracuruca, e Itaueras e Uruçuí ambas correlações com 100% de classificação. Esses resultados reforçam a diferença morfológica entre as populações de Itaueras das demais populações.

Baseado no dendrograma (UPGMA; Figura 4), foi observado diferenças morfológicas entre as populações dos municípios de Itauera e Murici dos Portelas que foram agrupadas em ramos isolados, destacando-se a partir de populações de outras regiões, com o Coeficiente de Correlação Coofenética (CCC) de 94%.

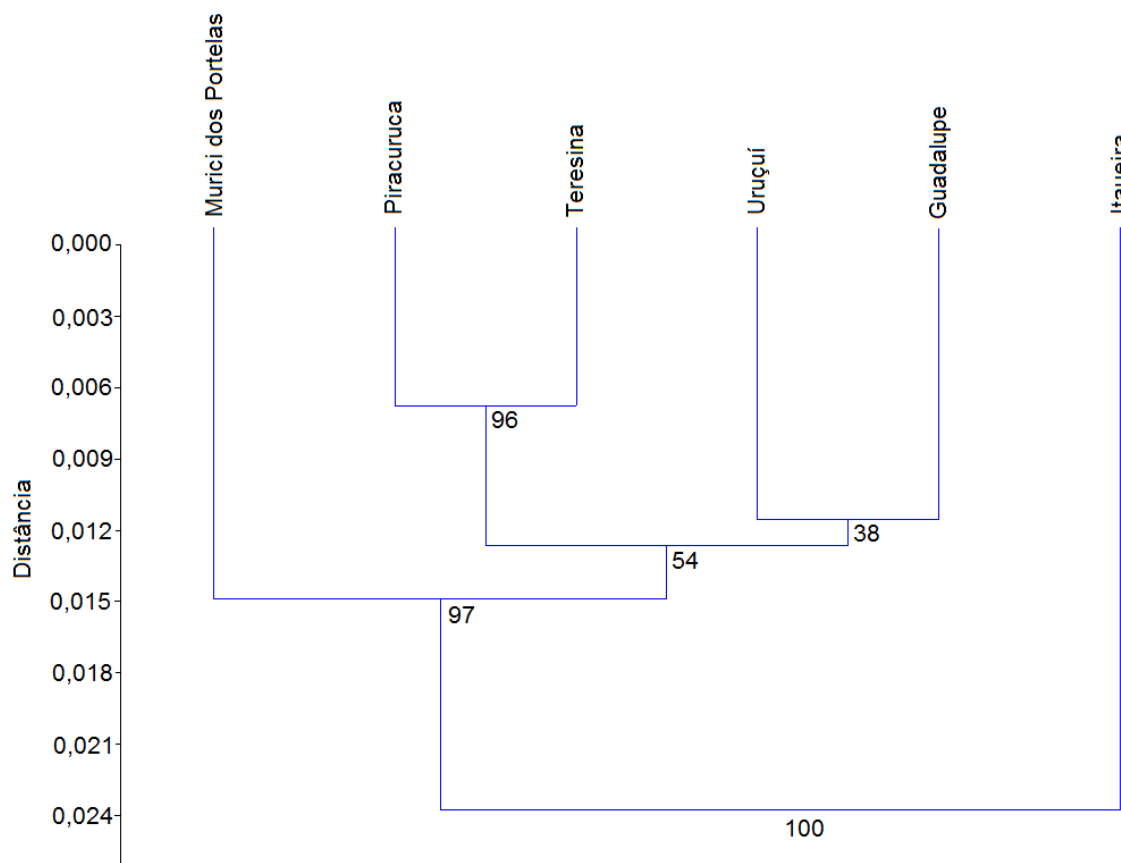


Figura 4. Dendrograma gerado pelo UPGMA com as distâncias morfométricas a partir de médias entre colônias de *Melipona fasciculata* de diferentes localidades do Estado do Piauí (CCC = 94%).

A correlação realizada pelo teste de Mantel não revelou correlação entre forma e tamanho x altitude (Tabela 4). Por outro lado, forma e tamanho foram significativamente correlacionados à distância geográfica em populações de *M. fasciculata* (Tabela 4).

Tabela 4. Teste de Mantel usado para comparar matrizes de forma, tamanho, altitude, e distância geográfica, com base em medições de asa de *Melipona fasciculata* com 5000 permutações.

COMPARAÇÃO DE MATRIZES	R ²	P
Forma x Altitude	0,028	0,344 ^{NS}
Forma x Distância Geográfica	0,817	0,006*
Tamanho x Forma	0,989	0,002*
Tamanho x Altitude	0,066	0,285 ^{NS}
Tamanho x Distância Geográfica	0,085	0,004*

DISCUSSÃO

A morfometria geométrica das asas anteriores foi eficiente na detecção de variabilidade entre as populações, contribuindo para o entendimento da estrutura populacional de *M. fasciculata*. Os resultados da análise morfométrica apontaram diferença na forma da asa entre as populações ao longo da sua distribuição geográfica entre os locais de coleta e também está provavelmente relacionada com variabilidade ambiental entre os locais amostrados. Divergência morfológica em *Melipona* também foi observada por outros autores para *M. subnitida* (Bonatti et al. 2013; Lima et al. 2014), *M. scutellaris* (Lima-Junior et al. 2015) e *M. mandacaia* (Prado-Silva et al. 2016). Esses autores verificaram que quanto maior a distância geográfica maior a divergência morfológica.

A divergência morfológica encontrada entre as populações dos municípios de Itaueira e Teresina pode ser explicada pela interação entre distância geográfica (462 km em linha reta) e diferenças morfoclimáticas entre os municípios. Teresina está localizada na região Meio-Norte do Estado do Piauí, caracterizada por clima tropical úmido, com chuvas rápidas e intensas (IBGE, 2015), e vegetação de cerrado e mata de cocais (carnaúba, babaçu, buriti)

(CEPRO 2013); Itaueira está localizado na região de Cerrado do estado, com clima tropical semiárido (período seco de sete a oito meses), com vegetação típica de cerrado (cerradão) (CEPRO 2013). As populações que apresentam menor divergência morfológica foram Piracuruca e Teresina. Estas populações estão geograficamente próximas umas das outras (164 km) e as regiões apresentam semelhanças de clima, vegetação e relevo.

Através da análise de agrupamento foi possível confirmar diferenças morfológicas entre as populações e, em geral, através de uma correlação entre morfologia da asa anterior e a distância geográficas. Teresina e Piracuruca estão próximas geograficamente, bem como Uruçuí e Guadalupe que além de estarem com localização geográfica próxima uma da outra, apresentam variações morfoclimáticas parecidas (CEPRO 2013).

Resultados semelhantes já foram encontrados ao estudar a diversidade da população em *M. beecheii* de diferentes países da América Central (Francoy et al. 2011), observando-se que as populações localizadas longe uma das outras e com características morfofisiológicas distintas mostraram divergência morfológica. Mendes et al. (2007) observaram diferenças morfológicas entre os grupos *Nannotrigona testaceicornis* das áreas urbana e rural do município de Uberlândia, estado de Minas Gerais, no sudeste do Estado do Brasil. Os autores associaram essas diferenças com pressões seletivas na área urbana e uma maior probabilidade de variabilidade genética na área rural.

Características climáticas e de vegetação e distância geográfica também foram fatores importantes para definir grupos de *M. scutellaris* provenientes do Estado da Bahia, agrupando em um mesmo ramo as populações provenientes de regiões mais próximas geograficamente e que apresentavam características morfoclimáticas semelhantes (Lima-Junior et al. 2012). A semelhança ambiental também foi fator importante na definição de grupos de três espécies de abelhas do Nordeste da Índia com *Tetragonula iridipennis*, *T. Laeviceps* e *Lepdotrigona ventralis* agrupadas de acordo com a proximidade geográfica e semelhança de características ambientais do local de origem (Vijayakumar et al. 2013).

Os estudos acima em conjunto destacam a importância da caracterização da estrutura populacional das abelhas-sem-ferrão, especialmente das espécies pouco estudadas que habitam o Nordeste do Brasil, porque ajudam a identificar

populações diferenciadas, que necessitam de intervenção humana, como forma de diminuir os índices de endogamia.

Conclui-se que houve diferença morfológica entre as populações de *M. fasciculata* provenientes de seis locais diferentes no Estado do Piauí onde essa espécie ocorre naturalmente com uma correlação entre a forma da asa e o local de amostragem sugerindo diversidade morfológica devido a distância geográfica quanto a diferenças entre clima e vegetação.

REFERÊNCIAS

Araújo, E. D., Oliveira, R. G., Calazans, H. C. M., França, C. C. S., Santos, V., Ribeiro, G. T., Jain, S., Batista, M. V. A., Nunes, L. A. (2016). Risk of local extinction and genetic diversity of *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) in a possible Northeastern limit of its distribution in Brazil. *Sociobiology* 63, 804-812.

Bonatti, V., Simões, Z.L.P., Franco, F.F.; Franco, T.M. (2014) Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. *Naturwissenschaften* 101, 17-24. doi:10.1007/s00114-013-1123-5.

Brown M.J.F., Paxton, R.J. (2009) The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie* 40, 410-416. doi:10.1051/apido/2009019.

Camargo, J. M. F., Pedro, S. R. M. (2013) Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D.; Melo, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region*. <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>.

CEPRO: Fundação Centro de Pesquisas Econômicas e Sociais do Piauí- Disponível em: <http://www.cepro.pi.gov.br/index.php>>. Acessado em 20 de outubro de 2016.

Diniz-Filho, J.A.F., Bini, L.M. (1994) Space-free correlation between morphometric and climatic data: a multivariate analysis of Africanized honey bees (*Apis mellifera*

L.) in 52 Brazil. *Global Ecology and Biogeography Letters*, (Oxford) 4, 195-202.
www.citeulike.org/user/Flit/article/728680.

Francoy, T.M., Grassi, M.L., Imperatriz-Fonseca, V.L., May-Itza, W.J., Queza-Da-Euan, J.J. (2011) Geometric morphometrics of the wing as a tool for assigning genetic lineages and geographic origin to *Melipona beecheii* (Hymenoptera: Meliponini). *Apidologie* 42, 499-507. doi: 10.1007/s13592-011-0013-0.

Garay, I.E.G., Dias, B.F.S. (2001) Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias e monitoramento. Petrópolis: Editora Vozes, 430 p.

Heard, T.A. (1999) The role of stingless bees in crop plantation. *Annual Review of Entomology* 44, 183-206.

IBGE Site: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php>. Acessado 20 de novembro de 2016.

Klingenberg, C.P. (2002) Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. *Gene* 287, 3-10. PII:S0378-1119(01)00867-8.

Klingenberg, C.P. (2011) MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11, 353-357.

Klingenberg, C. P. (2015) Analyzing Fluctuating Asymmetry with Geometric Morphometrics: Concepts, Methods, and Applications. *Symmetry* 7, 843-934.

Lima, C. B. S., Nunes, L. A., Ribeiro, M. F., Carvalho, C. A. L. (2014) Population Structure of *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) at the Southern Limit of its Distribution Based on Geometric Morphometrics of Forewings. *Sociobiology* 61(4), 478-482.

Lima-Junior, C. A., Carvalho, C. A. L., Nunes, L. A., Franco, T. M. (2012) Population Divergence of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Meliponina) in Two Restricted Areas in Bahia, Brazil. *Sociobiology* 59(1), 107-122.

Lima-Junior, C. A., Carvalho, C. A. L., Nunes, L. A., Santos, W. S. (2015) Variação morfométrica entre populações disjuntas de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) *Interciencia* 40(5), 324-329.

Lyra, M.L., Hatadani, L.M., De Azeredo-Espin, A.M.L., Klaczko L.B. (2010) Wing morphometry as a tool for correct identification of primary and secondary New World screwworm fly. *Bulletin of Entomological Research* 100, 19-26. doi: 10.1017/S0007485309006762

Mendes, M.F.M., Franco, T.M., Nunes-Silva, P., Menezes, C., Imperatriz-Fonseca, V. L. (2007) Intra-populational variability of *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) using relative warp analysis. *Bioscience Journal* 23, 147-152. http://mel.cpatu.embrapa.br/publicacoes-cristiano-menezes/publicacoes-cristiano-menezes/Mendes_et_al_2007.pdf.

Nunes, L. A., Passos, G. B., Carvalho, C. A. L., Araújo, E. D. (2013). Size and shape in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera; Meliponini). *Journal Biology Brazilian* 73, 887-893.

Nunes-Silva, P., Hrncir, M., Silva, C. I. Da, Roldão, Y. S. O., Imperatriz-Fonseca, V. L. (2013) Stingless bees, *Melipona fasciculata*, as efficient pollinators of eggplant (*Solanum melongena*) in greenhouses. *Apidologie* 44(5), 537-546.

Prado-Silva, A., Nunes, L. A., Alves, R. M. DE O., Carneiro, P. L. S., Waldschmidt, A. M. (2016) Variation of fore wing shape in *Melipona mandacaia* Smith, 1863 (Hymenoptera, Meliponini) along its geographic range. *Journal of Hymenoptera Research* 48, 85–94.

Rohlf, F.J., Marcus, L.F. (1993) A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology*

and Evolution 8, 129-132.

Rohlf, F.J. (1998) On applications of geometric morphometrics to studies of ontogeny and phylogeny. *Systematic Biology* 47, 147-158.

Rohlf F. J. (2008a) tpsUtil. For windows version 1.40. Department of Ecology and Evolution. State University of New York. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>. Acessado em 10 de junho de 2013.

Rohlf F.J. (2008b). tpsDig. For windows version 2.17. Department of Ecology and Evolution. State University of New York. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>. Acessado em 10 de junho de 2013.

Silva, J. C., Messagell, D., Cruz, C. D., Silva, M. V. G. B. da. (2005) Aplicação de Análises Multivariadas para Determinação de Casta de Abelhas *Apis mellifera* L. (Africanizadas), obtidas em laboratório. *Revista Brasileira de Zootecnia* 34(2), 567-572.

Slaa, E.J., Chaves, L.A.S., Malagodi-Braga, K.S., Hofstede, F.E. (2006) Stingless bees in applied pollination: pratic and perspectives. *Apidologie* 37, 293-315.

Venturieri, G. C., Raiol, V. F. O., Pereira, C. A. B. (2003) Avaliação da introdução da criação racional de *Melipona fasciculata* (Apidae: Meliponina), entre os agricultores familiares de Bragança - PA, Brasil. *Biota Neotropica* 3(2), 1-7.

Venturieri, G. C., Alves, D. A., Carvalho, C. A. L., Menezes, C., Vollet- Neto, A., Contrera, F. A. L., Cortopassi-Laurino, M. C., Nogueira-Neto, P., Imperatriz-Fonseca, V. L. Meliponicultura no Brasil: Situação Atual e Perspectivas Futuras para o Uso na Polinização Agrícola. In: Imperatriz-Fonseca, V. L., Canhos, D. A. L., Alves, D. A., Saraiva, A. M. (Org). (2012). Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. São Paulo: EDUSP, 213-236.

Venturieri, G. C., Baquero, P. L., Costa, L. Formação de Minicolônias de Uruçu-Cinzenta [*Melipona fasciculata* Smith 1858 (Apidae, Meliponini)]. Embrapa Amazônia Oriental, 2015. 28p.

Vijayakumar, K., Jayaraj, R. (2013) Geometric morphometry analysis of three species of stingless bees in India. International Journal for Life Sciences and Educational Research, 1(2), 91 – 95.

ARTIGO 3**HIDROCARBONETOS CUTICULARES NO RECONHECIMENTO DE
ESPÉCIES E DE COLÔNIAS DE *Melipona* spp.
(HYMENOPTERA: MELIPONINI)¹**

¹Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico *Journal of Chemical Ecology*, em versão na língua inglesa.

HIDROCARBONETOS CUTICULARES NO RECONHECIMENTO DE ESPÉCIES E DE COLÔNIAS DE *Melipona* spp. (HYMENOPTERA: MELIPONINI)

Resumo - A compreensão sobre o papel do hidrocarboneto cuticular (HCC) no reconhecimento entre e interespecífico baseia-se em grande parte em espécies de formiga de climas temperados e em *Apis mellifera*. As abelhas-sem-ferrão continuam relativamente pouco estudadas, apesar de ser o maior grupo de abelhas eussociais, compreendendo mais de 400 espécies com aproximadamente 60 gêneros. As Meliponini e Apini divergiram entre 80-130 Myr B.P., assim as trajetórias evolutivas que moldaram os sistemas de comunicação química em formigas, abelhas do gênero *Apis* e as abelhas-sem-ferrão podem ser muito diferentes. Portanto, o objetivo principal deste estudo foi estudar em detalhe uma espécie de abelha sem ferrão (*Melipona fasciculata*), usando métodos desenvolvidos para as formigas, com o objetivo de identificar qualquer sinal específico do HCC de espécie ou colônia. Um objetivo adicional foi coletar novos dados de HCC em quatro outras espécies de *Melipona* do Nordeste Brasileiro e comparar os novos dados com os estudos em HCC previamente publicados sobre *Melipona*. Foi observado que cada uma das dez espécies *Melipona* estudadas até agora produziu um sinal específico de HCC de espécies com base em sua produção de isômero do alceno. Um número notável de isômeros de alceno, até 23 em *M. asilvai*, indicou a diversificação de isômeros posicionais de alceno entre as abelhas-sem-ferrão. O único outro grupo que realmente obteve diversificação na produção de isômero alceno foram espécies de mamangavas (*Bombus* spp.), que são um grupo irmão das abelhas-sem-ferrão. Foi possível detectar um sinal específico de colônia muito fraco em *Melipona fasciculata*. Também, entre as dez espécies neotropicais de *Melipona*, não foi possível detectar nenhum efeito do meio-ambiente sobre a proporção de produção de alceno, como foi sugerido para algumas outras espécies.

Palavras-chave: Abelhas-sem-ferrão, *Melipona*, Perfis Cuticulares, Alcenos.

**Cuticular hydrocarbons in species and colony
recognition in *Melipona* spp. (Hymenoptera: Meliponini)**

Abstract- Understanding the role of cuticle hydrocarbons (HCC) in interspecies and interspecific recognition is largely based on temperate ant species and *Apis mellifera*. The stingless bees remain relatively little studied, despite being the largest group of euphoric bees, comprising more than 400 species of approximately 60 genera. The Meliponini and Apini diverged between 80-130 Myr B.P., so the evolutionary trajectories that shaped chemical communication systems in ants, *Apis* bees, and stingless bees may be very different. Therefore, the main objective of this study was to study in detail a stingless bee species (*Melipona fasciculata*), using methods developed for the ants, in order to identify any specific HCC species or colony. An additional objective was to collect new HCC data on four other species of *Melipona* from Northeast Brazil and compare the new data with previously published HCC studies on *Melipona*. It has been observed that each of the ten *Melipona* species studied so far has produced a species-specific HCC signal based on their alkene isomer production. A remarkable number of alkene isomers, up to 23 in *M. asilvai*, indicated the diversification of alkene positional isomers among stingless bees. The only other group that actually achieved diversification in the production of alkene isomer were species of mammals (*Bombus* spp.), which are a sister group of stingless bees. It was possible to detect a specific signal of very weak colony in *Melipona fasciculata*. Also, among the ten Neotropical species of *Melipona*, it was not possible to detect any effect of the environment on the proportion of alkane production, as was suggested for some other species.

Key Words- Stingless bees, *Melipona*, Cuticular profiles, Alkenes.

Introdução

A comunicação química é a mais antiga forma de comunicação, se espalhando por todas as formas de vida (Wilson, 1970). Os feromônios são conhecidos como um dos mais importantes sinais químicos responsáveis pela comunicação e comportamento conhecido desde gênero à superorganismos (Kather & Martin, 2015; Wyatt, 2013). Contatos semioquímicos de curto alcance são usados por muitos insetos para identificar outros indivíduos da mesma ou de diferentes espécies (Wyatt, 2013).

Atualmente, está bem estabelecido que hidrocarbonetos cuticulares (HCC) formam um grupo muito importante de compostos usados em reconhecimento (Blomquist & Bagnères 2010; Wyatt, 2013). Originalmente, esta camada lipídica preserva o inseto da dessecação, abrasão e infecção da cutícula, assim, assegurando diretamente a sua sobrevivência (Lockey, 1988). No entanto, em muitos táxons de insetos, lipídios cuticulares evoluíram para se tornar parte dos seus sistemas de comunicação, permitindo-lhes de forma confiável diferenciar entre amigo e inimigo, ou encontrar um parceiro para acasalamento (Blomquist & Bagnères 2010; Prestwich & Blomquist 2014).

A compreensão sobre o conhecimento de HCC baseia-se em espécies de formigas de climas temperados e na abelha melífera (*Apis mellifera*) (Breed & Bennett 1987; Tannure-Nascimento et al., 2008, 2009; Kather & Martin 2015; Pradella et al., 2015). As abelhas-sem-ferrão (Meliponini) e abelhas melíferas (Apini) são os dois únicos grupos de abelhas altamente eusociais.

As abelhas com ferrão e amplamente estudadas são representadas por 11 espécies e todas dentro de um único gênero (*Apis*), enquanto as abelhas-sem-ferrão permanecem relativamente pouco estudadas, apesar de comporem o maior grupo de abelhas eussociais, compreendendo mais de 400 espécies em aproximadamente 60 gêneros (Rasmussen & Cameron, 2010) e são responsáveis pela polinização de 40 a 90% da flora nativa em algumas regiões do Brasil (Nascimento et al., 2000).

As tribos Apini e Meliponini divergiram entre 80-130 Myr B.P. (Michener & Grimaldi, 1988; Rasmussen & Cameron, 2010) e, portanto, as formigas, as abelhas melíferas e as abelhas-sem-ferrão possuem trajetórias evolutivas muito diferentes que teriam moldado os seus sistemas de comunicação química.

A maioria das abelhas-sem-ferrão ocorre em regiões neotropicais (Roubik, 1989) e possuem um ciclo de vida perene (Michener, 2000). Durante a sua evolução, as abelhas-sem-ferrão adaptaram-se a uma ampla gama de ambientes climáticos. Por exemplo, no Brasil, a *Melipona fasciculata* habita áreas muito quentes e áridas (Caatinga e Cerrado), enquanto a *M. scutellaris* ocorre nas florestas atlânticas húmidas. Portanto, este grupo é ideal e adequado para investigar-se o efeito do meio-ambiente no seu perfil de HCC.

O objetivo desta investigação foi estudar uma espécie (*Melipona fasciculata*) em detalhe, usando métodos desenvolvidos em estudos sobre formigas (Martin et al., 2008a) para identificar qualquer sinal específico do HCC de espécie ou colônia. Foram também coletados dados novos de HCC em outras quatro espécies de *Melipona* do Nordeste Brasileiro. Foram então combinados todos os dados novos com os resultados obtidos em estudos publicados sobre HCC em *Melipona*, para investigar se um sinal estável de HCC de espécie existiu neste grupo. Finalmente, foi usado o banco de dados para determinar quais grupos de HCC poderiam ser usados no reconhecimento de espécie e qual o papel do meio-ambiente em moldar os perfis de HCC em abelhas-sem-ferrão na América do Sul.

Material e Métodos

Amostras de abelhas-sem-ferrão. Todas as abelhas-sem-ferrão foram coletadas em meliponários no Nordeste (NE) brasileiro nos Estados da Bahia e do Piauí (Tabela 1 e Fig. 1), os meliponários onde as amostras de *M. fasciculata* foram coletadas no município de Piracuruca estavam localizados em regiões diferentes, um ao Norte e outra ao Sul do município. Abelhas operárias adultas foram coletadas colocando um tubo transparente sobre a entrada da colônia. Todas as colônias foram amostradas entre outubro de 2014 e maio de 2015.

O número de indivíduos coletados foi determinado de acordo com o objetivo da pesquisa e a quantidade de indivíduos disponíveis para a coletadas. Para o estudo detalhado em *M. fasciculata* foram coletados 10 operárias de cada uma das seis colônias que estavam localizadas em três meliponários diferentes separados entre 5 e 70km (Fig. 1). Todos os três locais estavam-se na região

semiárido, com temperaturas médias de 25°C-28°C e baixa precipitação de cerca de 20 a 40mm por ano. Para avaliar se cada espécie tinha um perfil distinto de HCC, foram coletados 10 indivíduos de três colônias de *M. scutellaris* e 10 indivíduos de uma colônia de cada uma das três espécies: *M. asilvai*, *M. quadrifasciata* e *M. subnitida*.

Tabela 1. Características climáticas e locais de coleta das amostras de abelhas.

Locais	Número de colônias	Número de indivíduos	Zonas Climáticas
Chapada Diamantina- BA	1	3	Tropical Seco
Cruz das Almas- BA	2	4	Tropical Seco
Itaberaba- BA	1	3	Tropical Seco
Mutuipe- BA	1	3	Equatorial
Piracuruca- PI	3	30	Tropical Seco
Teresina- PI	4	40	Tropical Seco

Legenda: BA- Bahia; PI- Piauí

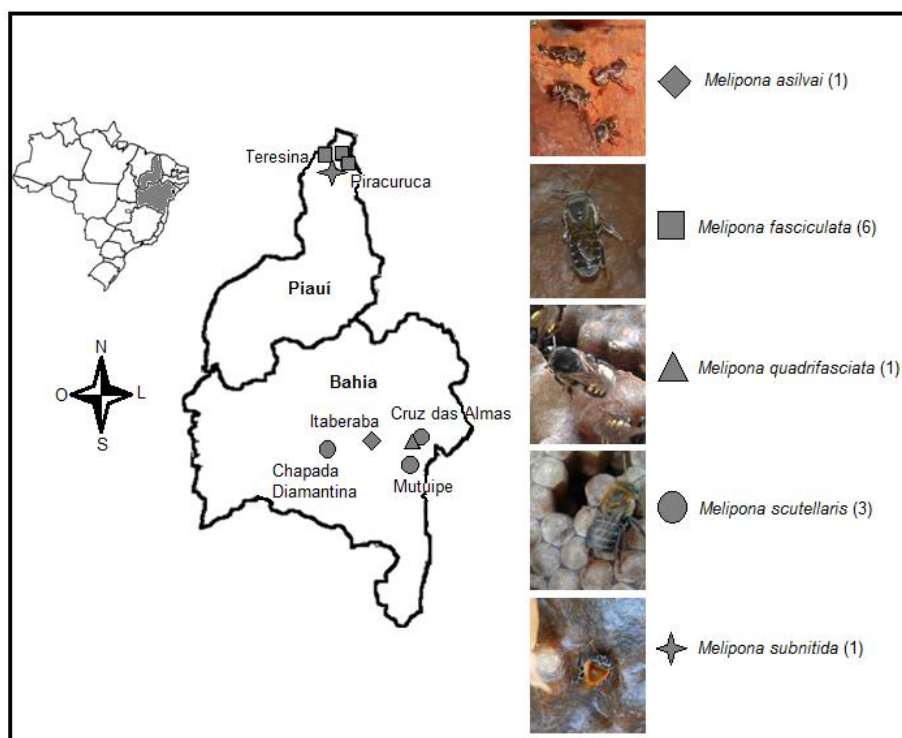


Figura 1. Localização geográfica e imagens das cinco espécies de *Melipona* coletadas nos estados do Piauí e Bahia, no Nordeste do Brasil. Entre parentese é informado o número de colônias por espécie.

Análise química. Como em estudos anteriores de HCC de abelhas-sem-ferrão (Abdalla et al., 2003; Kerr et al., 2004), foram removidos os dois pares de asas de cada abelha e colocados em um frasco de vidro de 50 μ L de hexano de grau HPLC. Após 10 min, as asas foram removidas e o hexano evaporou-se até secar. Os frascos foram selados e armazenados a 5°C. Pouco antes da análise, 30 μ L de hexano de grau HPLC foram adicionados a cada frasco e analisadas em um Cromatógrafo Agilent 7890 GC (equipado com uma coluna de UltiMetal de Vf-5ht; comprimento, 30m; ID, 0,25 mm; película de espessura, 0.1 μ m) conectado a um Agilent 5975 MSD (espectrômetro quádruplo de massa com ionização de impacto de elétrons de 70 eV). As amostras foram injetadas no modo sem divisão com forno programado entre 70 e 200°C a 40° C min⁻¹, em seguida entre 200 e 320°C a 25°C min⁻¹ e mantidas por 2 min a 320°C. Hélio foi usado como gás de transporte a um fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹. Os dados foram analisados usando *Agilent Chem Station* dos bancos de dados padrão do MS, íons de diagnóstico e seus índices de Kováts para identificação dos compostos. As posições de ligação dupla do alceno, em seguida, foram determinadas utilizando derivatização de bissulfeto dimetil (DMDS) (Carlson et al., 1989). Os extratos de asa foram agrupados por espécies (*M. asilvai*, *M. quadrifasciata* e *M. subnitida*) coletas em apenas um local, ou localização (*M. scutellaris* e *M. fasciculata*), quando cada espécie foi coletada em mais um local, e submetidos a derivatização DMDS e re-analisadas no GC-MS em condições similares como as das amostras não-derivatizadas.

Estudos publicados sobre HCC de *Melipona*. Uma revisão da literatura apontou apenas oito estudos anteriores (Abdalla et al., 2003; Kerr et al., 2004; Pianaro et al., 2007; Ferreira-Caliman et al., 2010; Nascimento & Nascimento, 2012; Leonhart et al., 2013; Quezada-Euan et al., 2013; Santos et al., 2015), que investigaram um total de 10 espécies de *Melipona*, todos na América do Sul (Fig. 3). Os dados de Kerr et al. (2004) tiveram valor limitado uma vez que a coluna de GC-MS foi aquecida a apenas 250°C, ao invés do normal a 320°C, resultando no HCC mais pesado acima de Nonacosane (C29). Embora Leonhart et al. (2013) tenham informado apenas as proporções e o número de grupos compostos, os autores gentilmente forneceram os dados brutos para que *M. costaricensis* e *M. beecheii* pudessem ser incluídos na análise.

Análise estatística. A quantidade (Contagem Total de Íons [CTI]) de cada composto de cada abelha foi convertida em uma porcentagem, ou usando a 'quantidade total de íons', ou a quantidade total de íons de um grupo de compostos, ou seja, alcenos. A média e o desvio padrão foram então calculados para cada colônia ou para cada espécie, dependendo da hipótese.

Para investigar se a produção de quaisquer compostos está sob o rigoroso controle regulamentar, foi investigada a correlação entre os principais HCC em espécie e em colônia, uma vez que isso ocorre em muitas espécies de formigas (Martin & Drijfhout, 2009). Para isso, foi calculado o coeficiente de regressão (r^2) do CTI de diferentes compostos principais detectados em *M. fasciculata*. Esse método pode indicar sub-conjuntos de compostos de reconhecimento putativos e ajudar a detectar se podem existir quaisquer diferenças distintas de colônia (Martin et al., 2008a).

A análise discriminante foi usada para investigar se um sinal químico específico da colônia poderia ser detectado em *M. fasciculata* usando todos os HCC ou um subconjunto de alcenos ou alcanos (dados complementares). A análise foi também utilizada para confirmar as diferenças de espécie claramente vistas no CTI. Toda a análise estatística foi realizada em SPSS v. 22.

Resultados

Perfis HCC para as espécies. Em todas as cinco espécies, os seus perfis foram dominados por uma série de alcanos lineares e olefinas (alcenos e dienos) variando em comprimentos de cadeia de C23 a C33, dependendo da espécie (Tabelas 2 e 3). Embora todas as espécies tenham produzido basicamente os mesmos alcanos, o número, o comprimento da cadeia e isômeros posicionais dos alcenos, foi exclusivo para cada espécie e compartilhados por todos os indivíduos dentro dessa espécie. Nas cinco espécies estudadas, um total de 10 isômeros de alceno (Tabelas 2 e 3) foi detectado. Algumas espécies, como *M. fasciculata*, tinha apenas um isômero posicional (por exemplo, [Z]-9), enquanto *M. asilvai* teve nove isômeros. Portanto, cada uma das cinco espécies de *Melipona* estudadas tinha o seu próprio perfil de HCC muito distinto, mesmo se isso foi apenas baseado no seu perfil de alceno. Para duas espécies, *M. fasciculata* e *M.*

scutellaris, colônias de diferentes localidades foram coletadas e os resultados mostraram que os perfis de espécies, incluindo os seus isômeros, foram consistentes dentro de cada espécie. O perfil de *M. scutellaris* foi consistente mesmo quando comparados em locais de características ambientais diferentes (Bahia e São Paulo) (Tabela 3).

Tabela 2. Média e desvio padrão das proporções de cada hidrocarboneto cuticular em cinco espécies de *Melipona* investigadas neste estudo. O número de indivíduos a partir dos quais foram obtidos cromatogramas de íons totais de alta qualidade é apresentado entre parênteses. Os compostos são apresentados na ordem de retenção e aqueles em negrito são os alcanos.

Compostos químicos	<i>M. fasciculata</i> (N=53)	<i>M. quadrifasciata</i> (N=6)	<i>M. scutellaris</i> (N=8)	<i>M. asilvai</i> (N=3)	<i>M. subnitida</i> (N=10)
(Z)-9-Tricoseno			0,2±0,3	0,1±0,0	
Tricosano		0,7±0,1	3,0±1,4	1,0±0,1	0,8±0,4
(Z)-11-Pentacoseno			0,6±0,7		
(Z)-10-Pentacoseno					1,5±0,4
(Z)-9-Pentacoseno		3,1±1,6	6,6±4,6	0,5±0,2	2,4±0,6
(Z)-8-Pentacoseno				0,3±0,1	
(Z)-7-Pentacoseno				0,9±0,2	
(Z)-6-Pentacoseno					1,9±0,5
Pentacosano	14±3,3		20,1±4,9	36±2,4	36±4,1
9,11-Metilpentacosano				0,3±0,1	
7-Metilpentacosano				0,2±0,1	
5-Metilpentacosano		0,4±0,1			
3-Metilpentacosano		1,3±0,0			
Heptacosadieno				0,1±0,0	
(Z)-14-Heptacoseno		0,7±0,0			
(Z)-12-Heptacoseno				0,1±0,0	
(Z)-11-Hexacoseno			1,1±1,2	0,8±0,7	
(Z)-10-Heptacoseno				1,1±0,7	0,8±0,3
(Z)-9-Heptacoseno	6,2±2,6	44,8±2,7	25,8±5,3	0,9±0,0	1,9±0,6
(Z)-8-Heptacoseno				0,5±0,3	
(Z)-6-Heptacoseno					0,4±0,3
Heptacosano	32,9±9,7	13,2±0,9	13,0±4,9	6,9±1,3	22,3±3,0
9,11-Methylheptacosano		0,3±0,1		0,2±0,1	
7-Methylheptacosano		0,2±0,1		0,2±0,0	
5-Methylheptacosano		0,2±0,1		0,1±0,0	
3-Methylheptacosano				0,3±0,0	

Tabela 2. Média e desvio padrão das proporções de cada hidrocarboneto cuticular em cinco espécies de *Melipona* investigadas neste estudo. O número de individual de operárias, do qual cromatogramas de íons totais de alta qualidade foram obtidas, é dado entre parênteses. Os compostos são dados em ordem de retenção e aqueles em negrito são os alcanos. (Continuação).

Compostos Químicos	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>
	<i>fasciculata</i> (N=53)	<i>quadrifasciata</i> (N=6)	<i>scutellaris</i> (N=8)	<i>asilvai</i> (N=3)	<i>subnitida</i> (N=10)
Nonacosadieno			0,1±0,1	0,1±0,0	2,3±0,5
Nonacosadieno				0,3±0,0	0,7±0,3
(Z)-15-Nonacoseno				0,8±0,6	
(Z)-14-Nonacoseno		0,4±0,0		1,0±0,2	
(Z)-12-Nonacoseno				2,5±1,1	
(Z)-11-Nonacoseno			0,7±0,5		
(Z)-10-Nonacoseno				7,0±0,1	2,4±0,6
(Z)-9-Nonacoseno	30,2±11	11,1±0,2	8,9±3,2	0,3±0,0	14,6±3,5
(Z)-8-Nonacoseno					0,3±0,2
(Z)-7-Nonacoseno					0,7±0,3
(Z)-6-Nonacoseno					2,3±0,5
Nonacosano	9,6±2,9	4,1±0,7	3,9±1,9	11±2,5	4,9±0,8
9,11-Metilnonocosano				1,2±0,1	
7-Metilnonocosano				0,9±0,3	5,7±1,3
5-Metilnonocosano				0,4±0,0	
3-Metilnonocosano				0,2±0,0	
Hentriacontadieno				0,2±0,1	1,2±0,4
Hentriacontadieno				0,5±0,2	1,6±0,4
Hentriacontadieno				0,5±0,3	
(Z)-15-Hentriaconteno				0,4±0,0	
(Z)-14-Hentriaconteno				13±3,4	
(Z)-12-Hentriaconteno				1,7±0,2	1,6±0,4
(Z)-10-Hentriaconteno				0,5±0,3	1,0±0,2
(Z)-9-Hentriaconteno	4,5±1,6	2,3±0,9	14,4±6,0	0,5±0,2	3,2±1,0
(Z)-7-Hentriaconteno				0,2±0,1	1,2±0,4
Hentriacontano	2,2±0,6	1,7±0,8	0,8±0,3	3,3±1,1	

Tabela 2. Média e desvio padrão das proporções de cada hidrocarboneto cuticular em cinco espécies de *Melipona* investigadas neste estudo. O número de indivíduos a partir dos quais foram obtidos cromatogramas de íons totais de alta qualidade é apresentado entre parênteses. Os compostos são apresentados na ordem de retenção e aqueles em negrito são os alcanos. (Continuação).

Compostos químicos	<i>M. fasciculata</i> (N=53)	<i>M. quadrifasciata</i> (N=6)	<i>M. scutellaris</i> (N=8)	<i>M. asilvai</i> (N=3)	<i>M. subnitida</i> (N=10)
9,11-Metilhentriacontano				1,4±0,7	
Tritriacontadieno				0,1±0,1	
Tritriacontadieno				0,4±0,0	
(Z)-16-Tritriaconteno				2,2±0,7	
(Z)-14-Tritriaconteno				0,4±0,0	
(Z)-10-Tritriaconteno				0,1±0,1	
(Z)-9-Tritriaconteno		0,5±0,5	0,8±0,4		

Tabela 3. Comparação do número de isômeros alceno e dieno em cada comprimento de cadeia para cada uma das cinco espécies estudadas, além de todos os estudos anteriores publicados. Os isômeros de alceno determinados pela primeira vez neste estudo são dados em negrito.

Espécies	C _{23:1}	C _{25:1} (C _{25:2})	C _{27:1} (C _{27:2})	C _{29:1} (C _{29:2})	C _{31:1} (C _{31:2})	C _{33:1} (C _{33:2})	Total
<i>M. asilvai</i> (Este estudo) ([Z]-16,15,14,12,11,10,9,8,7)	1	3	4(1)	4(2)	3(3)	1(2)	16(8)
<i>M. asilvai</i> (Nascimento & Nascimento, 2012)	2	3	3(2)	4(2)			15(9)
<i>M. beecheii</i> (Quezada-Euan et al., 2013)		1	1	1	2(1)	1(1)	6(2)
<i>M. beecheii</i> (Leonhart et al., 2013)	1	4		3(1)	2		9(1)
<i>M. bicolor</i> (Abdalla et al., 2003)		1	1	1			3
<i>M. costaricensis</i> (Leonhart et al., 2013)	3	4(1)		4(2)	3(4)	1(1)	15(8)
<i>M. fasciculata</i> (Este estudo) ([Z]-9)			1	1	1		3
<i>M. marginata</i> (Ferreira-Caliman et al., 2010)	1	3	3	2(2)	4(2)		13(4)
<i>M. quadrifasciata</i> (Este estudo) ([Z]-9,14)		1	1	2	1	1	6
<i>M. rufiventris</i> (Pianaro et al., 2007)	2	2	2	2(1)	2(3)	2(2)	12(6)
<i>M. scutellaris</i> (Pianaro et al., 2007)		2	2	2(1)	1	1	8(1)
<i>M. scutellaris</i> (Este estudo) ([Z]-9, 11)	1	2	2	2(1)	1	1	9(1)
<i>M. subnitida</i> (Santos et al., 2015)	1	3	3	3(2)	2(2)		12(4)
<i>M. subnitida</i> (Este estudo) ([Z]-12,10,9,8,7,6)		3	2	3(2)	2(2)		10(4)
Total	12	32(1)	25(3)	34(16)	24(17)	8(6)	

Perfis de HCC em colônia de *M. fasciculata*. Não foram encontradas diferenças qualitativas específicas entre as seis colônias de *M. fasciculata*. Também, não foram encontradas diferenças quantitativas claras e consistentes específicas de

colônia em alcano ou nos perfis (Z)-9-alcenos (Fig. 2), indicando que dentro da colônia, a variação é semelhante entre as colônias. A confirmação foi realizada por meio da análise discriminante, que também foi incapaz de separar claramente as seis colônias ou três locais, seja quando todos os HCC ou apenas os (Z)-9-alcenos foram usadas (Fig. 3).

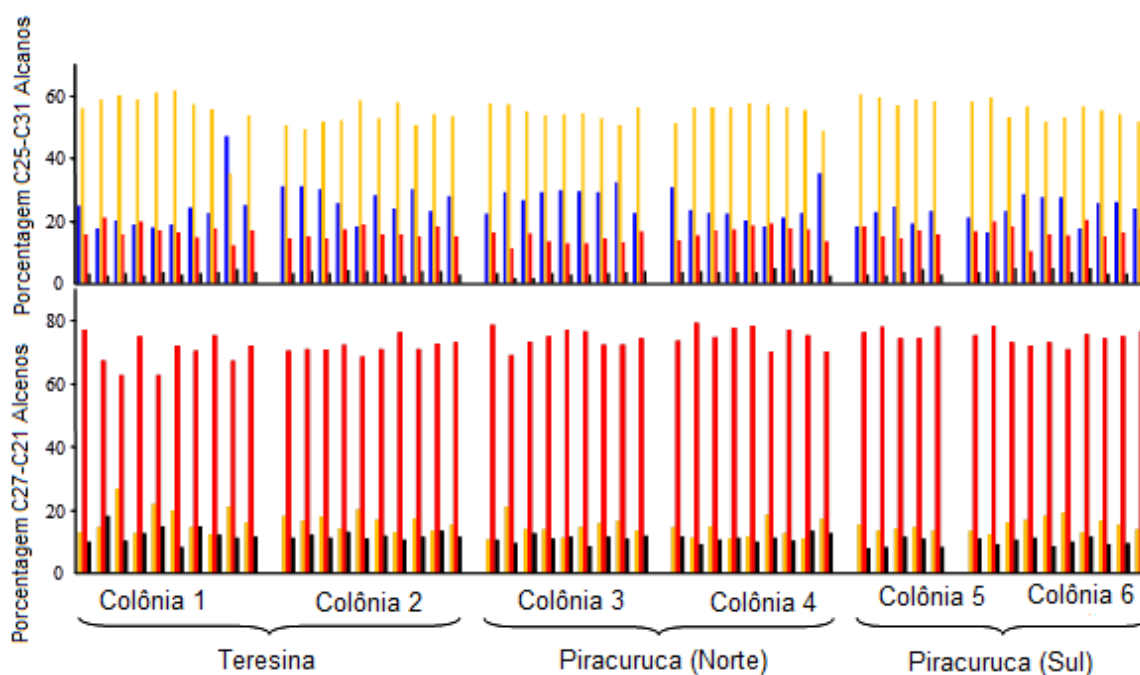


Figura 2. Proporção de alcanos (superior) e (Z) -9-alcenos (inferior) de 53 indivíduos de *Melipona fasciculata* a partir de seis colônias localizadas em três meliponários no Estado do Piauí. Cada comprimento de cadeias de carbono tem uma cor diferente C₂₅ = azul, C₂₇ = amarelo, C₂₉ = vermelho e C₃₁ = preto.

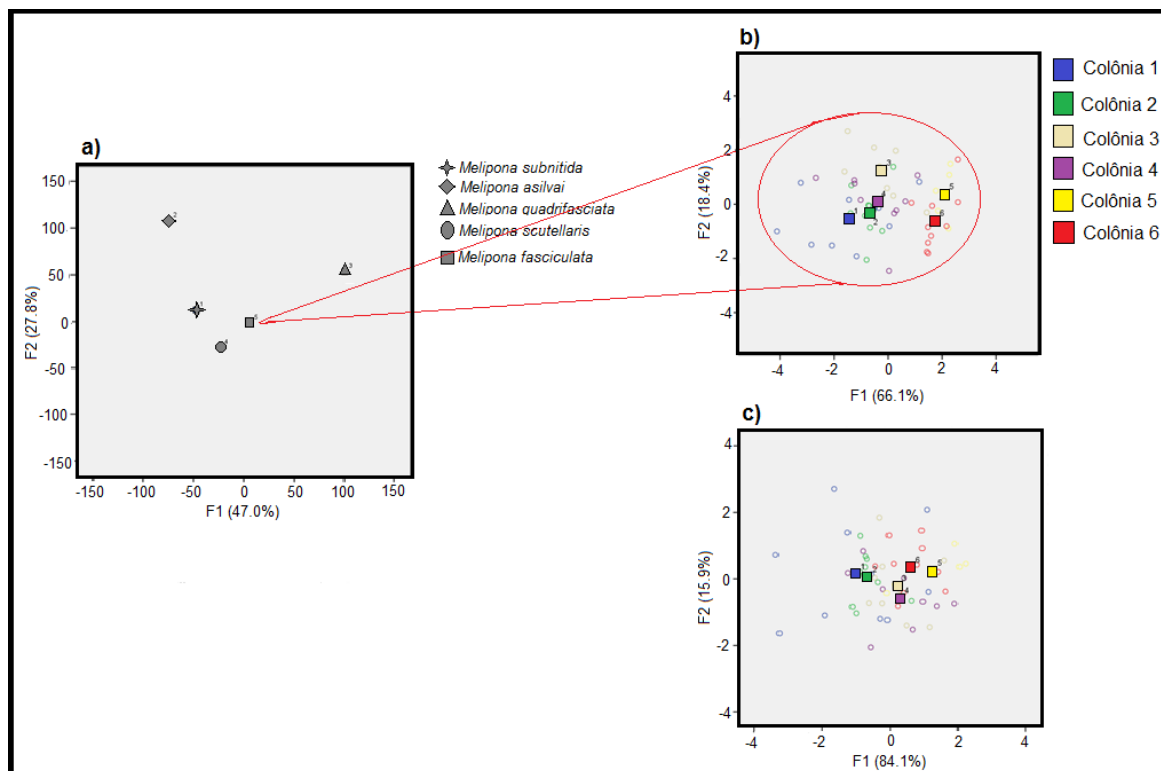


Figura 3. Análise discriminante mostrando a) a separação entre cinco espécies de *Melipona*; b) Separação entre seis colônias de *Melipona fasciculata* utilizando apenas os alcenos Z9; e c) Separação entre seis colônias de *Melipona fasciculata* utilizando todos os CHCs- Hidrocarbonetos Cuticulares

Tabela 4. Os valores de correlação média (r^2) entre os montantes relativos dos importantes alcanos e (Z)-9-alcenos no perfil de hidrocarboneto cuticular -HCC de *Melipona fasciculata* em termos de espécie e da colônia.

Isômeros	Espécies (n=55)	Colônias (n=6)
C ₂₅ vs C ₂₇	0,85	0,87±0,07
C ₂₇ vs C ₂₉	0,93	0,90±0,18
C ₂₉ vs C ₃₁	0,84	0,81±0,19
(Z)-9-C _{27:1} vs (Z)-9-C _{29:1}	0,93	0,96±0,03
(Z)-9-C _{29:1} vs (Z)-9-C _{31:1}	0,95	0,98±0,02

Efeito do meio-ambiente no perfil de HCC. Apesar dos HCC terem sido extraídos usando um método padrão, a quantidade média de íons diferem grandemente entre as espécies (Tabela 5). É possível sugerir que esta diferença não foi associada com o tamanho do corpo, número de olefinas, localização ou clima. Foram usados todos os dados disponíveis para procurar qualquer associação entre a proporção de produção de alceno em espécies e as condições climáticas onde elas foram coletadas (Fig. 4). Isto indica que nenhum padrão claro foi criado, apesar das amostras terem sido analisadas para várias espécies que vivem nas várias zonas climáticas muito diferentes (Fig. 4).

Tabela 5. Contagem total de íons de hidrocarbonetos extraídos das asas, o número de isômeros de alceno e o habitat das cinco espécies de *Melipona* spp. de diferentes regiões do Nordeste do Brasil.

Espécies	Total de íons	Tamanho do corpo (cm)	Números de isômeros de alcenos	Habitat
<i>M. asilvai</i>	1,69E+10	0,69 cm	23	Semiárido e Cerrado
<i>M. scutellaris</i>	3,77E+9	1,20 cm	9	Floresta úmida
<i>M. quadrifasciata</i>	2,84E+9	0,82 cm	7	Cerrado
<i>M. fasciculata</i>	7,30E+7	1,00 cm	3	Semiárido
<i>M. subnitida</i>	5,00E+7	0,88 cm	15	Semiárido

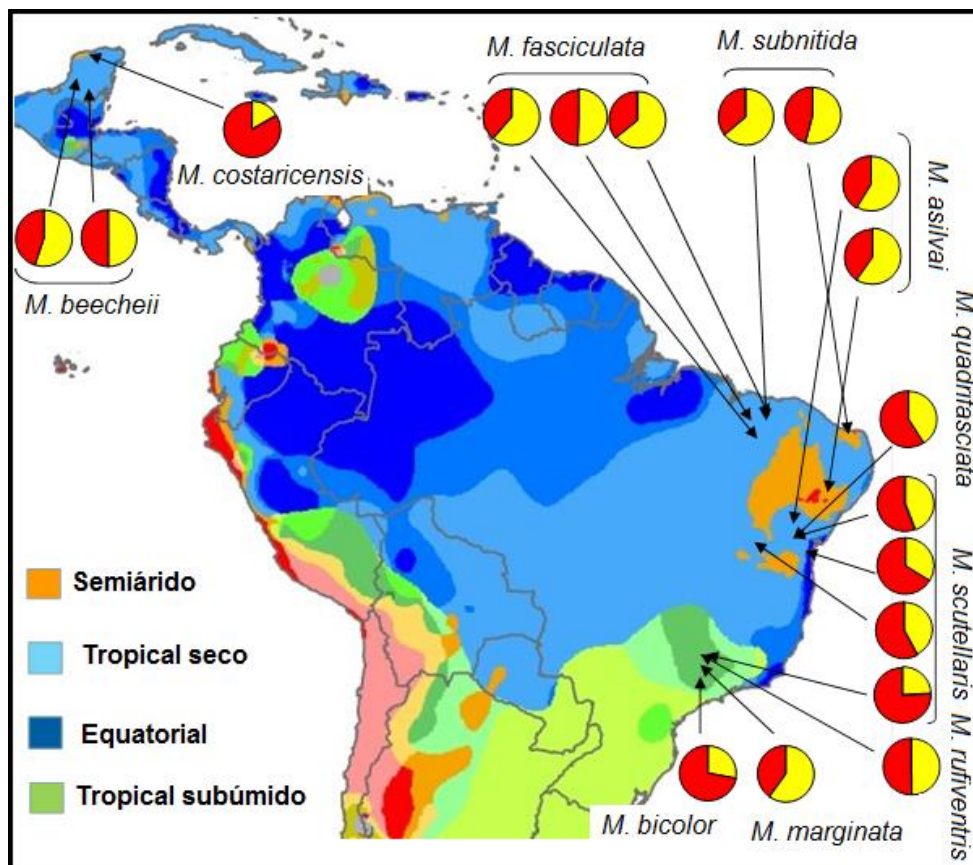


Figura 4. Proporção de alcanos (vermelho) e olefinas (amarelo) para dez espécies de *Melipona* que foram amostradas em quatro diferentes zonas climáticas na América Central e do Sul. *M. asilvai* (Nascimento & Nascimento, 2012); *M. beecheyi* (Quezada-Euan et al., 2013; Leonhart et al., 2013); *M. bicolor* (Abdalla et al., 2003; Abdalla et al., 2003); *M. costaricensis* (Leonhart et al., 2013); *M. marginata* (Ferreira-Caliman et al., 2010); *M. rufiventris* (Pianaro et al., 2007); *M. scutellaris* (Pianaro et al., 2007); *M. subnitida* (Santos et al., 2015). Adaptado: File:South-America_Koppen_Map.png.

Discussão

Cada perfil de HCC das 10 espécies de *Melipona* estudadas até agora é único, mesmo se baseado somente em sua produção de isômero alceno (Tabela 3). Um número significativo de isômeros de alceno foi obtido em apenas cinco espécies em que determinamos os isômeros posicionais. Por exemplo, *M. asilvai* apresentou nove isômeros posicionais (Z)-16, (Z)-15, (Z)-14, (Z)-12, (Z)-11, (Z)-10, (Z)-9, (Z)-8 e (Z)-7, que, quando combinados com o comprimento diferente do

carbono da cadeia, resultou na produção de 23 isômeros de alceno (Tabela 1). Este é o mais alto número de isômeros encontrado em qualquer espécie de Hymenoptera estudada até agora (Kather & Martin, 2015). O único outro grupo de insetos que realmente obteve diversificação na produção de isômero alceno é a forma primitiva eusocial de mamangabas (*Bombus* spp.). Neste grupo, até nove isômeros alceno posicionais de (Z)-5 a (Z)-21 são produzidos, novamente em padrões estáveis únicos específicos de espécie (Martin et al., 2010). Em termos evolucionários, mamangabas (*Bombini*) são o grupo irmão de abelhas-sem-ferrão (*Meliponini*) (Koulianos et al., 1999) e podem ajudar a explicar porque esses grupos diversificaram suas produções de alceno em relação a todos os outros grupos de Hymenoptera (Kather & Martin 2015).

Apesar dos diversos padrões de isômeros detectados neste estudo, o número relatado de alcenos em três espécies que tinham sido anteriormente estudadas foi muito semelhante para cada uma das espécies deste estudo (Tabela 2). Isto ocorreu apesar de terem sido coletadas em locais ou zonas climáticas totalmente diferentes (Figs. 1 e 2). Esta estabilidade do perfil de HCC específico de espécies ao longo de grandes distâncias geográficas também foi encontrada em formigas *Formica* (Martin et al., 2008b) e *Myrmica* (Guillem et al., 2016). Isso ajuda a explicar porque fatores ambientais aparentam ter pouco ou nenhum impacto no perfil qualitativo de HCC.

Leonhardt et al. (2013) também demonstraram que os alcanos, alcenos e alcadienes tiveram pouca ou nenhuma correlação com a distribuição geográfica de abelhas-sem-ferrão do sudeste da Ásia, na Austrália e na América Central. Sugere-se que em moscas *Drosophila*, o clima afete as proporções dos alcanos produzidos (Rouault et al., 2001), no entanto, não foi possível detectar qualquer efeito entre os abelhas-sem-ferrão neotropicas (Fig. 3). Além disso, em *M. bicolor*, a proporção de alcanos no perfil de HCC variou entre 74% em operárias que trabalhavam próximo a região de área de cria para apenas 28% em operárias forrageiras, ou seja, abelhas responsáveis pela coleta de alimento fora caisa. (Abdalla et al., 2003). Para *M. marginata*, foi relatada na situação oposta (alcanos = 45% e 60% de operárias e forrageiras, respectivamente) (Ferreira-Caliman et al., 2010). Portanto, qualquer resultado pode também ser influenciado pela idade de abelha amostrada, além de ser específico de espécie.

A importância dos alcenos como sinais putativos de reconhecimento é corroborada pela produção de grandes proporções de pelo menos um alceno em cada espécie. Além disso, a correlação entre a diferença de comprimento de cadeia (Z)-9-alceno é quase 1, ou seja, perfeito, nos principais estudos das espécies *M. fasciculata* (Tabela 3). Este padrão de compostos altamente correlacionados ocorre amplamente em formigas em HCC usados no reconhecimento de operárias (Martin & Drijfhout, 2009). Portanto, foi inesperado que nenhuma diferença clara de colônia foi encontrada entre as seis colônias de *M. fasciculata*, uma vez que o reconhecimento do companheiro de ninho tenha sido demonstrado estreitamente relacionados a *Melipona asilvai* (Nascimento & Nascimento, 2012). Embora a correlação dos valores entre os alcenos tenha sido sempre superior dentro de uma colônia em relação a população, o que pode indicar a existência de um perfil específico de colônia em *M. fasciculata*, ela é muito pequena para que tenhamos certeza (Fig. 2).

Seria interessante investigar se um padrão semelhante ocorre em outras espécies. Um problema central em ecologia química é que a sensibilidade dos insetos à mudança química é muito maior do que somos capazes de detectar, mesmo com nossos melhores métodos (Informação Pessoal do Dr. John Stephen Martin, 2017). Portanto, a menos que a variação de sinais concretos de colônia sejam grandes (por exemplo, como em *Formica exsecta*, Martin et al., 2008a), continua a ser difícil detectá-los, como foi o caso da abelha melífera (*Apis mellifera*) (Pradella et al., 2015).

Referências

Abdalla FC, Jones GR, Morgan ED, Cruz-Landim C (2003) Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. Gen Mol Res 2:191-199.

Blomquist GJ, Bagnères AG (2010) Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology. New York, Cambridge University Press.

Breed MD, Bennett B (1987) Kin recognition in highly eusocial insects. In: Fletcher DJC, Michener CD (Eds) *Kin Recognition in Animals*, John Wiley and Sons, Chichester, pp 243-285.

Carlson DA, Roan C-S, Yost RA, Hector J (1989) Dimethyl disulfide derivatives of long chain alkenes, alkadienes, and alkatrienes for gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem.* 61: 1564-1571.

Ferreira-Caliman MJ, Nascimento FS, Turatti IC, Mateus S, Lopes NP, Zucchi R (2010) The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. *J Insect Physiol* 56:800-804.

Guillem RM, Drijfhout FP, Martin SJ (2016) Species-specific cuticular hydrocarbon stability within European *Myrmica* ants. *J Chem Ecol* 42(10): 1052-1062.

Howard RW, Blomquist GJ (2005) Ecological, behavioural, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Ann Rev Entomol* 50:371-393.

Kather R, Martin SJ (2015) Evolution of cuticular hydrocarbons in the Hymenoptera: A Meta-Analysis. *J Chem Ecol* 41:871-883.

Kerr WE, Jungnickel H, Morgan ED (2004) Workers of the stingless bee *Melipona scutellaris* are more similar to males than to queens in their cuticular compounds. *Apidologie* 35:611-618.

Koulianos S, Schmid-Hempel R, Roubik DW, Schmid-Hempel P (1999) Phylogenetic relationships within the corbiculate Apinae (Hymenoptera) and the evolution of eusociality. *J Evol Biol* 12:380-384.

Leonhardt SD, Rasmussen C, Schmitt T (2013) Genes versus environment: geography and phylogenetic relationships shape the chemical profiles of stingless bees on a global scale. *Proc R Soc B* 95:131-140.

Lockey KH (1988) Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol Biol* 89B:595-645.

Martin SJ, Helanterä H, Drijfhout FP (2008a) Colony-specific hydrocarbons identify nest mates in two species of *Formica* ant. *J Chem Ecol* 34:1072-1080.

Martin SJ, Helanterä H, Drijfhout FP (2008b) Evolution of Species-Specific Cuticular Hydrocarbon Patterns in *Formica* Ants. *Biol J Linn Soc* 95:131-140.

Martin SJ, Drijfhout FP (2009) How reliable is the analysis of complex cuticular hydrocarbon profiles by multi-variate statistical methods? *J Chem Ecol* 35:375-382.

Martin SJ, Carruthers JM, Williams PH, Drijfhout, FP (2010) Host specific social parasites (*Psithyrus*) indicate chemical recognition system in Bumblebees. *J Chem Ecol* 36:855-863.

Michener CD (2000) *The Bees of the World*. John Hopkins University, London.

Michener CD, Grimaldi DA (1988) The oldest fossil bee: Apoid history, evolutionary stasis, and antiquity of social behavior. *Proc Nat Acad Sci USA* 85:6424-6426.

Nascimento DL, Nascimento FS (2012) Acceptance threshold hypothesis is supported by chemical similarity of cuticular hydrocarbons in a stingless bee, *Melipona asilvai*. *J Chem Ecol* 38:1432-1440.

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

Pianaro A, Flach A, Patricio EFLRA, Nogueira-Neto P, Marsaioli AJ (2007) Chemical changes associated with the invasion of a *Melipona scutellaris* colony by *Melipona rufiventris* workers. *J Chem Ecol* 33:971-984.

Pradella D, Martin SJ, Dani FR (2015) Using errors by guard honeybees (*Apis mellifera*) to gain new insights into nest-mate recognition signals. *Chem Senses* 40:649-653.

Prestwich GD, Blomquist GJ (2014) Pheromone biochemistry. Academic Press, London.

Quezada-Euan JJG, Ramirez J, Eltz T, Pokorny T, Medina R, Monsreal R (2013) Does sensory deception matter in eusocial obligate food robber systems? A study of *Lestrimelitta* and stingless bee hosts. *Anim Behav* 85: 817-823.

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

Rouault J, Capy P, Jallon JM (2001) Variations of male cuticular hydrocarbons with geoclimatic variables: an adaptative mechanism in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 110:117-130.

Roubik DW (1989) Ecology and Natural History of Tropical Bees, Cambridge University Press, New York.

Sakagami SF (1982) Stingless bees. In: Hermann, H R (ed) Social insects III. Academic Press, New York, pp 361-423.

Santos CF dos, Ferreira-Caliman MJ, Nascimento FS (2015) An alien in the group: eusocial male bees sharing nonspecific reproductive aggregations. *J Insect Sci* 15:157. doi:10.1093/jisesa/iev107.

Tannure-Nascimento IC, Nascimento FS, Zucchi R (2008) The look of royalty: visual and odour signals of reproductive status in a paper wasp. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 275:2555-2561

Tannure-Nascimento IC, Nascimento FS, Dantas JO, Zucchi R (2009) Decision rules for egg recognition are related to functional roles and chemical cues in the queen less ant *Dinoponera quadriceps*. *Naturwissenschaften* 96:857-861.

Wilson EO (1970) *Chemical communication within animal species*. Academic Press, New York.

Wyatt TD (2013) *Pheromones and animal behaviour: Communication by smell and taste*. New York Cambridge University Press.

ARTIGO 4

DETECÇÃO DO VÍRUS DEFORMADOR DE ASAS EM *Melipona fasciculata* E *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE) NA REGIÃO MEIO NORTE DO BRASIL¹

¹Nota Científica a ser ajustada para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico *Journal of Apicultural Research*, em versão na língua inglesa.

DETECÇÃO DO VÍRUS DEFORMADOR DE ASAS EM *Melipona fasciculata* E *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE) NA REGIÃO MEIO NORTE DO BRASIL

Resumo: Com o presente declínio de polinizadores em todo o mundo, pesquisadores buscam uma resposta para a causa da mortalidade das abelhas. Um dos fatores que tem sido apontado como possível causador desse declínio é a ação de patógenos, e dentre estes, o vírus deformador das asas de abelhas (DWV). A presença desse vírus já foi detectada em abelhas africanizadas em São Paulo e Bahia. Neste estudo, foi detectada a presença do vírus DWV em *M. fasciculata* e *A. mellifera* no estado do Piauí através de PCR convencional e qPCR. Até o momento, não existem relatos de danos causados por esse vírus em abelhas no Brasil, no entanto, a presença deste e sua dispersão para as abelhas nativas colocam em alerta para possíveis danos futuros que a infecção aguda acometida por esses vírus pode causar em abelhas africanizada e nas abelhas nativas.

Palavra-chaves: DWV, Doença das Abelhas, Desordem do Colapso das Colônias

DETECTION OF THE WING DEFORMER VIRUS OF *Melipona fasciculata* AND *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE) NA REGIÃO MEIO NORTE DO BRASIL

Abstract: With the present decline of pollinators around the world, researchers are looking for an answer to the cause of bee mortality. One of the factors that have been identified as the possible cause of this decline is the action of pathogens, and among them, the deformed wing virus (DWV). The presence of this virus has already been detected in Africanized bees in São Paulo and Bahia. In this study, the presence of DWV virus in *M. fasciculata* and *A. mellifera* in the state of Piauí was detected through conventional PCR and qPCR. To date, there are no reports of damage caused by this virus in bees in Brazil, however, the presence of this and its dispersion to the native bees alert to possible future damages that the acute infection caused by these viruses can cause in bees And native bees.

Key words: DWV, Bees Disease, Colony Collapse Disorder

INTRODUÇÃO

As abelhas são importantes pelo serviço de polinização prestado nos ambientes naturais e agrícolas, bem como pelos produtos que são obtidos na apicultura e meliponicultura (Govan et al., 2000). No entanto, desde 2007 a população de abelhas no mundo está em declínio (Maori et al., 2007; Ribière et al., 2008). Dentre as várias causas relacionadas com o declínio das abelhas, destaca-se a ocorrência de viroses, como a causada pelo vírus deformador de asas (deformed wing virus - DWV) em *Apis mellifera* (Leat et al., 2000; Tentcheva et al., 2006; Genersch, 2010).

O DWV é transmitido pelo ectoparasita *Varroa destructor*, cujas colônias infestadas têm revelado níveis virais alarmantes, com consequentes perdas dessas colônias devido ao comprometimento do desenvolvimento de pupas e adultos. Na ausência de *V. destructor* os níveis de DWV são baixos, geralmente causando infecções assintomáticas (Ryabov et al., 2014). A concentração viral de DWV, incluindo as suas estirpes virulentas, são transmitidas via oral durante a fase de larva, causando infecções assintomáticas, podendo estar presente em níveis baixos e tornando possível que as abelhas infectadas sobrevivam até a idade adulta e transmitam o vírus horizontalmente ou verticalmente para outras abelhas (Yue e Genersch de 2005).

No Brasil, o DWV foi detectado em abelhas africanizadas nos estados de São Paulo (Teixeira et al., 2008) e da Bahia (Brettell et al., 2017), despertando o interesse de pesquisadores brasileiros e estrangeiros para a realização de estudos de detecção e possíveis impactos que esse vírus possa causar nessas abelhas. A transmissão desse patógeno entre as espécies de abelhas, por meio do compartilhamento dos recursos alimentares, tornou-se fator comprovado para o vírus DWV, que também pode contaminar outros insetos que compartilhem dos mesmos recursos florais (Fürst et al., 2014).

Registros de viroses, anteriormente relatados exclusivamente nas espécies do gênero *Apis*, tem sido relatados também para outras espécies de abelhas, como em *Bombus terrestris* pelo (Meeus et al., 2014; McMahon et al., 2015; Fürst et al., 2014; Parmentier et al., 2014); *Scaptotrigona mexicana* (Guzman-Novoa et al., 2016) e em *Melipona scutellaris* no Brasil (Ueira-Vieira et

al., 2015). Além do aumento do relato de mortes de colônias de *A. mellifera* (Teixeira et al. 2008) e abelhas-sem-ferrão no Brasil (Jaffé et al., 2015; Ueira-Vieira et al., 2015).

Esse conjunto de fatores demonstra a importância da realização de estudos sobre a ocorrência do DWV em *A. mellifera* e abelhas nativas em regiões onde a atividade apícola e melipônica são desenvolvidas. Neste sentido, este estudo teve por objetivo investigar a presença do vírus DWV em *M. fasciculata* e *A. mellifera*, duas espécies de abelhas de interesse econômico na região Meio-Norte do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de abelhas *M. fasciculata* e *A. mellifera* assintomáticas para o vírus deformador da asa foram coletadas em dois municípios do Estado do Piauí, localizado na região Meio-Norte do Brasil (Tabela 1).

Tabela 1. Número de amostras e local de coleta de espécimes de *Apis mellifera* e *Melipona fasciculata* provenientes da região Meio-Norte do Brasil.

Espécie	Localidade		Número de abelhas
	Teresina (03°30'33,2"/042°11'40,4")	Piracuruca (04°55'10,5"/41°43'13,6")	
	N	N	
<i>Apis mellifera</i>	03	-	90
<i>Melipona fasciculata</i>	02	04	60

Legenda: N: número de colônia por localidade.

Em cada colônia de *A. mellifera* foram coletadas 30 abelhas e nas colônias de *M. fasciculata* foram coletadas 10 abelhas. Após a coleta, as abelhas foram imediatamente acondicionadas em recipiente contendo gelo e em seguida transportadas para o laboratório, e mantidas a -80 °C. As abelhas foram enviadas para o Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Salford (Manchester, Inglaterra) em nitrogênio líquido, por meio de contêiner para transporte de amostras biológicas.

Extração do RNA- As amostras foram maceradas em *pool* (10 abelhas em *M. fasciculata* e 30 abelhas em *A. mellifera* assintomáticas por amostra, sendo cada colônia uma amostra), utilizando nitrogênio líquido, e cadinho e pistilo de porcelana previamente esterilizados. A extração do RNA total foi procedida, com 15 mg do macerado, utilizando mini kit RNeasy (Qiagen®), de acordo com o protocolo do fabricante, exceto que o RNA foi eluído em 40 µL de água livre de RNase, seguido por quantificação em espectrofotômetro Nanodrop 8000 (Thermo Scientific®), para padronização da quantidade de RNA total em 25 ng/µL, antes do armazenamento a -80 °C (Martin et al., 2012).

One-step PCR para detecção de DWV- A síntese do cDNA foi realizada por transcrição reversa utilizando o kit One-Step RT-PCR (Qiagen®), de acordo com o protocolo do fabricante, exceto que foi adicionando 0,25 µL de Rnase In (Promega®). As amplificações foram feitas em termociclador Veriti (Applied Biosystems®), sendo adicionados os primers: DWVQ_F - 5'-TAGTGCTGGTTTTTCCTTTGTC-3', e DWVQ_R1 - 5'-CTGTGTCGTTGATAATTGAATCTC-3' (Highfield et al. 2009), na realização da amplificação do vírus deformador de asas de abelha (DWV). Como controle negativo foi utilizado água livre de RNase e para controle positivo utilizou-se RNA extraído de abelhas *A. mellifera* europeias que apresentavam deformações nas asas e resultados positivos para o vírus em testes realizados previamente.

A programação utilizada no termociclador para amplificação do cDNA para o DWV foi: 49 °C por 30 minutos (transcriptase reversa), 95 °C por 15 minutos (desnaturação), seguido de 94 °C por 15 segundos, 54 °C por 30 segundos e 72 °C por 20 segundos por 40 vezes, para anelamento. Completando com 72 °C por 10 minutos e finalizando com 4 °C por tempo indeterminado.

Após a PCR as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2%, com *hiperladder* de 100 Kb e após visualizado em luz ultravioleta em câmara Gene Snap (Syn Gene®), onde o resultado positivo foi observado em banda com amplificação de 145 pares de bases.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O vírus DWV foi detectado em todas as amostras de *A. mellifera* e *M. fasciculata* (Figura 1).

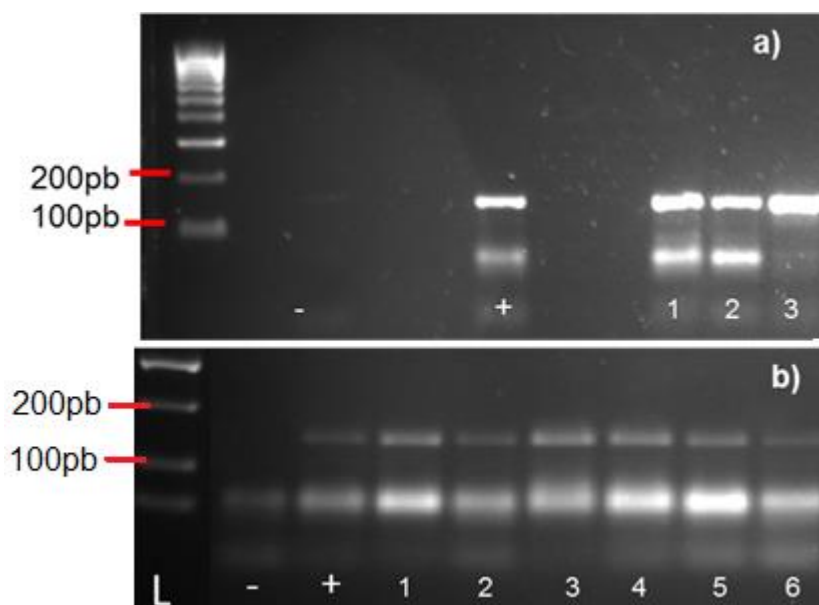


Figura 1- Eletroforese para detecção molecular do vírus DWV. a) Detecção molecular do DWV em *Apis mellifera*, linha -: controle negativo (água livre de Rnase); linha +: controle positivo com amostra positiva para o vírus DWV; linha 1-3, amostras positivas em *Apis mellifera*. b) Detecção molecular do DWV em *Melipona fasciculata*, linha -: controle negativo (água livre de Rnase); linha +: controle positivo com amostra positiva para o vírus DWV; linha 1-6, amostras positivas em *Melipona fasciculata*. Linha L (esquerda) = Ladder de 100 pb.

O presente estudo é o primeiro registro do vírus DWV em *A. mellifera* do Piauí, bem como em *M. fasciculata* no Brasil. O DWV já foi anteriormente detectado em *A. mellifera* no sudeste do Brasil, juntamente com registro de declínio desses insetos (Teixeira et al., 2008) e na Bahia (Brettell et al., 2017).

Ainda não foi possível determinar quais os possíveis danos que o DWV possa causar em *M. fasciculata* ou outras espécies de abelhas-sem-ferrão, mas já se conhece os danos desse vírus em *A. mellifera*, reduzindo a longevidade da abelha e, conseqüentemente, levando à morte da colônia (Martin et al., 2012, Modercai et al., 2015, 2016). Recentemente, foi registrada a deformação de asas

em abelhas africanizadas no Brasil causada pelo DWV. Certamente, qualquer redução potencial da abundância de espécies de abelhas devido à infecções virais terá impacto nos ecossistemas agrícolas e naturais.

Como as abelhas *A. mellifera* e *M. fasciculata* partilham dos mesmos recursos alimentares, como néctar e pólen, esta pode ter sido uma possível via de transmissão desse vírus entre essas espécies. Uma vez que o DWV já foi detectado em grãos de pólen (Mazzei et al. 2012). Bem como em outras abelhas-sem-ferrão que compartilham pasto com abelhas africanizadas (Guzman-Novoa et al., 2016; Ueira-Vieira et al. 2015).

No Brasil, os estudos sobre o DWV ainda são escassos, e pouco se sabe sobre a dispersão desse vírus no país, tanto em abelhas nativas sem ferrão como em *A. mellifera*.

CONCLUSÃO

O presente estudo registra a presença do vírus DWV em *Apis mellifera* e *Melipona fasciculata* na região Meio-Norte do Brasil. E essa é a primeira detecção desse vírus na espécie de abelha-sem-ferrão *M. fasciculata*.

REFERÊNCIAS

Brettell, L. E., Modercai, G. J.; Schroeder, D. C.; Jones, I. M.; Silva, J. R.; Vicente-Rubiano, M.; Martin, J. S. (2017). A Comparison of Deformed Wing Virus in Deformed and Asymptomatic Honey Bees. *Insects* 8, 28.

Fürst, M. A., McMahon, D. P., Osborne, J. L., Paxton, R. J., Brown, M. J. F. (2014) Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature*, 506, 364-366.

Genersch, E. (2010). Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 87-97.

Govan, V. A., Leat, N., Allsopp, M., Davison, S. (2000) Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-infecting RNA viruses. *Virology*, 277, 457-463.

Guzman-Novoa, E., Hamiduzzaman, M. M., Baez, R. A., Correa-Benítez, A., Castañeda-Cervantes, E., Arnold N. (2016) First detection of honey bee viruses in stingless bees in North America. *Journal of Apiculture Research*, 54, 2.

Highfield, A.C., El Nagar, A., Mackinder, L.C.M., Noe, L.M.L.J., Hall, M.J., Martin, S.J., Schroeder, D.C. (2009) Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 7212-7220.

Jaffé, R., Pope, N., Carvalho, A. T., Maia, U. M., Blochtein, B., Carvalho, C. A. L., Carvalho-Zilse, G. A., Freitas, B. M., Menezes, C., Ribeiro, M. F., Venturieri, G. C., Imperatriz-Fonseca, V. L. (2015). Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize stingless beekeeping. *PloS ONE*, 10, e0130111 2015.

Leat, N., Ball, B., Govan, V., Davison, S. (2000) Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *Journal of General Virology*, 81, 2111-2119.

Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Peretz, Y., Edelbaum, O., Tanne, E., Sela, I. (2007) Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *Journal of General Virology*, 88, 3428-3438.

Martin, S. J., Highfield, A. C., Brettell, L. E., Villasboas, E. M., Budge, G. E., Powell, M., Nikaido, S., Schoeder, D. C. (2012) Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite. *Science*, 336,1304-1306.

McMahon, D. P., Fürst, M. A., Caspar, J., Theodorou, P., Brown, M. J. F., Paxton, R. J. (2015) A sting in the spit: widespread cross-infection of multiple RNA viruses across wild and managed bees. *Journal of Animal Ecology*, 84, 615-624.

MacMahon, D. P., Natsopoulou, M. E., Doublet, V., Fürst, M., Weging, S., Brown, M. J. F., Gogol-Doring, A., Paxton, R. J. (2016) Elevated virulence of an emerging viral genotype as a driver of honeybee loss. *The Royal Society*, 283, 1833. 10.1098/rspb.2016.0811.

Meeus, I., Miranda, J. R. de, Graaf, D. C. de, Wackers, F., Smagghe, G. (2014) Effect of oral infection with Kashmir bee virus and Israeli acute paralysis virus on bumblebee (*Bombus terrestris*) reproductive success. *Journal of Invertebrate Pathology*, 121, 64-9.

Mordecai, G. J., Brettell, L. E., Martin, J. S., Dixon, D., Jones, I. M., Schroeder, D. C. (2015a) Superinfection exclusion and the long-term survival of honey bees in *Varroa*-infested colonies. *The ISME Journal*, 10, 1182-1191.

Mordecai, G. J., Wilfert, L., Martin, S. J., Jones, I. M., Schroeder, D. C. (2015b) Diversity in a honey bee pathogen: first report of a third master variant of the Deformed Wing Virus quasispecies, *The ISME Journal*, 10, 1264-1273.

Parmentier, L., Smagghe, G., De Graaf, D. C., Meeus, I. (2014) Effect oral infection with Kashmir bee virus and Israeli acute paralysis virus on bumblebee (*Bombus terrestris*) reproductive success. *Journal of Invertebrate Pathology*, 121, 64-9.

Ribièrè, M., Ball, B. V., Aubert, M. Natural history and geographic distribution of honey bee viruses. In: Aubert, M.; Ball, B. V.; Fries, I.; Moritz, R. F.; Milani, N.; Bernardinelli, I. *Virology and the honey bee*, 1 edn, Edited by Luxembourg: European Communities 2008, p. 462.

Ryabov, E. V., Wood, G. R., Fannon, J. M., Moore, J. D., Bull, J. C., Chandler, D., Mead, A., Burroughs, N., Evans, D. J. (2014) A Virulent Strain of Deformed Wing Virus (DWV) of Honeybees (*Apis mellifera*) Prevails after *Varroa destructor*-Mediated, or In Vitro, Transmission. PLOS Pathogens, 10, e1004230.

Teixeira, E. W., Chen, Y., Message, D., Pettis, J., Evans, J. D. (2008) Virus infections in Brazilian honey bees. Journal of Invertebrate Pathology, 99, 117-119.

Tentcheva, D., Gauthier, L., Bagny, L., Fievet, J., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E., Ball, B.V. Bergoin, M. (2006). Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. Apidologie, 37, 41-50.

Ueira-Vieira, C., Oliveira-Almeida, L., Correadealmeida, F., Marques, I., Brandemburgo, M. A. M., Onetti, A. M. (2015). Scientific note on the first molecular detection of the acute bee paralysis virus in Brazilian stingless bees. Apidologie, 46, 628–630. doi: 10.1007/s13592-015-0353-2.

Yue, C., Genersch, E. (2005) RT-PCR analysis of Deformed Wing Virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). Journal of General Virology, 86, 3419-3424.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho avaliou o atual status de diversidade morfológica em populações de *M. subnitida* e *M. fasciculata* da região Meio-Norte do Brasil, identificou perfis de hidrocarbonetos cuticulares em *Melipona* spp. assim como detectou a presença do vírus de deformação de asas em *M. fasciculata* e *A. mellifera*. Destes dados, alguns pontos merecem destaque como sendo inovadores ou confirmando outras hipóteses já levantadas em outros trabalhos:

Melipona subnitida é uma espécie de suma importância para região de sua ocorrência e embora trabalhos venham sendo realizados sobre essa espécie, identificar populações disjuntas dentro de uma mesma região nos propõe objetivos que possam ser desenvolvidos em pesquisas futuras a fim de desvendar o real comportamento geográfico, adaptação em ambientes que apresentam diferentes características climáticas de forma que contribuam na criação de estratégias de planos de manejo e conservação.

As alterações climáticas vêm sendo crescentes nos últimos anos e com tendências a maiores mudanças futuras. Os impactos sobre a distribuição de populações de abelhas, principalmente *Melipona*, através das diferenças ambientais como clima e vegetação foram uns dos principais fatores demonstrados como responsáveis na diferenciação morfológica entre as populações de *M. fasciculata*. Essa é uma evidente necessidade de estudos de melhoramento desta espécie, principalmente para a resistência a alterações climáticas, assim como a urgência em criar áreas de proteção para *M. fasciculata*.

A caracterização sobre perfil químico de abelhas do Gênero *Melipona* e sua relação às diferenças climáticas em abelhas do gênero *Melipona* também nos mostra a importância de entendermos mais claramente questões sobre o comportamento desse gênero.

O estudo sobre a identificação de presença de DWV em abelhas registrou não só a presença do vírus como também suas variantes genéticas A, B e C no Brasil. Essa é a primeira detecção desse vírus em *M. fasciculata* e os seus variantes em abelhas no Brasil e América Latina. O que mostra a necessidade de estudos posteriores que visem avaliar a interação do vírus com as abelhas africanizadas e sociais sem ferrão, uma vez que as variantes mais agressivas já

foram detectadas entre as populações de abelhas no país e juntamente com a presença do ácaro *V. destructor* esse vírus pode causar severos danos para as colônias de abelhas.

Certamente ainda restam muitas questões em aberto quanto à caracterização populacional, estudos sobre perfis hidrocarbonetos cuticulares e estudos sobre a identificação viral em abelhas de um modo geral uma vez que a interação entre esses temas é importante para contribuir no aprimoramento de planos de conservação, conscientização quanto á preservação de habitats naturais para as espécies nativas, incentivo e educação para criação racional e manejo adequado.