

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Manoela Beche

CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE
Bombus morio **DO RIO GRANDE DO SUL BASEADA NO mtDNA**
(COI)

Santa Maria, RS

2019

Manoela Beche

**CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE
Bombus morio DO RIO GRANDE DO SUL BASEADA NO mtDNA
(COI)**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Agronomia**.

Orientador: Prof. Dr. Jerson Vanderlei Carús Guedes

Santa Maria, RS
2019

Ficha catalográfica

Beche, Manoela

CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Bombus morio* DO RIO GRANDE DO SUL BASEADA NO mtDNA (COI) / Manoela Beche.- 2019.

53 p.; 30 cm

Orientador: Jerson Vanderlei Carus Guedes

Coorientadora: Betina Blochtein

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Agronomia, RS, 2019

1. *Bombus morio* 2. Biologia molecular 3. mtDNA 4. Rio Grande do Sul 5. Abelhas I. Carus Guedes, Jerson Vanderlei II. Blochtein, Betina III. Título.

© 2019

Todos os direitos autorais reservados a **Manoela Beche**. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço: Rua General Neto, Nº 515, Apto. 203, Santa Maria, RS, Brasil CEP: 97.050-241

E-mail: bechmanoela@gmail.com

Manoela Beche

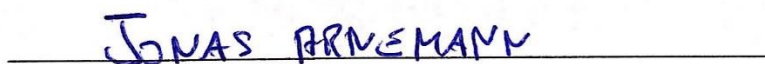
**CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE
Bombus morio DO RIO GRANDE DO SUL BASEADA NO mtDNA
(COI)**

Dissertação apresentada Programa de Pós-graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Agronomia**.

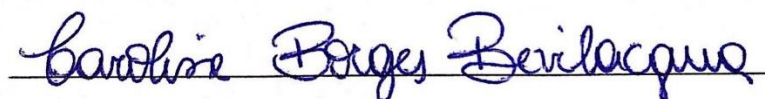
Aprovado em 28 de fevereiro de 2019:



Jerson Vanderlei Carús Guedes, Dr. (Presidente/Orientador)



Jonas André Arnemann, Dr. (UFSM)



Caroline Borges Bevilacqua, Dra. (EMEFAR) - **Parecer**

Santa Maria, RS

2019

DEDICATÓRIA

OFEREÇO

Aos meus pais, Neuri e Iris Beche.

Aos meus irmãos, Daniele e Eduardo.

Ao meu companheiro, Bruno de Aguiar.

Obrigado a todos pelo amor incondicional.

As inúmeras abelhas que perderam suas vidas para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor e amigo Jerson Vanderlei Carús Guedes pela orientação, ensinamentos, e incentivo desde a graduação e que foram essenciais para desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos meus pais Neuri e Iris Beche e aos meus irmãos Daniele e Eduardo pelo apoio incondicional e suporte às minhas decisões.

Ao meu companheiro Bruno de Aguiar, pelo exemplo de dedicação como profissional, apoio, companheirismo desde a graduação e compreensão pelos meus momentos de ausência, principalmente durante a coleta de dados.

Ao Professor e amigo Jonas André Arnemann pelos ensinamentos e colaboração para o desenvolvimento de parte desse trabalho.

Ao funcionário Gustavo Ugalde pelos ensinamentos e ajuda na extração de DNA e PCRs.

Aos colegas e amigos de pós-graduação Ivair Valmorbida, Jocélia Goçalves, Clérison Régis Perini, Luis Eduardo Curioletti, Maiquel Pizzuti Pes e Régis Felipe Stacke pela companhia, troca de conhecimento e amizade.

Aos bolsistas e estagiários do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LabMIP) pela amizade e ajuda na coleta de dados e condução deste trabalho.

A todos aqueles que não foram citados, mas que de alguma maneira colaboraram na execução desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou
o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o
que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Bombus morio* DO RIO GRANDE DO SUL BASEADA NO mtDNA (COI)

AUTORA: Manoela Beche

ORIENTADOR: Jerson Vanderlei Carús Guedes

As abelhas, insetos pertencentes à ordem Hymenoptera, são consideradas o mais importante e especializado grupo de polinizadores. Dentro deste grupo podemos destacar as abelhas do gênero *Bombus*, conhecidas popularmente como mamangavas. *Bombus* é importante para a manutenção da biodiversidade de ecossistemas naturais em todo globo terrestre, mas também são eficientes polinizadores de uma grande diversidade de plantas nativas e cultivadas. O conhecimento da diversidade dessas abelhas por meio de ferramentas moleculares pode ser utilizado para entender os processos que moldam ou moldaram as populações, possibilitando delinear estratégias para o manejo, exploração racional e conservação. O trabalho teve por objetivo caracterizar a estrutura genética de populações de *Bombus morio* localizadas no Rio Grande do Sul. Para fazer a caracterização molecular de *B. morio*, foram coletados espécimes em diferentes locais do Rio Grande do Sul. O DNA genômico foi extraído do segundo par de pernas. Após, realizou-se à amplificação parcial do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase I (mtDNA COI), o sequenciamento, a edição e o alinhamento das sequências. Os resultados revelaram uma divergência genética significativa entre as populações de abelhas, e abrigam nove haplótipos mitocondriais, destes, três são haplótipos novos, embora variem por poucos passos mutacionais. As populações de *B. morio* do Rio Grande do Sul, apresentam significativa diversidade genética pelo fato da espécie ser originária do Sul/Sudeste do Brasil e adaptada a condições ecológicas.

Palavras-chave: Abelhas, diversidade, fluxo gênico, mtDNA.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF THE GENETIC VARIABILITY OF *Bombus morio* IN RIO GRANDE DO SUL BASED ON mtDNA (COI)

AUTHOR: Manoela Beche

ADVISOR: Jerson Vanderlei Carús Guedes

Bees, insects belonging to the order Hymenoptera, are considered the most important and specialized group of pollinators. Within this group we can highlight bees of the genus *Bombus*, popularly known as bumblebee. *Bombus* is important for maintaining the biodiversity of natural ecosystems throughout the globe, but are also efficient pollinators of a great diversity of native and cultivated plants. Knowledge of the diversity of these bees through molecular tools can be used to understand the processes that shape populations, making it possible to outline strategies for management, rational exploitation and conservation. The objective of this work was to characterize the genetic structure of *Bombus morio* populations located in Rio Grande do Sul. To perform the molecular characterization of *B. morio*, specimens were collected in different locations of Rio Grande do Sul. Genomic DNA was extracted from the second pair of legs. Then, partial amplification of the mitochondrial Cytochrome C Oxidase I gene (mtDNA COI), sequencing, editing and alignment of the sequences was performed. The results revealed a significant genetic divergence among bee populations, and harbor nine mitochondrial haplotypes, of which three are new haplotypes, although they vary by a few mutational steps. The populations of *B. morio* of Rio Grande do Sul, present significant genetic diversity because the species is native to the South / Southeast of Brazil and adapted to ecological conditions.

Keywords: Bees, diversity, gene flow, mtDNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gel de agarose para confirmação de PCR.....	23
Figura 2. Mapa de coletas recentes (realizadas para este trabalho) e coletas anteriores (realizadas para trabalhos anteriores) de <i>Bombus morio</i> no estado do Rio Grande do Sul.	28
Figura 3. Network de haplótipos de <i>Bombus morio</i> no estado do Rio Grande do Sul. As áreas circulares são proporcionais a frequência de cada haplótipo e os traços representam o número de diferença entre cada haplótipo. TA, Três Arroios; POA, Porto Alegre; FW, Frederico Westphalen; PEL, Pelotas; SM, Santa Maria; ST, Santiago; SCS, Santa Cruz Do Sul; LAJ, Lajeado; SL, Santana do Livramento; LS, Lavras do Sul; CS, Caçapava do Sul; DP, Dom Pedrito.	32
Figura 4. Distribuição de haplótipos de cada população de <i>Bombus morio</i> no estado do Rio Grande do Sul. O tamanho do círculo é relativo ao número de indivíduos sequenciados em cada local.	32
Figura 5. Network de haplótipos de <i>Bombus morio</i> na América do Sul utilizando o gene parcial mtDNA COI (383pb) depositados no genBank.	36
Figura 6. Network de haplótipos <i>Bombus morio</i> na América do Sul, utilizando o gene parcial mtDNA COI (383pb). As áreas circulares são proporcionais a frequência de cada haplótipo. TA, Três arroios; POA, Porto Alegre; FW, Frederico Westphalen; PEL, Pelotas; SM, Santa Maria; ST, Santiago; SCS, Santa Cruz Do Sul; LAJ, Lajeado; SL, Santana do Livramento; LS, Lavras do Sul; CS, Caçapava do Sul; DP, Dom Pedrito; IGRA, Igrapiúna; TER, Teresópolis; BRA, Brasília; ARG, Argentina; NLIM, Nova Lima; ILH, Ilha Bela; SP, São Paulo; DOR, Dolores do Rio Preto; CHAP, Chapecó; CAX, Caxias do Sul; IBI, Ibiúna; GUA, Guaratuba; PET, Petrópolis; STE, Santa Tereza do Oeste; VAC, Vacaria; LON, Londrina; SAB, Santo Antonio do Barreiro; AIP, Apiaí; JUD, Jundiá; STER, Terezinha do Itaipu; SAP, Santo Antonio do Planalto; TS, Teodoro Sampaio; LINDO, Lindoeste; PN, Presidente Nereu; AL, Água Limpa; JAB, Jaboticatubas; RP, Ribeirão Preto; SMS, São Mateus do Sul; UB, Uberlândia; CA, Céu Azul; STL, Santa Lúcia; JF, Joaquim Felício; CG, Chapada Gaúcha.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado de PCR em fotodocumentador e a pureza em espectrofotômetro..	24
Tabela 2. Número da amostra dos indivíduos sequenciados com sucesso, local, data da coleta, plantas onde os espécimes de <i>Bombus morio</i> foram coletados no Rio Grande do Sul.....	27
Tabela 3. Populações, número de indivíduos, número de haplótipos, diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica do gene parcial mtDNA de <i>Bombus morio</i> no estado do Rio Grande do Sul.	29
Tabela 4. Haplótipos de <i>Bombus morio</i> do estado do Rio Grande do Sul e seus respectivos sítios variáveis (SNPs).	31
Tabela 5. Valores da estimativa de FST (abaixo da diagonal) e número de migrantes por geração (acima da diagonal) de 15 populações de <i>Bombus morio</i> no Rio Grande do Sul.	34
Tabela 6. Testes de neutralidade, D de Tajima e Fs de Fu, e seus respectivos valores de p.	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Gênero <i>Bombus</i>	15
2.2 Bioecologia do gênero <i>Bombus</i>	16
2.3 <i>Bombus morio</i>	16
2.4 Polinização por <i>Bombus sp.</i>	17
2.5 Declínio da população de polinizadores	18
2.6 Estrutura genética e diversidade de populações	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Amostragem de campo e identificação de <i>Bombus</i> no Rio Grande do Sul	21
3.2 Extração de mtDNA	22
3.3 Amplificação do COI	22
3.4 Obtenção e análise da estrutura genética	24
4 RESULTADOS	26
4.1 Amostragem e coleta de <i>Bombus morio</i> no Rio Grande do Sul	26
4.2. Análise da estrutura genética	28
5 DISCUSSÃO	38
5.1 Amostragem de <i>Bombus morio</i> no Rio Grande do Sul	38
5.2 Análise da estrutura genética	38
6 CONCLUSÕES	42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
8 ANEXOS	52

1 INTRODUÇÃO GERAL

Interações planta-polinizador são relações mutualísticas. Os animais (polinizadores) coletam recursos alimentares (principalmente pólen e néctar), e com isso facilitam a reprodução das plantas. Os polinizadores são essenciais para garantir o funcionamento, reprodução e a manutenção da diversidade de plantas, das quais aproximadamente 80% são dotadas de flores que dependem da polinização animal (KEVAN; IMPERATRIZ-FONSECA, 2002; RICKETTS et al., 2008) e para garantir a produção, tanto em aspecto quantitativo quanto qualitativo (BUCHMANN et al., 1996). Aproximadamente 75% das culturas agrícolas tem aumento da produção quando ocorre polinização animal, e outras tem uma dependência muito baixa podendo produzir até 90% do seu potencial sem a visita de polinizadores (KLEIN et al., 2007).

As abelhas, pertencentes à ordem Hymenoptera, são consideradas mais importante e especializado grupo de polinizadores tropicais, responsáveis por 39% da polinização em ecossistemas naturais e agrícolas (KERR et al., 2001; GOULSON et al., 2008; DANFORTH et al., 2006). Segundo Silveira et al. (2002), no Brasil, foram descritas 1576 espécies, dentre os polinizadores podemos destacar as abelhas do gênero *Bombus*, conhecidas popularmente como mamangavas ou mamangabas, que são considerados polinizadores habilidosos.

O gênero *Bombus* é importante para a manutenção da biodiversidade de ecossistemas naturais em todo globo terrestre, também são eficientes polinizadores de uma grande diversidade de plantas nativas, exóticas e domesticadas (MOURE; SAKAGAMI, 1962; ABRAHAMOVICH; DÍAZ, 2001; GOULSON et al., 2008). Comparado a outras abelhas, como *Apis mellifera*, *Bombus* tem a capacidade de transportar maiores quantidades de grãos de pólen, permitindo visitar um maior número de plantas antes de voltar a colônia e têm maior contato com os estames e pistilos das flores (BUCHMANN, 1983; GOULSON, 2003; VELTHUIS; VAN DOORN, 2006; HEINRICH, 2000; KOPPERT, 2007).

O declínio de espécies polinizadoras está chamando atenção por todo o mundo (BUCHMANN; NABHAN, 1996; KREMEN et al. 2002; KLEIN et al. 2007), não apenas o desaparecimento de *A. mellifera* mas de outras espécies de abelhas também. Há evidências de que muitas espécies de *Bombus* estão desaparecendo em escala global (KOSIOR et al. 2007; COLLA; PACKER 2008; GOULSON et al. 2008; GRIXTI et al. 2009).

O estudo genético de populações visa entender a estrutura genética, ou seja, descrever quanto de variação genética existe dentro e entre populações de insetos. Esse estudo, possibilita entender a história de uma população e elementos para estudos de caracterização de fluxo

gênico entre populações (MEDINA et al., 2012), o quanto heterogêneo é a distribuição dos genótipos, condições que são determinadas pela história evolutiva e pelo potencial de alteração dos organismos (BROWN, 1978). Conhecer a variabilidade genética que ocorre entre populações naturais é relevante para planejar programas de conservação (PERES; RENESTO, 2005).

O DNA mitocondrial é altamente conservado e as suas taxas de mutações são relativamente lentas, é fácil de manipular e existe ausência de recombinação (FREELAND et al., 2011). Dessa forma, a análise do DNA mitocondrial é uma importante ferramenta utilizada em estudos de dinâmica de populações, filogeografia, relações genéticas entre espécies e entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos, sendo que esses dados podem ser usados para propostas de conservação (WILSON et al., 1985; AVISE et al., 1987; MORITZ et al., 1987). Sendo que o mtDNA também já foi utilizado com sucesso em diversos estudos sobre abelhas (LOBO et al., 1989; SHEPARD et al., 1991; ARIAS; SHEPARD, 1996; FRANÇOSO et al., 2016).

O estudo genético de populações visa entender a estrutura genética, ou seja, descrever quanto de variação genética existe dentro e entre populações de insetos. Esse estudo, possibilita entender a história de uma população e elementos para estudos de caracterização de fluxo gênico entre populações (MEDINA et al., 2012), o quanto heterogêneo é a distribuição dos genótipos, condições que são determinadas pela história evolutiva e pelo potencial de alteração dos organismos (BROWN, 1978). Conhecer a variabilidade genética que ocorre entre populações naturais é relevante para planejar programas de conservação (PERES; RENESTO, 2005).

O DNA mitocondrial é altamente conservado e as suas taxas de mutações são relativamente lentas, é fácil de manipular e existe ausência de recombinação (FREELAND et al., 2011). Dessa forma, a análise do DNA mitocondrial é uma importante ferramenta utilizada em estudos de dinâmica de populações, filogeografia, relações genéticas entre espécies e entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos, sendo que esses dados podem ser usados para propostas de conservação (WILSON et al., 1985; AVISE et al., 1987; MORITZ et al., 1987). Sendo que o mtDNA também já foi utilizado com sucesso em diversos estudos sobre abelhas (LOBO et al., 1989; SHEPARD et al., 1991; ARIAS; SHEPARD, 1996; FRANÇOSO et al., 2016).

Para entender mais sobre as populações de abelhas presentes no nosso país são necessários estudos sobre a sua composição e a distribuição de suas espécies (SILVEIRA; GODÍNEZ, 1996). Pouco se sabe sobre o status das populações do gênero *Bombus* no Brasil, e

nesse contexto, o estudo teve como objetivo caracterizar a estrutura genética de populações de *Bombus morio* localizadas no Rio Grande do Sul, utilizando sequências do gene COI do DNA mitocondrial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Bombus*

Bombus sp. são habilidosos polinizadores, importantes para a manutenção da biodiversidade de ecossistemas naturais e diversas culturas agrícolas de interesse econômico (KEVAN et al., 1991; GOULSON et al., 2003; MEMMOTT et al., 2004; PYWELL et al., 2006; GOULSON et al., 2008).

Existem cerca de 250 espécies conhecidas do gênero *Bombus* distribuídas no globo terrestre. A maior parte encontrada em ambientes de baixas temperaturas (MICHENER, 2000; WILLIAMS, 1998), estando amplamente distribuídas por quase todo o Hemisfério Norte. Na América do Sul, há registro de 21 espécies, com ampla distribuição, desde o nível do mar até elevadas altitudes, como por exemplo nos Andes (ABRAHAMOVICH et al. 2004), pois apresentam adaptações termorregulatórias que os permitem viver em regiões frias (HINES, 2008). No Brasil, há registro de *Bombus* em 23 estados, estando ausentes no Piauí, Sergipe e Tocantins (MOURE; MELLO, 2008), foi registrada a presença de sete espécies, o que pode ser considerado um número muito pequeno comparado a outras regiões do mundo. As espécies são: *B. pauloensis* Friese (1913), *B. brevivillus* Franklin (1913), *B. bellicosus* Smith (1879), *B. brasiliensis* Lepeletier (1836), *B. morio* Swederus (1787), *B. transversalis* Olivier (1789) e *B. applanatus* (MOURE; SAKAGAMI, 1962; ABRAHAMOVICH et al., 2004; SILVEIRA et al., 2002; WILLIAMS et al., 2008; FRANCOLO et al., 2015) todos pertencentes ao subgênero Thoracobombus (WILLIAMS et al., 2008). Espécies citadas, apenas quatro espécies têm sua presença confirmada no estado do Rio Grande do Sul: *B. pauloensis*, *B. brasiliensis*, *B. bellicosus* e *B. morio* (ACOSTA, 2015).

As abelhas do gênero *Bombus* (Hymenoptera: Apidae, Bombini) pertencem ao grupo das abelhas corbiculadas, para o transporte de pólen e resina (MICHENER, 2007). São abelhas de grandes dimensões (9 a 25 mm), robustas e pilosas, com comportamento eussocial, apresentando cuidado e proteção com a prole e divisão e cooperação de trabalho no ninho (MICHENER, 1974). Os ninhos são construídos no chão, em cavidades pré-existentes, à profundidade variável, cobertos com detritos vegetais para a fornecer proteção adequada contra

intemperes climáticas (MOURE; SAKAGAMI, 1962), não apresentam uma entrada definida, assim as abelhas podem entrar e sair do ninho por diversos locais.

2.2 Bioecologia do gênero *Bombus*

As abelhas do gênero *Bombus* são univoltinas e apresentam um período de hibernação. As rainhas emergem na primavera para começar novas colônias. As espécies presentes no Brasil podem ser consideradas exceções à regra, como encontram alimento disponível durante todo o ano, não apresentam a característica de hibernação, realizando até dois ciclos de vida por ano (CAMILLO; GARÓFALO, 1989).

A rainha sozinha é responsável por encontrar um local adequado, que proteja de fatores ambientais, e fundar o ninho, para isso necessita de uma quantidade adequada de néctar e pólen (PRYS-JONES; CORBET, 1991; MILLIRON, 1961). A rainha constrói um pote de cera para armazenar o néctar necessário para iniciar a colônia, construindo a primeira célula de oviposição e cuidando da prole no início da formação. Ao surgirem as primeiras operárias, inicia-se a divisão do trabalho para estabilização da colônia. Após este período a rainha é responsável apenas pela função reprodutiva, então as operárias são responsáveis pelos demais trabalhos na colônia, como por exemplo o forrageamento.

Com o tempo a população do ninho vai crescendo e a rainha começa a perder a dominância. Surgem operárias com ovários desenvolvidos e constroem suas células de oviposição. A rainha nesta fase se torna agressiva para manter a dominância, e destrói as posturas realizadas pelas operárias, até chegar em um momento em que a rainha não consegue mais impedir o desenvolvimento dos ovos. Nesta fase inicia a produção sexuada, de machos (ovos postos pela rainha e operárias) e rainhas (ovos postos pela rainha).

Os machos da colônia têm a função exclusiva de reprodução. Após copularem eles morrem, em aproximadamente quatro semanas (ALFORD, 1975; PRYS-JONES; CORBET, 1991). Os ninhos de *Bombus* possuem abelhas de grande tamanho e população nidal pequena. Há estudos que citam populações de 400 até 2000 indivíduos (IHERING, 1930; LAROCA, 1976).

2.3 *Bombus morio*

Bombus morio (SWEDERUS, 1787), é uma espécie nativa, tem como características morfológicas: coloração preta e pilosidade (MOURE; SAKAGAMI, 1962), não apresenta diferenças morfológicas entre rainhas e operárias (MICHENER, 2007), apenas variação em

relação ao tamanho do corpo.

Essa espécie está amplamente distribuída, tendo ocorrência registrada desde o noroeste da América do Sul até sudeste do Brasil, Uruguai e norte da Argentina (MOURE; SAKAGAMI, 1962; ABRAHAMOVICH et al., 2004), devido a sua tolerância a diferentes climas e altitudes. No Brasil, há registros no Sul e Sudeste do Brasil, estando presente desde o estado do Rio Grande do Sul até sul da Bahia, Goiás e Mato Grosso (MOURE; MELO, 2008). É encontrada com maior frequência em ambientes como floresta tropical e vegetação litorânea (MOURE; SAKAGAMI, 1962). *B. morio* assim como sua espécie simpátrica, *B. pauloensis* tem preferência por regiões de altitude elevada (FRANÇOSO et al., 2015), sendo esta última mais tolerante.

2.4 Polinização por *Bombus* sp.

O reconhecimento de mamangavas/mamangabas como habilidosos polinizadores começou na Bélgica, na década de 60, com *Bombus terrestris* L. (Apidae), sendo utilizada para polinização em estufas de tomates, houve incremento na produção e na qualidade dos frutos (IMPERATRIZ-FONSECA, 2004). Logo após, empresas europeias na década de 1980, investiram na criação e multiplicação de *B. terrestris* em larga escala em laboratórios para a venda de polinizadores altamente eficientes para culturas agrícolas em ambientes protegidos, pois se adaptam melhores a estufas comparadas a abelha africanizada (VAN DEN EIJNDE et al., 1991; FREE, 1970).

Apenas cinco espécies (quatro pertencentes ao subgênero *Bombus*) estão sendo utilizadas como polinizadores produzidos comercialmente em todo o mundo (VELTHUIS; VAN DOORN, 2006). Entre elas estão as espécies *B. terrestris*, *B. impatiens* e *B. canariensis*. Elas são criadas e vendidas por empresas europeias e americanas para a polinização de culturas como por exemplo: tomate, melão, pimentão, alfafa e morango (VELTHUIS; VAN DOORN, 2006; IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012; FREE, 1970; KEVAN et al., 1991; HEINRICH, 2000).

No Brasil não é permitido a compra destas espécies, por não se tratarem de espécies nativas, e a introdução de uma nova espécie em um ambiente pode trazer severos danos, como competição por recursos florais, introdução de patógenos e inimigos naturais podendo levar o desaparecimento da espécie nativa (GOULSON, 2003).

São polinizadores habilidosos de uma grande diversidade de plantas, incluindo culturas agrícolas e vegetação nativa (MOURE; SAKAGAMI, 1962; PROUVEAU, 1984; ABRAHAMOVICH; DÍAZ, 2001). Devido ao seu grande tamanho e modo de trabalhar comparado a outras abelhas, tem a capacidade de transportar maiores quantidades de grãos de pólen, permitindo visitar um maior número de plantas antes de voltar a colônia e têm maior

contato com os estames e pistilos das flores (BUCHMANN, 1983; GOULSON, 2003; VELTHUIS; VAN DOORN, 2006; HEINRICH, 2000; KOPPERT, 2007).

Apresentam uma polinização por vibração, que tem como característica vibrar as anteras para a liberação do pólen (HEINRICH, 2000). São abelhas rápidas, visitando o dobro de plantas comparado a *Apis mellifera* por minuto. O atual declínio destas abelhas pode trazer sérios prejuízos a polinização e consequentemente a economia (WILLIAMS, 1982, 1986; CARVELL, 2002; BIESMEIJER et al., 2006; GOULSON, 2006; FITZPATRICK et al., 2007). A atividade de forrageamento de *Bombus* é pouco dependente de fatores climáticos, podendo visitar as flores nas mais adversas condições como: chuvas, vento, baixa luminosidade e baixas temperaturas (MOURE; SAKAGAMI 1962; HEINRICH 1979; KOPPERT, 2007).

Os benefícios para os produtores incluem custos reduzidos por não terem que polinizar mecanicamente ou manualmente, facilidade no monitoramento da atividade dos *Bombus*, aumento do rendimento e qualidade de frutos (VELTHUIS; VAN DOORN, 2006).

2.5 Declínio da população de polinizadores

O declínio dos polinizadores no mundo é um assunto que tem gerado diversos estudos, além da *Apis mellifera* as abelhas do gênero *Bombus* também estão em declínio, tanto na Europa como na América do Norte, principalmente como resultado da intensificação da agricultura e da perda de habitat associada (GOULSON et al., 2008; GRIXTI et al., 2009). Entre estes fatores estão à fragmentação de ecossistemas para urbanização ou uso agrícola, o desmatamento, a introdução de espécies exóticas, o uso de pesticidas, entre outros (FREITAS et al., 2009; MARTINS et al., 2013).

A destruição de habitats naturais como resultado da atividade agrícola e urbanização é uma séria ameaça sobrevivência e adaptação de algumas espécies. Anteriormente amplamente distribuídas, algumas espécies tornam-se restritas a fragmentos remanescentes de habitat natural, resultando em populações pequenas e isoladas. Se não ocorrer migração, essas populações podem perder a diversidade genética através de estrangulamentos e desvios (KELLER; WALLER, 2002). A manutenção da diversidade genética é importante para a sobrevivência e manutenção de muitas populações e espécies. A perda de diversidade pode reduzir a capacidade de uma população se adaptar as mudanças ambientais (FRANKHAM et al., 2002; HANSSON; WESTERBERG, 2002; KELLER; WALLER, 2002; REED; FRANKHAM, 2003).

Por serem considerados abelhas extremamente agressivas, leva a destruição dos ninhos por humanos, diminuindo a sua população (GARÓFALO, 2005). Outro fator que tem sido

estudado é a alta incidência de doenças e parasitas, como *Nosema bombi* (GOULSON et al., 2005; MEEUS et al., 2011; POTTS et al., 2010; OTTI; SCHMID-HEMPEL, 2007,2008).

No Chile e na Argentina, as populações de *B. dahlbomii* (GUÉRIN-MENEVILLE, 1835) mostraram um declínio em consequência da introdução das espécies exóticas, *B. terrestris* (LINNAEUS, 1758) e *B. ruderatus* (FABRICIUS, 1775), junto com os parasitas (ARBETMAN et al., 2013; SCHMID-HEMPEL et al., 2014).

A diminuição do tamanho da população e da diversidade genética, são importantes aspectos para a conservação, pois leva ao aumento da chance do risco de extinção (WHITEHORN et al., 2011).

2.6 Estrutura genética e diversidade de populações

Até meados da década de 60, os estudos populacionais eram baseados em características fenotípicas. Após, começaram a surgir estudos onde eram usados marcadores moleculares para o estudo de abelhas. Estudos moleculares tornaram-se importantes para sistemática e conservação (HILLIS et al., 1996), fornecendo informações que vão desde a herança diferencial dos genes dentro do mesmo indivíduo (AVISE, 2004), até relações em nível de espécie e biologia de população (HOLLAND; HADFIELD, 2002).

O estudo da estrutura genética de populações refere-se à distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações. Esta possibilita entender a história de uma população, elementos para estudos de caracterização de fluxo gênico entre populações (MEDINA et al., 2012) e deriva genética e da biologia do inseto (RODERICK; NAVAJAS, 2003). Conhecer a variabilidade genética que ocorre entre populações naturais é relevante para planejar programas de conservação (PERES; RENESTO, 2005) e pode fornecer noções sobre a estrutura de uma população o qual seria difícil de acessar monitorando insetos individualmente. As espécies *B. impatiens* e *B. terrestris*, que são extremamente importantes por sua atividade polinizadora no mundo, já tiveram seu genoma completo sequenciado.

Bombus é um grupo homogêneo no aspecto morfológico, que é um obstáculo à identificação e diferenciação correta das espécies (MOURE; SAKAGAMI, 1962; WILLIAMS, 1998; MICHENER, 1990; MICHENER, 2007; MURRAY, 2008) sendo importante o uso de ferramentas moleculares para sua correta identificação. Portanto, o baixo número de espécies presentes no Brasil, pode ser devido a identificação errônea da espécie.

Diferentes marcadores moleculares são usados para caracterizar a estrutura genética de populações, podendo diferenciar indivíduos e são herdadas geneticamente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). São amplamente utilizados para gerar conhecimento sobre

parâmetros demográficos, tais como tamanhos populacionais e taxas de migração (por exemplo, ALLENDORF; LUIKART, 2007), e tem colaborado de forma importante para a definição do status taxonômico e populacional de diversas espécies (FERGUSON, 1980; TORGGGLER et al., 1995). Os principais marcadores usados para o estudo de insetos sociais são: microssatélites e mtDNA (DNA mitocondrial) por permitirem o estudo da variabilidade em nível de DNA (LOWE et al., 2004).

Para investigar a genética das populações de uma espécie é necessário o uso de marcadores adequados. O mtDNA é usado para este estudo, pois é pequeno, compacto e altamente conservado, possui alta taxa de mutação comparado ao DNA nuclear, é fácil de manipular, apresenta ausência de recombinação e através deste marcador é possível estimar o número de linhagens maternas que deram origem a uma determinada população (BROWN et al., 1982; FREELAND et al., 2011; GALTIER et al., 2009; AVISE et al., 1987; ARIAS et al., 2003).

Dessa forma, mtDNA é considerado uma importante ferramenta no estudo de diversidade genética dentro e entre populações de insetos, permitindo realizar inferências sobre fluxo gênico, identificação da origem da espécie, filogeografia, determinação de estrutura das populações e demais relações evolucionárias (SIMON et al., 1994; FREELAND et al., 2011). O gene Citocromo C Oxidase I, é utilizado como marcador universal para o código de barras genético (DNA Barcoding) por se mostrar ser um marcador espécie-específico (HEBERT; CYWINSKA; BALL, 2003) pois suas proteínas possuem domínios funcionais altamente conservados e regiões variáveis (SARASTE, 1990). Também é usado com muito sucesso para a identificação de vários insetos, incluindo do gênero *Bombus* (MURRAY et al., 2008).

As abelhas são insetos eussociais, sendo um fator que pode, teoricamente, diminuir sua variabilidade genética, pois apenas poucas fêmeas (rainhas) e machos são reprodutores (PAMILO et al., 1978), o que pode comprometer a viabilidade da população ao longo do tempo. Em espécies com populações pequenas, com autofecundação e limitada taxa de dispersão, se espera uma baixa variabilidade dentro da população e alta entre populações (LOVELES; HAMRICK, 1984). Vários processos são responsáveis por causar a variabilidade genética, como por exemplo: mutação, migração, recombinação e seleção (TAJIMA et al., 1993). Mas uma das principais é a mutação, pois é responsável pela mudança na frequência nucleotídica e alteração na frequência alélica.

Técnicas moleculares provaram ser úteis em estudo de populações e para entender até que ponto a fragmentação do habitat reduz as chances de persistência de populações de polinizadores residentes (por exemplo, DARVILL et al., 2006, 2010; GOULSON et al., 2011).

Quanto maior a diversidade genética da população, mais provável que os indivíduos resistam a alguns patógenos e apresentem taxas de infecções mais baixas (HAMILTON, 1980; EBERT; HAMILTON, 1996; STRASSMANN, 2001; O'DONNELL; BESHES, 2004). A baixa variabilidade genética é considerada prejudicial as espécies, pois está relacionada a baixa capacidade de adaptação as mudanças atuais e futuras no ambiente, e ao aumento da probabilidade de extinção (FRANKHAM, 2005; ZAYED, 2009; HABEL et al., 2014). Estudos conduzidos na Europa e na América do Norte investigaram a variabilidade genética em populações de espécies de abelhas e observaram uma menor diversidade genética nas populações das espécies que estavam em declínio (DARVILL et al., 2006; ELLIS et al., 2006; GOULSON et al., 2008, CHARMAN et al., 2010, CAMERON et al., 2011).

Estudos demonstraram que a baixa variabilidade genética diminui a imunocompetência, que é capacidade de o organismo produzir uma resposta imunitária específica a uma estimulação antigénica e reagir a microorganismos, em *Bombus muscorum* (WHITEHORN et al., 2011) e o aumento da ocorrência de infecções em *Apis* e *Bombus* (BAER; SCHMID-HEMPEL, 2001; TARPY, 2003). Outro estudo realizado por Cameron et al. (2011) mostrou que algumas espécies de abelhas que apresentam uma baixa variabilidade genética foram correlacionadas com uma alta taxa de infecções por *N. bombi*. Já um estudo conduzido por Huth-Schwarz et al. (2012) concluiu que a variabilidade genética foi negativamente correlacionada com os níveis de infecção tanto a nível de individuo e colônia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem de campo e identificação de *Bombus* no Rio Grande do Sul

Foram realizadas coletas em diversos municípios no estado do Rio Grande do Sul (Tabela 1). As cidades foram selecionadas por já terem registro do gênero *Bombus* ou por sua localização geográfica. As coletas foram realizadas no período da primavera e verão (2017 e 2018), em diferentes períodos do dia, das 8h da manhã até as 17h da tarde, com auxílio de rede entomológica (feita em alumínio resistente, cabo retrátil com 115 cm de comprimento quando aberto, cesta com 90 cm de comprimento e 40 cm de largura) e quando necessário, utilizou-se cabos adaptadores para facilitar a coleta de *Bombus* em árvores de grande porte. As coletas foram realizadas em áreas urbanas e agrícolas. Imediatamente após a coleta os espécimes foram transferidos para tubos de 100 mL contendo álcool 96% e transportados para o Laboratório de Manejo Integrado de Pragas da Universidade Federal de Santa Maria (LabMIP - UFSM) e

armazenados em temperatura de -20°C para posterior identificação e extração do DNA genômico.

Os espécimes de *Bombus* coletados foram primeiramente identificados por meio da chave de classificação proposta por Moure e Sakagami (1962) e adaptada por Santos Júnior et al. (2015), e utilizando descrições morfológicas fornecidas por Silveira et al. (2002) e França et al. (2016). As espécies identificadas foram confirmadas através de espécimes catalogados na Coleção de Abelhas do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MCT), e rotuladas com etiquetas contendo informações relativas à localização, data, hora, método de coleta e hospedeiro floral.

3.2 Extração de mtDNA

A extração do DNA genômico foi realizada individualmente usando o segundo par de pernas dos espécimes de *B. morio*, usando o kit QIAgen DNEasy Tissue Extraction (Qiagen, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante.

Um total de 51 espécimes foram usados para a caracterização molecular. Antes da extração de DNA os espécimes foram lavados 3 vezes com etanol 99.9% para a retirada de resíduos. As pernas de cada inseto foram removidas e maceradas individualmente em um tubo de 1,5ml contendo 180 μL de Buffer ATL e 20 μL de proteinase K. Após, as amostras foram incubadas por 24h a 56°C e o DNA genômico foi eluído em 35 μL em Buffer AE. Após, foram centrifugados por 1 minuto a 8.000 RPM e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 ml. Em seguida, 200 μL da solução tampão AL + 200 μL de etanol 100% foi adicionado e a solução foi transferida para uma coluna, sendo centrifugada por 1 minuto a 8.000 RPM. O líquido que ultrapassou a membrana da coluna foi descartado e o tubo trocado por um de 2 mL, onde foi adicionado 500 μL da solução AW1 e centrifugado por 1 minuto a 8.000 RPM. O tubo de 2 ml foi descartado e a coluna spin é inserida em um novo tubo de 2 mL, onde é adicionado 500 μL de AW2, centrifugados por 3 minutos a 14.000 RPM, e deixando secando em temperatura ambiente por 30 minutos. Após isso foi adicionado 50 μL da solução tampão de eluição no centro da coluna spin e incubado por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugado por 1 minuto a 8.000 RPM.

3.3 Amplificação do COI

O fragmento mitocondrial do gene COI (Citocromo C Oxidase subunidade I) foi amplificado pela reação em cadeia de polimerase (PCR). Foram testados o uso de dois primers para amplificação da região do COI: O primer universal descrito por Folmer et al., (1994), LCO1490

(5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAA-AAATCA-3') e os primers BarbeeF (CAACAAATCATAAAAATATTGG) (FRANÇOSO et al, 2013) e MtD9 (CCCGGTAAAATTTAAAATATAAACTTC) (SIMON et al., 1994), descrito para o uso em abelhas corbiculadas (FRANÇOSO et al, 2013). Cada amostra de PCR contém 0.25µL AccuTaq™ LA DNA Polimerase (5U/µL), 0,12 µL de AccuTaq LA 10 Buffer, 0,4 µL dNTP mixture (10mM), 0,8 µL de cada primer (10pM), 2 µL de DNA template e 13,88 µL de água destilada, com um volume final de 18 µL.

As reações de PCR foram realizadas com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 34 ciclos de desnaturação 94°C por 30 segundos, anelamento a 48°C por 30 segundos, e polimerização 72°C por 1.5min, com extensão final por 72°C por 5min. Para os primers descritos por Françaoso et al., 2013: Desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação 94°C por 1 min, anelamento a 42°C por 1,20min, e polimerização 64°C por 2min, com extensão final por 64°C por 10min.

A análise da qualidade dos produtos da amplificação e extração de DNA foram submetidos a eletroforese ao gel de agarose 1.0%, pré-estabelecido com Nancy-520 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), usando o ladder loading dye e sua visualização em fotodocumentador e a pureza em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000-2000c). As amostras foram sequenciadas pela empresa ACTgene.

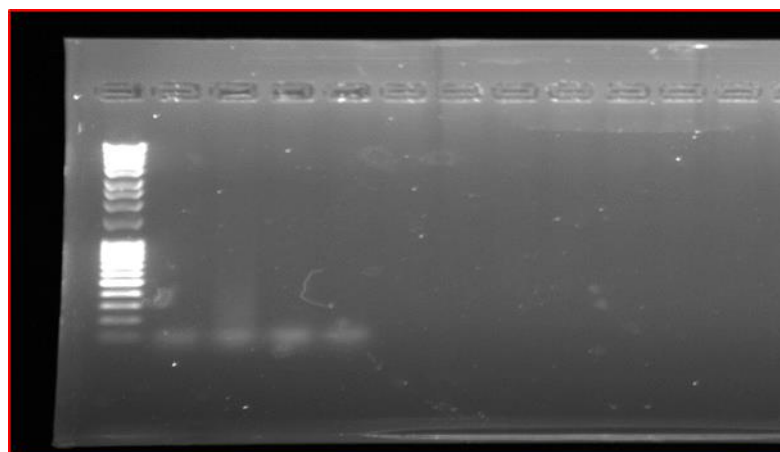


Figura 1. Gel de agarose para confirmação de PCR.

Tabela 1. Resultado de PCR em fotodocumentador e a pureza em espectrofotômetro.

Amostra	Concentração (ng/ μ L)	260/280	260/230
4	417,39	1,78	1,74
5	365,48	1,8	1,74
6	391,57	1,8	1,74
8	371,8	1,8	1,65
9	889,72	1,81	1,68
11	670,7	1,81	1,64
12	395,9	1,8	1,69
13	434	1,79	1,77
14	438,65	1,78	1,76
16	350,3	1,82	1,77
18	709,75	1,85	1,7
19	783,66	1,86	1,73
24	334,8	1,77	1,44
25	232,4	1,76	1,39
27	234,3	1,77	1,41
28	227,9	1,77	1,37
29	237,5	1,75	1,38
30	224,9	1,78	1,42
31	231,2	1,74	1,33
32	233,5	1,78	1,35
33	238	1,78	1,38
34	190,9	1,74	1,3
35	195,6	1,68	1,16
36	226,1	1,65	1,05
37	187,7	1,73	1,21
38	195,3	1,73	1,26
39	207,7	1,77	1,13
40	192,5	1,72	1,21
41	197,8	1,74	1,28
50	738,3	1,82	1,64

3.4 Obtenção e análise da estrutura genética

Os softwares Pregap e Gap4 (STADEN et al., 1998) foram utilizados para visualizar, editar e analisar as sequências de DNA de cada espécime e gerar a sequência consensus. Para a identificação dos espécimes coletados, as sequências foram alinhadas pelo software CLC sequence viewer versão 7. As sequências parciais de mtDNA foram checadas para a presença de *stop codons* prematuros usando o software Geneious R8 (Biomatters Ltd., New Zealand) e por Blastp. Sequências que se diferem por um ou mais nucleotídeos foram consideradas haplótipos diferentes, enquanto sequências com a presença dos mesmos SNPs, na mesma

posição foram consideradas o mesmo haplótipo. As sequências obtidas da região do COI foram depositadas no GenBank (NCBI).

O número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica ($Hd \pm SE$), e diversidade nucleotídica ($\pi \pm SE$) foram obtidas para cada população usando o programa DnaSP v. 5.10.01 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Os valores do parâmetro diversidade haplotípica podem variar entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1, maior a diversidade entre os haplótipos/populações analisados. Diversidade haplotípica (Hd), que estima a probabilidade de amostrarmos dois haplótipos do total amostral e estes serem diferentes; diversidade nucleotídica (π), que representa o número médio de diferenças entre duas sequências (por sítio) retiradas ao acaso da amostra total e, por fim, sítios polimórficos (S), índice que indica quantos sítios são variáveis em relação ao total do fragmento, demonstrando quanto aquele fragmento/gene é variável.

A composição de nucleotídeos foi calculada usando MEGA v.7.0.21 (KUMAR et al., 2016), e a análise de estatística parsimonial foram conduzidas usando TCS (CLEMENT et al., 2000). Para estimar as relações genealógicas entre os haplótipos mitocondriais, foi construída uma rede de haplótipos utilizando o programa PopART (LEIGH; BRYANT, 2015), gerado a partir do método median-joining (BANDELT et al., 1999). O tamanho de cada agrupamento refere-se à frequência haplotípica e o preenchimento, às diferentes localidades.

O índice F_{st} e testes de neutralidade (Tajima's D e Fu's FS) foram realizados com o Arlequin 3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), e valores de significância foram estimados com 10.000 permutações. Os valores de F_{ST} calculados foram usados para estimar o número de fêmeas migrantes por geração, calculado por $(1-F_{ST}/2F_{ST})$ (WRIGHT, 1943). O índice de fixação (F) além de ser usado para estimar a migração, uniformiza a redução na heterozigotidade esperada com o cruzamento aleatório em diferentes níveis populacionais, o índice F_{st} compara a diferenciação entre populações em relação a variação intrapopulacional (WRIGHT, 1950), a distância genética pode variar entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1 mais distante geneticamente são as populações/ haplótipos analisadas.

Os testes de neutralidade baseados no polimorfismo das sequências são usados como indicativos do *status* da população. O teste D de Tajima é baseado na diferença entre o número de sítios segregantes (S) ou número de diferenças nucleotídicas entre pares de sequências (TAJIMA, 1989), este teste baseia-se na distribuição das frequências de mutação e na distribuição de haplótipos, distinguindo as diferenças entre as sequências de DNA evoluindo aleatoriamente e daquelas que evoluem de uma forma não aleatória. O teste de Fs de Fu compara o número observado de alelos com o número de alelos esperados se a população se

mantivesse constante (FU, 1997). Valores negativos e significativos podem ser atribuídos a seleção purificadora ou a expansão populacional recente, e os valores positivos a seleção balanceadora ou contração populacional (TAJIMA, 1989). O valor de N_m é interpretado com uma média por geração estimada do número absoluto de migrantes trocados entre populações. Valores de N_m menores que 1 são indicativos de que o efeito diversificador da deriva genética se sobrepõe a influência homogeneizadores do fluxo gênico (AVISE, 2000).

Para a construção da rede de haplótipos com espécimes da América do Sul, foi utilizado o gene parcial mtDNA comparando as sequências deste estudo com as sequências depositadas no genBank, foi utilizado o programa PopART, para verificar o nível de compartilhamento e a frequência de distribuição dos haplótipos entre as populações da América do Sul, a construção da rede de network com um total de 121 sequências, para que fosse possível a comparação das sequências deste estudo com as demais, elas precisaram ser cortadas e alinhadas com 383pb, pois as demais sequências depositadas tem este tamanho de pares de base.

4 RESULTADOS

4.1 Amostragem e coleta de *Bombus morio* no Rio Grande do Sul

Foram coletados 51 espécimes de *B. morio* em um total de 15 municípios do estado do Rio Grande do Sul (Figura 2, Tabela 2). As coletas em campo permitiram uma reavaliação da distribuição e situação de ocorrência das populações de *B. morio* no estado. Foram encontrados e catalogados *B. morio* em 15 municípios do estado, no qual 12 localidades ainda não haviam registro da presença da espécie (Figura 2).

De acordo com o levantamento realizado em registros anteriores em coleções de museus e trabalhos publicados (FRANÇOSO et al., 2015; CORTOPASSI-LAURINO et al., 2003; MUSEU DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DA PUC/RS), as coletas se concentraram na região metropolitana de Porto Alegre e na Serra Gaúcha. Portanto, a amostragem foi importante para comprovar que a espécie tem uma distribuição por todo o Rio Grande do Sul. A espécie foi coletada visitando recursos florais em áreas de vegetação nativa e plantas cultivadas, demonstrando ser um polinizador generalista e importante para o ecossistema.

Tabela 2. Número da amostra dos indivíduos sequenciados com sucesso, local, data da coleta, plantas onde os espécimes de *Bombus morio* foram coletados no Rio Grande do Sul.

Amostra	Local	Data coleta	Planta coletada	Latitude	Longitude
4	Três arroios	23/01/2018	<i>Phaseolus vulgaris</i>	27°37'S	52°13'W
5	Lajeado	26/01/2018	<i>Hibiscus syriacus</i>	29°45'S	52°02'W
8	Porto alegre	07/04/2018	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	30°01'S	51°12'W
9	Porto alegre	07/04/2018	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	30°01'S	51°12'W
11	Frederico Westphalen	04/01/2018	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	27°39'S	53°43'W
12	Frederico Westphalen	04/01/2018	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	27°39'S	53°43'W
13	Pelotas	03/02/2018	<i>Tibouchina granulosa</i>	31°75'S	52°31'W
14	Santa Maria	06/02/2018	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	29°71'S	53°71'W
16	Dom Pedrito	22/02/2018	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	30°97'S	54°67'W
18	Agudo	07/02/2018	<i>Lagerstroemia indica</i>	29°72'S	53°22'W
19	Agudo	07/02/2018	<i>Lagerstroemia indica</i>	29°72'S	53°22'W
23	Santiago	01/03/2018	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	29°20'S	54°85'W
24	Santiago	01/03/2018	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	29°20'S	54°85'W
25	Santa Cruz do sul	07/02/2018	<i>Phaseolus vulgaris</i>	29°73'S	52°42'W
27	Lajeado	26/01/2018	<i>Hibiscus syriacus</i>	29°45'S	52°02'W
28	Lajeado	26/01/2018	<i>Hibiscus syriacus</i>	29°45'S	52°02'W
29	Ijuí	09/04/2018	<i>Dahlia</i> sp.	28°23'S	53°58'W
30	Bagé	21/02/2018	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	31°28'S	54°12'W
31	Bagé	21/02/2018	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	31°28'S	54°12'W
32	Santiago	01/03/2018	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	29°20'S	54°85'W
33	Santana do livramento	22/02/2018	<i>Lagerstroemia indica</i>	30°89'S	55°53'W
34	Santana do livramento	22/02/2018	<i>Lagerstroemia indica</i>	30°89'S	55°53'W
35	Pelotas	03/02/2018	<i>Tibouchina granulosa</i>	31°75'S	52°31'W
36	Lajeado	26/01/2018	<i>Hibiscus syriacus</i>	29°45'S	52°02'W
37	Santa Maria	06/02/2018	<i>Caesalpinia pluviosa</i>	29°71'S	53°71'W
38	Lavras do Sul	21/02/2018	<i>Lagerstroemia indica</i>	30°81'S	53°89'W
39	Lavras do Sul	21/02/2018	<i>Lagerstroemia indica</i>	30°81'S	53°89'W
40	Lavras do Sul	21/02/2018	<i>Lagerstroemia indica</i>	30°81'S	53°89'W
41	Santa Cruz do Sul	07/02/2018	<i>Lagerstroemia indica</i>	29°73'S	52°42'W
48	Caçapava do sul	23/10/2017	<i>Jacaranda mimosifolia</i>	30°51'S	53°48'W
50	Ijuí	09/04/2018	<i>Dahlia</i> sp.	28°23'S	53°58'W

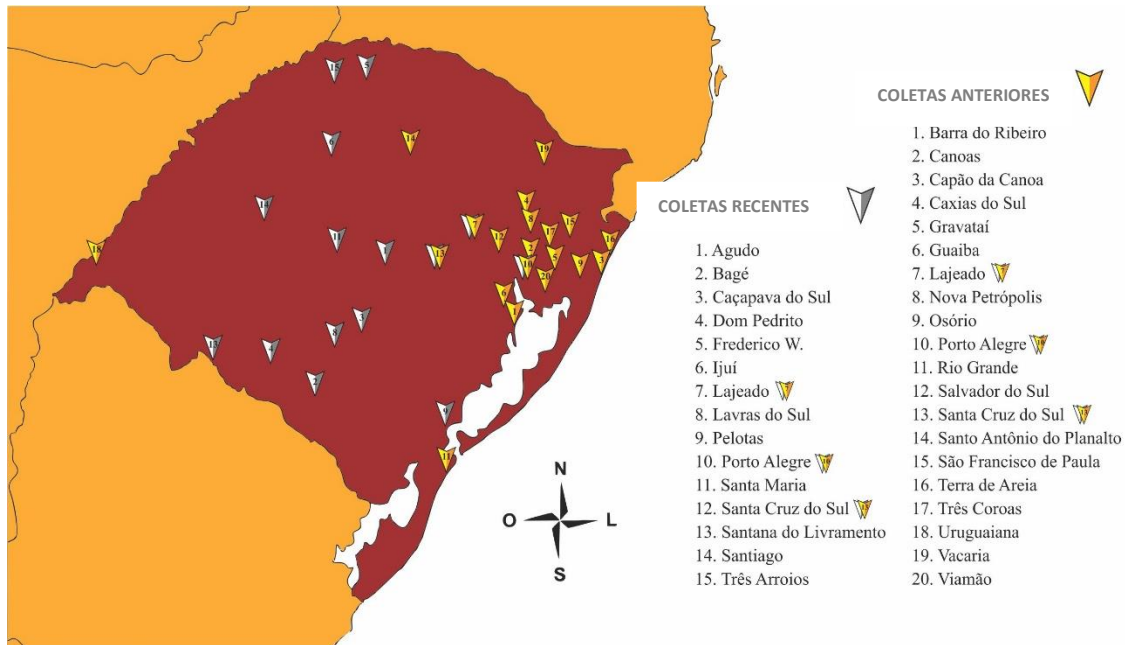


Figura 2. Mapa de coletas recentes (realizadas para este trabalho) e coletas anteriores (realizadas para trabalhos anteriores) de *Bombus morio* no estado do Rio Grande do Sul.

4.2. Análise da estrutura genética

Foi amplificada a região parcial do COI utilizando os primers desenvolvidos especificamente para abelhas corbiculadas (BarbeeF e mtD9 - FRANÇO SO et al., 2013), com sucesso em todas amostras de *B. morio*. Os primers universais (LCO1490 e HCO2198) não amplificaram o fragmento desejado. A partir das 51 amostras foram obtidas 31 sequências com resultados satisfatórios, sendo descartadas 20 sequências por erros de sequenciamento.

Depois de editadas, foram obtidas 31 sequências com fragmentos de 619pb, nos quais 25 sítios polimórficos (S) foram observados, em 15 populações de *B. morio* coletadas no estado do Rio Grande do Sul. A composição nucleotídica foi de adenina (A) 32,4%, citosina (C) 13,5%, guanina (G) 10,3% e timina (T) de 43,7%.

O número de indivíduos (N), número de haplótipos (h), bem como a diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica para cada população está retratada na Tabela 2. Um total de nove haplótipos (designados de BM01, BM02, BM19, BM21, BM22, BM23, BM25, BM26 e BM27) foram obtidos da análise das 31 sequências. A diversidade haplotípica (Hd) é considerada alta, com valor médio de 0,77. Houve grande variação neste índice, onde a menor diversidade haplotípica foi de 0,000 referente às localidades de Frederico Westphalen, Pelotas, Santiago e Lavras do Sul onde apenas um haplótipo foi observado. E a maior foi de 1,000 referente a sete populações no estado. O índice de diversidade nucleotídica (π) correspondeu a média de 0,00454. Quando as populações foram analisadas separadamente, a diversidade

nucleotídica variou de 0,000 em Frederico Westphalen, Pelotas, Santiago e Lavras do Sul 0,01939 em Agudo, essa diversidade é alta.

Tabela 3. Populações, número de indivíduos, número de haplótipos, diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica do gene parcial mtDNA de *Bombus morio* no estado do Rio Grande do Sul.

Populações	Nº		Diversidade haplotípica	Diversidade nucleotídica
	Indivíduos	Nº de haplótipos		
Porto Alegre(POA)	2	2 (BM21, BM02)	1,000 ± 0,5	0,00485 ± 0,00242
Frederico Westphalen(FW)	2	1(BM01)	0,000	0,000
Santa Maria(SM)	2	2 (BM01, BM02)	1,000 ± 0,5	0,00323 ± 0,00162
Pelotas(PEL)	2	1 (BM25)	0,000	0,000
Agudo(AG)	2	2 (BM19, BM22)	1,000 ± 0,5	0,01939 ± 0,00969
Santiago(ST)	3	1(BM01)	0,000	0,000
Santa Cruz do Sul(SCS)	2	2 (BM01, BM26)	1,000 ± 0,5	0,00646 ± 0,00323
Lajeado(LAJ)	4	4 (BM19, BM26, BM02, BM23)	1,000 ± 0,177	0,01158 ± 0,02306
Ijuí(IJ)	2	2 (BM01, BM19)	1,000 ± 0,5	0,00808 ± 0,00404
Bagé(BG)	2	2 (BM01, BM25)	1,000 ± 0,5	0,00162 ± 0,00081
Santana do Livramento(SL)	2	2 (BM01, BM02)	1,000 ± 0,5	0,00323 ± 0,00162
Lavras do Sul(LS)	3	1 (BM01)	0,000	0,000
Três Arroios(TA)	1	1 (BM01)	-	-
Caçapava do Sul(CS)	1	1(BM25)	-	-
Dom Pedrito(DP)	1	1 (BM27)	-	-
Total	31	9	0,770 ± 0,067	0,00454 ± 0,00148

Foram detectados 594 sítios conservados e vinte e cinco sítios variáveis. Dos nove haplótipos encontrados nas populações de *B. morio* no Rio Grande do Sul, verifica-se que eles se diferenciam por 1-12 substituições nas bases nitrogenadas (Tabela 4).

Em genética transição é uma mutação que provoca a transformação de uma purina, Adenina (A) ou Guanina (G) em outra purina (A ↔ G), ou uma pirimidina, Citosina (C) ou Timina (T), em outra pirimidina (C ↔ T), transversão é um processo químico em que uma purina sofre mutação e se torna uma pirimidina, ou vice-versa. Uma transição de timina para citocina no BM21, posição 243; no BM19, uma transversão de guanina para timina, na posição 248 e uma transição de adenina para guanina, posição 530; uma

transição de guanina para adenina no BM26, posição 248; uma transversão de adenina para timina no BM02, posição 113 e uma transição de guanina para adenina no BM02, posição 248; uma transição citocina para timina no BM25, posição 29. Para o BM22, duas transversões de adenina para citocina nas posições 31 e 404, uma transversão de adenina para timina, posição 77, cinco transições de adenina para guanina nas posições 78, 264, 461, 542 e 578, uma transversão de timina para adenina na posição 235, uma transversão de citocina para adenina posição 475 e uma transversão de timina para guanina na posição 305.

Para o BM27, uma transição de timina para citocina e uma de citocina para timina, nas posições 32 e 213, respectivamente. O número de transições foi superior ao número de transversões, sendo mais freqüente a substituição envolvendo as bases púricas A e G. Para o BM23, uma transversão de citocina para adenina na posição 31, quatro transições de citocina para timina nas posições 68, 209, 213 e 297, uma transição de guanina para adenina na posição 75, cinco transversões de adenina para timina nas posições 77, 113, 323, 386 e 404.

Quanto à frequência haplotípica para o estado do Rio Grande do Sul, verifica-se que o BM01 é o mais frequente, ocorrendo em nove populações, com distribuição ao longo de todo o estado, seguido do BM02 e BM25, presente em quatro populações. Os haplótipos BM21, BM22, BM26 e BM27 foram exclusivos e amostrados apenas nas populações de Porto Alegre, Agudo, Lajeado e Dom Pedrito, respectivamente. Nas populações de Frederico Westphalen, Santiago, Lavras do Sul foram encontrado apenas o BM01 e Pelotas apenas o BM25, não apresentaram diversidade de haplótipos, em contraposição à Lajeado, com quatro haplótipos: BM19, BM26, BM02 e BM23 (Figura 3).

Os haplótipos BM21, BM26 e BM25 apresentam-se distantes do BM01 por um único passo mutacional e o BM19, com dois passos. Os haplótipos BM22 e BM23 são os mais distantes do BM01 (Figura 3).

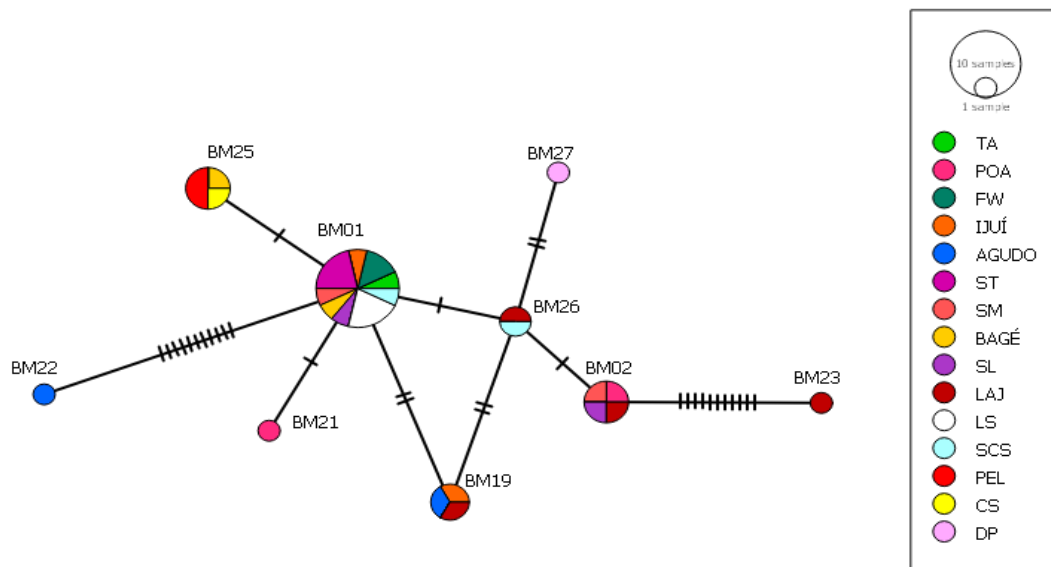


Figura 3. Network de haplótipos de *Bombus morio* no estado do Rio Grande do Sul. As áreas circulares são proporcionais a frequência de cada haplótipo e os traços representam o número se diferença entre cada haplótipo. TA, Três arroios; POA, Porto Alegre; FW, Frederico Westphalen; PEL, Pelotas; SM, Santa Maria; ST, Santiago; SCS, Santa Cruz Do Sul; LAJ, Lajeado; SL, Santana do Livramento; LS, Lavras do Sul; CS, Caçapava do Sul; DP, Dom Pedrito.

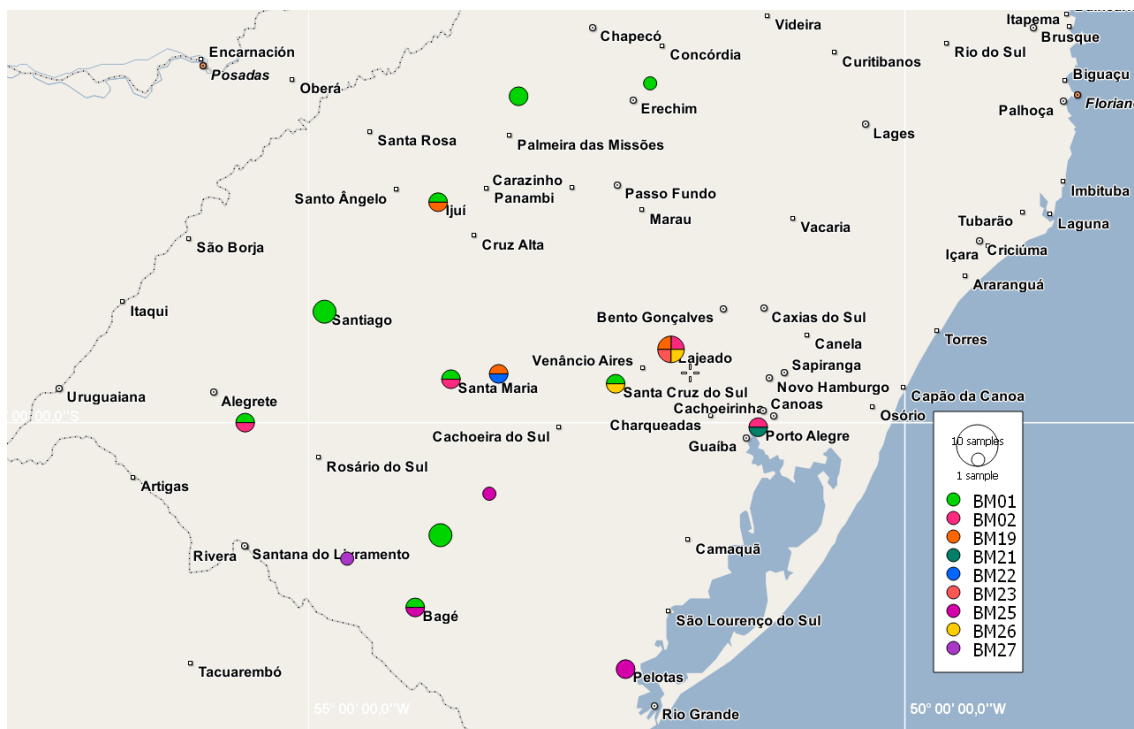


Figura 4. Distribuição de haplótipos de cada população de *Bombus morio* no estado do Rio Grande do Sul. O tamanho do círculo é relativo ao número de indivíduos sequenciados em cada local.

A distância genética (F_{st}) e as taxas de migração por geração (Nm) entre pares de populações são fornecidas na Tabela 5. Analisando-se os valores de F_{st} (estimativas de diferenciação genética) calculada aos pares as populações de TA-PEL, TA-CS, TA-DP, FW-PEL, FW-CS, FW-DP, PEL-ST, PEL-LS, PEL-DP, ST-CS, ST-DP, LS-CS, LS-DP e CS-DP são os mais distantes entre si. As populações de Frederico Westphalen estão estreitamente relacionadas, não havendo diferenciação com as populações de SM, Agudo, ST, SCS, Ijuí, Bagé, SL e LS (Tabela 5). Porém, observando-se os valores de p , verificamos que não é possível diferenciar as populações entre si, não havendo correlações significativas entre as distâncias genéticas e geográficas entre as populações estudadas neste estudo. As análises das populações aos pares indicam ausência da estruturação populacional para valores de $F_{st} \leq 0$.

O teste de neutralidade D de Tajima, foi negativo apenas para a população da cidade de Lajeado, com um valor de $-0,623$, porém não foi significativo. Para as outras populações o teste apresentou valor $0,000$ e não significativo (Tabela 6). O teste de F_s de F_u apresentou valor positivo para as seis populações: Agudo, Ijuí, Porto Alegre, Santa Maria, Santana do Livramento e Santiago, porém para nenhuma população o teste foi significativo (Tabela 6).

Tabela 5. Valores da estimativa de FST (abaixo da diagonal) e número de migrantes por geração (acima da diagonal) de 15 populações de *Bombus morio* no Rio Grande do Sul.

	TA	POA	FW	PEL	SM	AG	ST	SCS	LAJ	Ijuí	Bagé	SL	LS	CS	DP
TA	-	-	-	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0	0,0
POA	-1,00000	-	-	0,75	-	-	1,5	-	-	-	-	-	1,5	-	2,9999
FW	0,00000	0,00000	-	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0	0,0
PEL	1,00000	0,40000	1,00000	-	0,5	3,2500	0,0	0,2499	4,9141	0,5	-	0,5	0,0	-	0,0
SM	-1,00000	-0,66667	0,00000	0,50000	-	-	1,5	-	-	-	-	-	1,5	-	1,00000
AG	-1,00000	-0,03226	0,00000	0,13333	-0,03448	-	1,5	-	7,4592	-	-	-	1,5	-	-
ST	0,00000	0,25000	0,00000	1,00000	0,25000	0,25000	-	1,5	3,8508	1,5	1,5	1,5	-	0,0	0,0
SCS	-1,00000	-0,33333	0,00000	0,66667	-0,50000	-0,03704	0,25000	-	-	-	-	-	1,5	1,000	0,3333
LAJ	-0,59259	-0,22118	-0,03927	0,09235	-0,27458	0,06282	0,11492	-0,19601	-	-	-	-	3,8508	-	-
Ijuí	-1,00000	-0,11111	0,00000	0,50000	-0,14286	-0,15385	0,25000	-0,20000	-0,14985	-	-	-	1,5	-	0,6666
Bagé	-1,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,25000	0,00000	-0,03152	0,00000	-	-	1,5	-	0,1999
SL	-1,00000	-0,66667	0,00000	0,50000	-1,00000	-0,03448	0,25000	-0,50000	-0,27458	-0,14286	0,00000	-	1,5	-	1,000
LS	0,00000	0,25000	0,00000	1,00000	0,25000	0,25000	0,00000	0,25000	0,11492	0,25000	0,25000	0,25000	-	0,0	0,0
CS	1,00000	-0,20000	1,00000	0,00000	0,00000	-0,73333	1,00000	0,33333	-0,36508	0,00000	-1,00000	0,00000	1,00000	-	0,0
DP	1,00000	0,14286	1,00000	1,00000	0,33333	-0,44444	1,00000	0,60000	-0,36508	0,42857	0,71429	0,33333	1,00000	1,00000	-

TA, Três arroios; POA, Porto Alegre; FW, Frederico Westphalen; PEL, Pelotas; SM, Santa Maria; AG, Agudo; ST, Santiago; SCS, Santa Cruz Do Sul; LAJ, Lajeado; SL, Santana do Livramento; LS, Lavras do Sul; CS, Caçapava do Sul; DP, Dom Pedrito. Valores significativos de índice de fixação (Fst) ($p < 0,05$).

Tabela 6. Testes de neutralidade, D de Tajima e Fs de Fu, e seus respectivos valores de p.

População	D de Tajima	p value	Fs de Fu	p value
Agudo	0,00	1,00	2,56	0,57
Bagé	0,00	1,00	0,00	0,24
Caçapava do Sul(CS)	0,00	1,00	0,00	-
Frederico Westphalen(FW)	0,00	1,00	0,00	-
Ijuí	0,00	1,00	0,69	0,37
Lajeado(LAJ)	-0,623	0,369	-0,065	0,27
Lavras do Sul(LS)	0,00	1,00	0,00	-
Pelotas(PEL)	0,00	1,00	0,00	-
Porto Alegre(POA)	0,00	1,00	1,09	0,43
Santa Cruz do Sul(SC)	0,00	1,00	0,00	0,25
Santa Maria(SM)	0,00	1,00	0,69	0,37
Santana do Livramento(SL)	0,00	1,00	0,69	0,37
Santiago(ST)	0,00	1,00	1,61	0,70
Três Arroios(TA)	0,00	1,00	0,00	-
Dom Pedrito(DP)	0,00	1,00	0,00	-

Valores significativos indicados em negrito ($p < 0,05$).

Ao comparar populações da América do Sul, houve a perda de pares de base, pois as sequências depositadas no genBank tem um total de 383pb, tamanho muito inferior às sequências deste estudo (619pb), diminuindo o número de haplótipos deste estudo de nove para seis haplótipos. A rede de haplótipos construída com um total de 121 sequências com 383pb, foram verificados a presença de 24 haplótipos. As substituições de bases nitrogenadas possibilitaram a existência de três novos haplótipos, BM21, BM22 e BM23, que até então não tinham sido descritos, e são exclusivos de um único local no Rio Grande do Sul (Agudo, Lajeado e Porto Alegre). Em termos de distribuição, dois haplótipos são muito bem distribuídos, o haplótipo BM01 representou 42,15% das amostras (51 entre 121 indivíduos), presente em 23 populações, posicionado no centro de todos os demais, conforme a rede de haplótipos (Figura 5), já BM02 representou 25,62% das amostras, estando presente em 16 locais. Outros haplótipos foram restritos a um único local (BM04, BM05, BM06, BM08, BM09, BM10, BM12, BM13, BM14, BM15, BM16, BM17, BM18, BM20, BM21, BM22, BM23 e BM24) e tinham baixa frequência (Figura 5 e 6). O haplótipo BM03 está presente em seis locais incluindo Argentina e estados brasileiros. Por outro lado, foram encontrados muitos haplótipos exclusivos, ou seja, que pertencem a apenas uma população. A rede de haplótipos apresenta um considerável número de haplótipos raros separados por apenas uma única diferença de nucleotídeos.

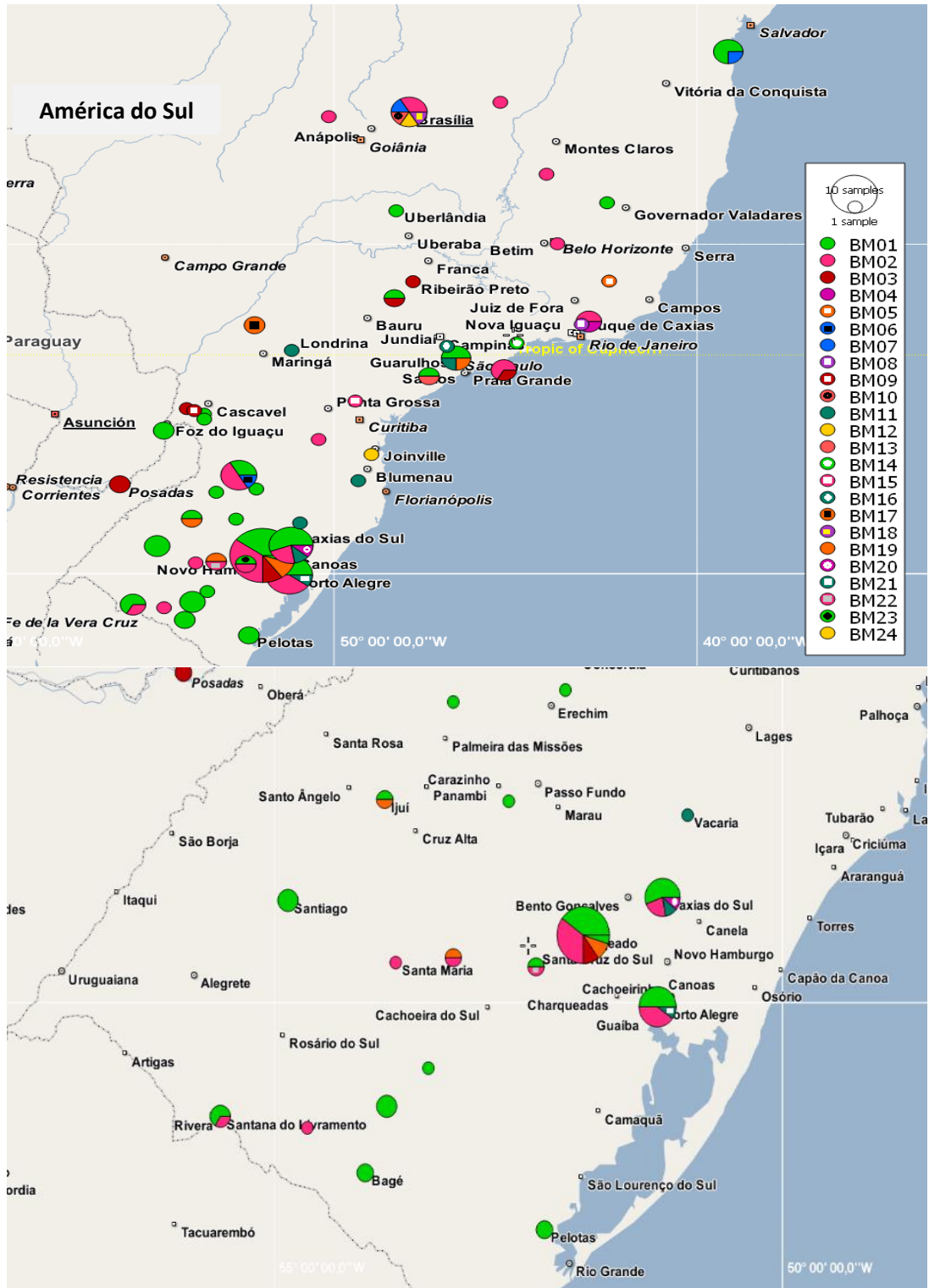


Figura 5. Network de haplótipos de *Bombus morio* na América do Sul utilizando o gene parcial mtDNA COI (383pb) depositados no genBank.

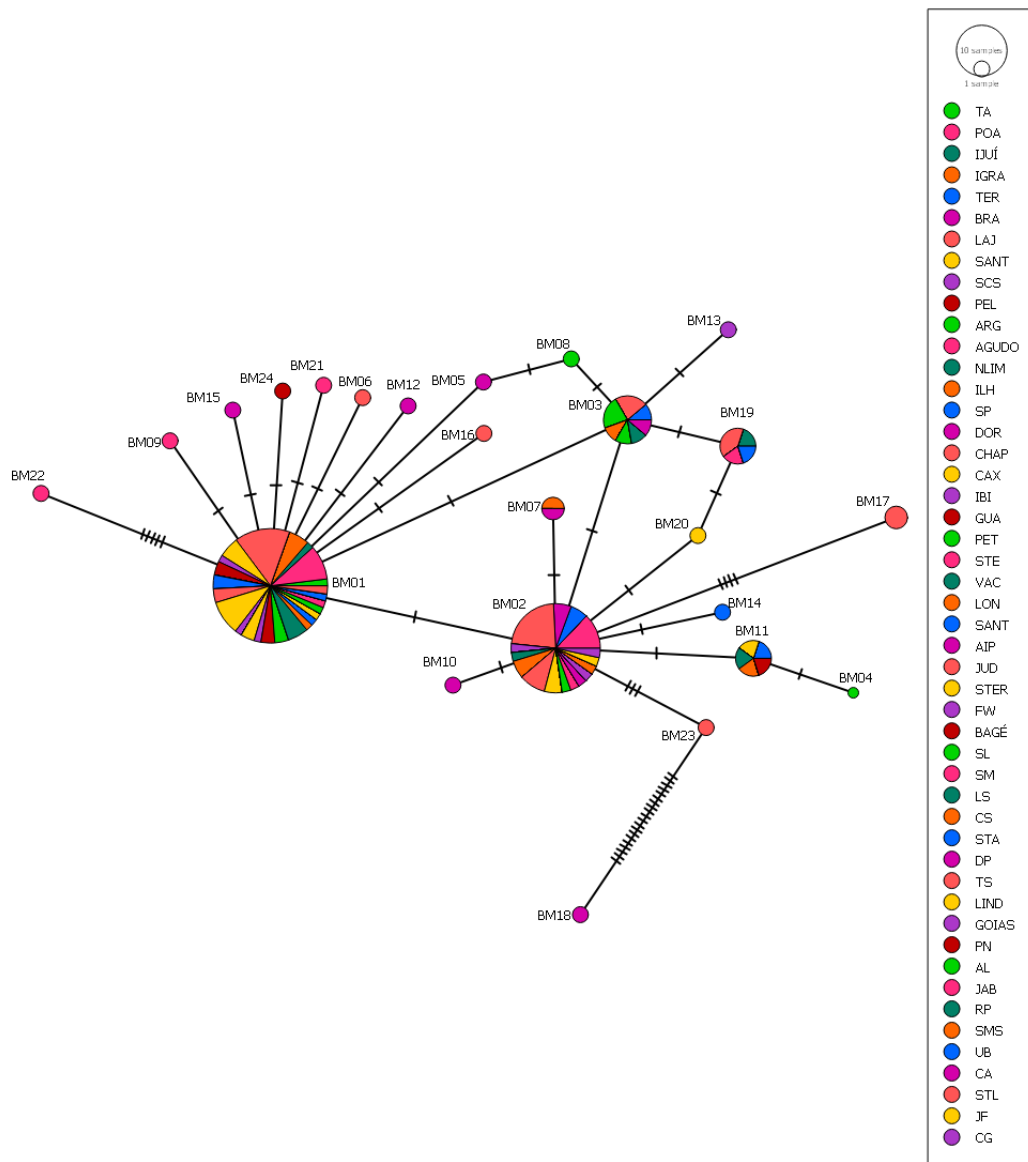


Figura 6. Network de haplótipos *Bombus morio* na América do Sul, utilizando o gene parcial mtDNA COI (383pb). As áreas circulares são proporcionais a frequência de cada haplótipo. TA, Três arroios; POA, Porto Alegre; FW, Frederico Westphalen; PEL, Pelotas; SM, Santa Maria; ST, Santiago; SCS, Santa Cruz Do Sul; LAJ, Lajeado; SL, Santana do Livramento; LS, Lavras do Sul; CS, Caçapava do Sul; DP, Dom Pedrito; IGRA, Igrapiúna; TER, Teresópolis; BRA, Brasília; ARG, Argentina; NLIM, Nova Lima; ILH, Ilha Bela; SP, São Paulo; DOR, Dorcas do Rio Preto; CHAP, Chapecó; CAX, Caxias do Sul; IBI, Ibiúna; GUA, Guaratuba; PET, Petrópolis; STE, Santa Tereza do Oeste; VAC, Vacaria; LON, Londrina, SAB, Santo Antonio do Barreiro; AIP, Apiaí; JUD, Jundiá; STER, Terezinha do Itaipu; SAP, Santo Antonio do Planalto; TS, Teodoro Sampaio; LINDO, Lindoeste; PN, Presidente Nereu; AL, Água Limpa; JAB, Jaboticatuvás; RP, Ribeirão Preto; SMS, São Mateus do Sul; UB, Uberlândia; CA, Céu Azul; STL, Santa Lúcia; JF, Joaquim Felício; CG, Chapada Gaúcha.

5 DISCUSSÃO

5.1 Amostragem de *Bombus morio* no Rio Grande do Sul

As amostragens em campo de *B. morio*, permitiram a construção de um novo mapa de distribuição. Portanto, este mapa de distribuição da espécie aponta em dois sentidos, ou seja, a) foi amplificada a área de abrangência das amostragens; e b) com pequena sobreposição nas áreas mais avaliadas até este estudo. Desse modo, não é possível afirmar que ao encontrar *B. morio* em outras regiões, que a espécie tenha ampliado a sua distribuição no estado, como também não se pode afirmar, que a espécie não esteja desaparecendo, como outras espécies de *Bombus*, pois as informações disponíveis até agora, como as deste trabalho não permitem tal afirmação.

A aparente distribuição fragmentada de muitas espécies conhecidas no Brasil, tem se mostrado como resultado da carência de estudos, pois muitas apresentam registros somente em um grupo de regiões (DUMAS et al., 2010). Para os dias atuais, a confirmação da ampliação da área de ocorrência da espécie de *B. morio* apresenta relevância ambiental, pois a comprovação da maior zona de dispersão da espécie está associada a condições propícias para a reprodução e alimentação, bem como expõe necessidade de providências e práticas conservacionistas para o cuidado com essa espécie nativa do Sul do Brasil.

5.2 Análise da estrutura genética

Ficou evidenciada uma grande riqueza de bases A e T, na qual adenina e timina somam mais de 70% das bases, como esperado para o gene mitocondrial de insetos, como abelhas (CROZIER; CROZIER, 1993; SIMON; FRATI, 1994; FERREIRA, 2011; CRISTIANO et al., 2012; WILLIAMS et al., 2012; FRANÇOSO; ARIAS, 2013), esta maior proporção de adenina e timina também foi encontrada para o mtDNA de outros insetos (ZHANG; HEWITT, 1997). Françaço et al. (2016) observaram valores similares para populações de *B. morio*. A variação da composição nucleotídica no mtDNA podem ser justificadas possivelmente ao mecanismo de replicação e mutação, sendo um indicativo de processos evolutivos do gene (SMITH; SZATHMARY, 1995). As mudanças do tipo transições ocorrem de forma espontânea na natureza e podem ser “tendenciosas” quando expostas a pressões seletivas, nesse estudo a mudança do tipo transição ocorreu em maior número, e as transversões ocorrem frequentemente em condições oxidativas (KINO; SUGIYAMA, 2001).

As análises de variabilidade genética de *B. morio* do estado do Rio Grande do Sul, indicam a existência de alta diversidade haplotípica ($Hd=0,770$) e moderada diversidade

nucleotídica ($\pi=0,00454$), comparada a estudo de outras abelhas (BONATTI et al., 2014). Assim sugere-se que ocorreu uma expansão demográfica após um período de baixo tamanho efetivo populacional. Resultados que corroboram, foram encontrados por Françoso et al. (2016), encontraram um valor de $Hd= 0,964$ e $\pi =0,00315$, ao comparar espécimes de *B. morio* de diferentes lugares do Brasil, incluindo apenas a região metropolitana de Porto Alegre e Serra Gaúcha. A maioria dos estudos sobre genética de populações demonstrou que espécies nativas têm maior diversidade genética do que espécies exóticas (PUILLANDRE et al., 2008).

O alto número de haplótipos encontrados em um pequeno número de amostras, sugere uma diversidade genética significativa. Porém, levando em consideração que a diversidade haplotípica está relacionada com o tamanho amostral, foi utilizado um número de indivíduos sequenciados variável entre um a quatro nas localidades estudadas, os valores da diversidade nucleotídica se tornaram mais apropriados para a comparação entre as populações, porque estes valores não estão vinculados ao tamanho amostral. Assim sendo, a localidade de Agudo foi caracterizada pelo maior π , pois apresentou a população com haplótipos que mais divergiram entre si, enquanto a cidade de Bagé, menor π , foram os mais semelhantes. A baixa ou nula diversidade nucleotídica encontrada em algumas populações do estado pode ser resultado devido apenas uma fêmea ser responsável pela construção do ninho, ou pelo isolamento populacional ou em consequência da fragmentação do habitat.

O moderado valor de diversidade nucleotídica é relacionado a pouca variação entre algumas populações, pois algumas diferem entre si por poucos passos mutacionais, dados apresentaram um máximo de 12 mutações entre os haplótipos BM1 e BM23. A inferência que podemos fazer quanto a variabilidade intra populacional refere-se à diversidade da população de *B. morio* do Rio Grande do Sul que apresentou nove haplótipos, porém o índice de diversidade nucleotídica dessa população indica que os diferentes haplótipos encontrados nessa população são poucos divergentes entre si.

A rede de haplótipos indica a presença de haplótipos semelhantes, com moderada diversidade nucleotídica, sugerindo que a maior parte destes haplótipos surgiu recentemente, a partir de haplótipos ancestrais (FERRERI; QU; HAN, 2011).

B. morio tem uma ampla distribuição geográfica no Rio Grande do Sul e ainda assim aparenta apresentar menores níveis de divergência genética, indicando um eficiente fluxo gênico entre as populações. A similaridade genética entre algumas localidades, também foi evidenciada pela distribuição de haplótipos neste estudo (Figura 4), mostrando que as populações compartilham haplótipos entre si. Esses resultados também foram encontrados por

Françoso et al. (2016), apresentando uma menor variação entre espécimes de *B. morio* presentes no Brasil.

A análise de *Fst* demonstrou que há uma estreita relação entre as populações de *B. morio* no RS, o que é resultado do fluxo gênico entre elas. As análises de *Fst* e *Nm* com base no COI indicam que as populações de *B. morio* que ocorrem no Rio Grande do Sul são similares (Tabela 4). Embora não exista um estudo preciso sobre a distância de dispersão e voo de *B. morio*, Moure e Sakagami (1962) afirmaram que esta espécie tem uma capacidade de dispersão muito maior que sua espécie simpátrica, *B. pauloensis*. Também se sabe que as espécies genéricas, *B. terrestris*, *B. lucorum* e *B. lapidários* tem poder de dispersão de muitos quilômetros (MIKKOLA, 1978), o que indica que *B. morio* pode ter uma ampla dispersão. Porém, deve-se considerar que o teste realizado é sensível ao tamanho populacional, portanto os valores de *p* podem ter sido diretamente influenciados pelo baixo número amostral das populações, assim para confirmarmos as distâncias entre as mesmas calculadas pelo *Fst* seria necessário ampliar o número amostral nestas populações.

Os testes aplicados para verificar se as sequências do gene COI estão evoluindo de maneira neutra, apresentaram valores não significativos ($\alpha > 0,05$ e $\alpha > 0,01$), indicam que as populações de *B. morio* estejam em equilíbrio genético, não demonstrando expansão populacional, e valores positivos não podem ser interpretados como expansão demográfica recente (FU, 1997). A população de Lajeado analisada separadamente, apresentou valor negativo, porém não significativo, demonstrando que está evoluindo de maneira neutra. A evolução, segundo o teste D de Tajima, ocorreu de forma pouco variada, aproximando-se da neutralidade, o que demonstra pouca pressão de seleção na espécie. É possível observar que houve uma evolução semelhante, por conta da baixa diversidade nas sequências deste índice. Estes valores não significativos são indicativos da ausência de modificações no tamanho populacional, fraca seleção ou seleção neutra, ou seja, as populações estão em equilíbrio entre mutação e deriva genética (TAJIMA, 1989).

Ao comparar populações da América do Sul, como pode ser observado na figura 5 e 6, mostra que as populações compartilham haplótipos entre si. Populações distantes compartilham o mesmo haplótipo, o que pode evidenciar gargalos populacionais seguidos de expansão demográfica (FRANÇOSO et al., 2016).

Um dos exemplos, é o compartilhamento de haplótipos entre populações do Rio Grande do Sul e Bahia e entre Rio Grande do Sul e Distrito Federal, torna evidente um poderoso fluxo gênico entre estas populações no passado. Alguns haplótipos estão amplamente distribuídos por centenas de quilômetros, enquanto outros estão muito relacionados e são encontrados separados

por grandes distâncias. O conhecimento do potencial de migração e do fluxo gênico entre populações geograficamente distantes é ilimitado, pois ocorre migração a longa distância.

Os haplótipos referentes a América do Sul, estão intimamente relacionados ao BM01 e BM02, que se diferem por apenas um passo mutacional, com uma divergência mínima de sequências. As análises sugerem que *B. morio* não tem barreiras biogeográficas para o fluxo gênico que leva a grandes subdivisões genéticas, e o mesmo haplótipo presente em diferentes regiões do Brasil, mesmo a grandes distâncias. Assim, a distribuição dos haplótipos de *B. morio* pode ser resumida como uma ampla distribuição de dois únicos haplótipos e uma distribuição muito restrita dos haplótipos restantes.

Dessa forma, possivelmente o BM01 seja um dos ancestrais, pois segundo Cunha; Solé-Cava (2012), o haplótipo ancestral é o que tem frequência mais comum na população e, segundo Bonatti et al. (2014) é esperado que haplótipos ancestrais sejam bem distribuídos geograficamente em relação aos haplótipos mais recentes devido ao maior tempo de dispersão, o que pode ser inferido ao BM01, que possui distribuição em quase todas as localidades (Figura 4).

Supõem-se que linhagens diferentes se originam a partir de uma linhagem comum (CASTELLO; TEMPLETON, 1994). É esperado que haplótipos ancestrais sofram várias mutações, originando haplótipos descendentes, e também que estes dois haplótipos estejam presentes em uma mesma rede (TEMPLETON et al., 1992). Os haplótipos mais recentes são encontrados nas extremidades, e os ancestrais no centro da rede. Os ancestrais estão melhor distribuídos geograficamente e haplótipos recentes tenham distribuição mais restrita, devido ao menor tempo de dispersão.

As evidências mostram que há fluxo gênico entre os organismos das diferentes localidades. Algumas possibilidades, independentes ou conjuntas, poderiam explicar tal proximidade genética, além da proximidade geográfica entre alguns, dos espécimes amostrados. Como por exemplo: ação antrópica, as correntes de ar, a proximidade das matas às áreas urbanas e o potencial reprodutivo de *B. morio*. As populações amostradas neste estudo não apresentaram indícios de que a antropização de lavoura e pastagem estejam diminuindo a diversidade genética destas populações, ou que pelo menos ainda não foi possível detectar impacto na diversidade genética dos indivíduos amostrados.

Os resultados sugerem que as fêmeas voam a longas distâncias e isso pode influenciar diretamente as estratégias de conservação. Por exemplo, a quantidade de fluxo gênico entre as populações pode influenciar o tempo que uma determinada característica precisará se espalhar ao longo do intervalo de espécies (HARTFIELD et al. 2012; MILLER et al. 2017). O alto fluxo

gênico entre populações de *B. morio* pode estar ligado à capacidade de dispersão de adultos, e o fato de que esta espécie está bem adaptada a diferentes ambientes.

6 CONCLUSÕES

B. morio está distribuído mais amplamente no Rio Grande do Sul, do que se conhecia e tinha registro.

As populações de *B. morio* do Rio Grande do Sul, apresentam significativa diversidade genética pelo fato da espécie ser originária do Sul/Sudeste do Brasil e adaptada a diversas condições ecológicas.

As populações de *B. morio* apresentam forte fluxo gênico, com alta capacidade de dispersão.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMOVICH, A.H.; DIAZ, N.B.; MORRONE, J.J. Distributional patterns of the Neotropical and Andean species of the genus *Bombus* (Hymenoptera: Apidae). **Acta Zoológica Mexicana**. v. 20, p. 99-117, 2004.

ACOSTA, A.L. *Bombus terrestris* **chegará ao Brasil? Um estudo preditivo sobre uma invasão em potencial**. 2015. 270 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Ecologia. São Paulo, 2015.

ALFORD D.V. **Bumblebees**. Davis-Poynter, London, 1975.

ALLENDORF, F.W.; LUIKARK, G. Conserving global biodiversity? Conservation and the genetics of populations. **Conservation Genetics**. v. 9, p. 437-438, 2008.

ARBETMAN, M.P. et. al. Alien parasite hitchhikes to Patagonia on invasive bumblebee. **Biological Invasions**. v. 15, p. 489-494, 2013.

ARIAS M.C. E SHEPPARD W.S. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 5, p. 557-566, 1996.

ARIAS, M.C. **O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos**. In: MELLO G. A. R; ALVES-DOS-SANTOS, I. (eds.). Apoidea Neotropica: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure. 1. Ed. Criciúma: Editora UNESC. 2003. p. 305-309.

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematics. **Annual Review Ecology Systematics**. n.18, p. 489–522, 1987.

BAER, B.; SCHIMID-HEMPEL, P. Unexpected consequences of polyandry for parasitism and fitness in the bumblebee, *Bombus terrestris*. **Evolution**. n. 55, p. 1639-1643, 2001.

BIESMEIJER, J.C. 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, p. 17-24, 2014.

BROWN, M. J. F.; PAXTON, R. J. The conservation of bees: a global perspective. **Apidologie**. v.40, n. 3, p. 410-446, 2009.

BROWN, W.M. **The mitochondrial genome of animals**. "In" **Molecular Evolutionary Genetics** (ed. R.J. MACINTYRE), pp. 95-130, Plenus Press, New York, 1985.

BUCHMANN, S.L. **Buzz pollination in angiosperms**. In: JONES, C. E. & LITTLE, R. J. eds. Handbook of experimental pollination biology. New York, Van Nostrand Reinhold. p.73-113, 1983.

BUCHMANN, S.L.; NABHAN, G.P. **The Forgotten Pollinators**. Island Press, Washington, D.C, 1996.

CAMERON, S.A. et. al. Patterns of Widespread Decline in North American Bumble Bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 108, 2. ed., p. 662-667, 2011.

CAMERON, S.A.; HINES, H.M.; WILLIAMS, P.H. A comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*). **Biological Journal of the Linnean Society**. v. 91, p.161-188, 2007.

CAMERON, S.A.; JOST, M.C. Mediators of dominance and reproductive success among queens in the cyclically polygynous Neotropical bumble bee *Bombus atratus* Franklin. **Insectes Sociaux**. v. 45, p. 135-149, 1998.

CAMILLO, E.; GARÓFALO, C.A. Analyses of the niche of two sympatric species of *Bombus* (Hymenoptera, Apidae) in southeastern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**. v. 5, p. 81-92, 1989.

CARVELL, C. Habitat use and conservation of bumblebees (*Bombus* spp.) under different grassland management regimes. **Biological Conservation**. v. 103, p. 33-49, 2002.

CASTELLOE, J.; TEMPLETON, A.R. Root probabilities for intraespecific gene trees under neutral coalescent theory. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 3, p. 102-113, 1994.

CHARMAN, T.G.; SEARS, J.; GREEN, R.E.; BOURKE, A.F.G. Conservation genetics, foraging distance and nest density of the scarce Great Yellow Bumblebee (*Bombus distinguendus*). **Molecular Ecology**. n.19, p. 2661–2674, 2010.

COLLA, S.R.; PACKER, L. Evidence for decline in eastern North American bumblebees (Hymenoptera: Apidae), with special focus on *Bombus affinis* Cresson. **Biodiversity Conservation** v.17, p. 1379-1391, 2008.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; KNOLL, F. R. N.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Nicho trófico e abundância de *Bombus morio* e *Bombus atratus* em diferentes biomas brasileiros. In: Melo, G.A.R. & Alves-dos-Santos, I. (Eds.) – **Apoidea eotópica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. ed. UNESCO, Criciúma, p. 285-296, 2003.

CRISTIANO, M.P.; FERNANDES-SALOMAO, T.M.; YOTOKO, K.S.C. Nuclear mitochondrial DNA: an Achilles' heel of molecular systematics, phylogenetics and phylogeographic studies of stingless bees. **Apidologie**. v. 43, p. 527-538, 2012.

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

CUNHA, H.A, SOLÉ-CAVA, A.M. **Análise Filogeográfica**. In: S.R. Mاتيoli. *Biologia Molecular e Evolução*. (pp. 197-215). Ribeirão Preto: Holos editora, 2012.

DANFORTH, B.N. The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. **Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 103, n.41, p.15118-23, 2006.

EBERT, D.; HAMILTON, W.D. Sex against virulence: The coevolution of parasitic diseases. **Trends Ecology Evoluiton**. v.11, p. 79-82, 1996.

ELLIS, J.S.; KNIGHT, M.E.; GOULSON, D. Delineating species for conservation using mitochondrial sequence data: the taxonomic status of two problematic *Bombus* species (Hymenoptera: Apidae). **Ecology and Evolutionary Biology**. v. 9, p. 75-83, 2005.

ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J.M.; GOUDET, J.; SCHOLL, A. Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. **Molecular Ecology**. v.5, p.19–31,1996.

ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.; HARRY, H.; CORNUET, J. M. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insects species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. **Nucleic Acids Research**. v. 21, p.1427-1431, 1993.

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

FAO (Food and Agriculture Organization). Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture – the international response. In: FREITAS, B. M.; PORTELLA, J.O.B.(Ed.). *Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination*. Fortaleza, Imprensa Universitaria, 2004. p. 285.

FERREIRA, K.M. **A colonização de uma área por espécies de abelhas sem ferrão. Um Estudo de Caso: Partamona helleri (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)**. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos. 2010.

FERREIRA, V.S.; AGUIAR, C.M.L.; OLIVEIRA, E.J.F.; COSTA, M.A. Mitochondrial DNA variability in populations of *Centris aenea* (Hymenoptera, Apidae), a croppollinating bee in Brazil. **Genetics and Molecular Research**. v. 12, p. 830- 837, 2013.

FITZPATRICK Ú.; MURRAY T.E.; PAXTON R.J.; BREEN J.; COTTON D.; SANTORUM V.; BROWN M.J.F. Rarity and decline in bumblebees — a test of causes and correlates in the Irish fauna. **Biological Conservation**. v. 136, p. 185–194, 2007.

FOLMER, O. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C Oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**. v.3, n.5, p. 294-299, 1994.

FRANÇOSO, E. **Filogeografia de *Bombus morio* e *B. pauloensis*** (Hymenoptera, Apidae). Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. 2015, 180p.

FRANÇOSO, E.; ARIAS, M.C. Cytochrome C Oxidase I primers for corbiculate bees: DNA barcode and mini-barcode. **Molecular Ecology Resource**. v.13, p. 844-850. 2013.

FRANÇOSO, E.; ZUNTINI, A.R.; CARNAVAL, A.C.; ARIAS, M.C. Comparative phylogeography in the Atlantic forest and Brazilian savanas: pleistocene fluctuations and dispersal shape spatial patterns in two bumblebees. **Evolutionary Biology**. v.16, p.267, 2016.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares em el análisis genético**. Brasilia. D.F. Embrapa – Cenargen. 221p. 1998.

FRANKHAM R.; RALLS K. Inbreeding leads to extinction. **Nature**. v. 392, p.441-442, 1998.

FRANKHAM, R. Genetics and extinction. **Biological Conservation**. v. 126, p. 131-140, 2005.

FREE, J.B. **Insect pollination of crops**. Academic Press, New York, 1970.

FREELAND, J.R.; KIRK, H.; PETERSEN, S. **Molecular Ecology**. 2. ed. Chichester, UK: John Wiley e Sons, 2011. 464 p.

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

FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**. v. 147, n. 2, p. 915-25, 1997.

GOULSON, D. **Bumblebees: their behaviour and ecology**. Oxford University Press, New York, 2003.

GOULSON, D. et. at. Decline and Conservation of Bumble Bees. **Annual Review of Entomology**. v. 53, p. 191-208, 2008.

GOULSON, D. The demise of the bumblebee in Britain. **Biologist**. v.53, p. 294-299, 2006.

- GRIXTI, J.C.; WONG, L.T.; CAMERON, S.A.; FAVRET, C. Decline of bumble bees (*Bombus*) in the American Midwest. **Biological Conservation**. v.142, p. 75-84, 2009.
- HABEL, J.C.; HUSEMANN, M.; FINGER, A.; DANLEY, P.D.; ZACHOS, F.E. The relevance of time series in molecular ecology and conservation biology. **Biological Reviews**. v. 89. P 484-492, 2014.
- HAMILTON, W.D. Sex versus non-sex versus parasite. **Oikos**. n.35, p. 282-290, 1980.
- DARVILL, B.; ELLIS, J.S.; LYE, G.C.; GOULSON, D. Population structure and inbreeding in a rare and declining bumblebee, *Bombus muscorum* (Hymenoptera: Apidae). **Molecular Ecology**. n. 15, p. 601-611, 2006.
- HANSSON B.; WESTERBERG L. On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. **Molecular Ecology**. v.11, p. 2467-2474, 2002.
- HARTFIELD, E.A.; HARRIS, M.K.; MEDINA, R.F. Population structure of the pecan nut casebearer *Acrobasis nuxvorella* throughout its geographical distribution. **Agricultural and Forest Entomology**. v.14, p. 119-125, 2012.
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London**. v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.
- HEINRICH, B. Bumblebee Economics. Harvard College. United State of America, 2000.
- HINES, H.M. Historical biogeography, divergence times, na diversification patterns of bumble bees (Hymenoptera: Apidae: Bombus). **Systematic Biological**. v. 57, p.58-75, 2008.
- HOLLAND, B.S.; DAWSON, M.N.; CROW, G.L.; HOFMANN, D.K. Global phylogeography of Cassiopea (Scyphozoa: Rhizostomeae): molecular evidence for cryptic species and multiple invasions of the Hawaiian Islands. **Marine Biology**. v.145, p.1119–1128, 2004.
- HUTH-SCHWARZ, A.; SETTELE, A.; MORITZ, R.F.A.; KRAUS, F.B. Factors influencing *Nosema bombi* infections in natural populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). **Journal Invertebrate Pathology**. v. 110, p. 48-53, 2012.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. **Polinizadores no Brasil: Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. Parte 1: Polinizadores e Polinização – um Tema Global, 2012.
- KELLER L.F.; WALLER D.M. Inbreeding effects in wild populations. **Trends in Ecology and Evolution**. v. 17, p. 230-241, 2002.
- KEVAN, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. **Pollinating bees: the conservation link between Agriculture and Nature**. Brasília: Ministry of Environment, 2002, 313 p.
- KEVAN, P.G.; STRAVER, W.A.; OFFER, M.; LAVERTY, T. M. Pollination of greenhouse tomatoes by bumble bees in Ontario. **Proceedings of the Entomological Society of Ontario**. v.122, p.15-19, 1991.

KIM M.J.; YOON H. J.; IM H.H.; JEONG H.U.; KIM M.I.; KIM S.R.; KIM I. Mitochondrial DNA sequence variation of the bumblebee, *Bombus ardens* (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**. v.12, p. 133-139, 2009.

KINO, K.; SUGIYAMA, H. Possible cause of G-C-->C-G transversion mutation by guanine oxidation product, imidazolone. **Chemistry & Biology**. v.8, n.4, p.369-378, 2001.

KLEIN, A.M. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**. v. 274, p. 303-313, 2007.

KOPPERT, B.V. 2007. Koppert Biological Systems. Natural Pollination. The Netherlands. <http://www.koppert.nl/e003.shtml>.

KOSIOR, A.; CELARY, W.; OLEJNICZAK, P.; FIJAŁ, J.; KRÓL, W.; SOLARZ, W.; PŁONKA, P. The decline of the bumble bees and cuckoo bees (Hymenoptera: Apidae: Bombini) of Western and Central Europe. **Oryx**. v.41, p.79–88, 2007.

KREMEN, C.; WILLIAMS, N.M.; THORP, R.W. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. **Proceeding National Academy Sciences**. v. 99, p. 16812-16816, 2002.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**. v.33, n.3, p. 1-5, 2016.

LAROCCA, S. Sobre a bionomia de *Bombus morio* (Hymenoptera, Apoidea). **Acta Biology Par.** v.5, p.107-127, 1976.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. **DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data**. **Bioinformatics**. Oxford, v. 25, n.11, p. 1451-1452, 2009.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v. 15, p. 65-95, 1984.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological Genetics: Design, Analysis and Application**. Blackwells, Oxford. 2004. 326p.

LOZIER, J.D.; CAMERON, S.A. Comparative Genetic Analyses of Historical and Contemporary Collections Highlight Contrasting Demographic Histories for the Bumble Bees *Bombus pensylvanicus* and *B. impatiens* in Illinois. **Molecular Ecology**. v. 18, 9. ed., p. 1875-1886, 2009.

MARTINS, A.C.; MELO, G.A.R. Has the bumblebee *Bombus bellicosus* gone extinct in the northern portion of its distribution range in Brazil? **Journal of insect conservation**. v.14, p. 207-210, 2010.

MEDINA, R.F.; REYNA, S.M.; BERNAL, J.S. Population genetic structure of a specialist leafhopper on *Zea*: likely anthropogenic and ecological determinants of gene flow. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. Wageningen, v.142, n.3, p. 223-235, 2012.

MEEUS, I.M.J.F.; BROWN, D.C.; DE GRAAF, G. SMAGGHE, Effects of Invasive Parasites on Bumble Bee Declines. **Conservation Biology**. n. 25, p. 662-671, 2011.

MEMMOTT J.; WASER N.M.; PRICE M.V. Tolerance of pollination networks to species extinctions. **Proceeding R. Soc. London B Biol. Sci.** v. 271, p. 2605–2611, 2004.

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

MIKKOLA, K. Spring migrations of wasps and bumble bees on southern coast of Finland (Hymenoptera Vespidae and Apidae). **Ann Entomol Fennici**. v. 44, p.10-26, 1978.

MILLER, N.J.; SAPPINGTON, T.W. Role of dispersal in resistance evolution and spread. *Curr. Opin. Insect Science*. v.22, p. 68-74, 2017.

MILLIRON. H.E. Notes on the nesting of *Bombus morio* (Hymenoptera, Apidae). **Entomology**. v.93, p.1017-1019, 1961.

MIRANDA, E.A.; OLIVEIRA, P.S.; BATALHA-FILHO, H.; ALVES, R.M.; CAMPOS, L.A.O.; WALDSCHMIDT, A.M. Genetic diversity of *Melipona mandacaia* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae), an endemic bee species from Brazilian Caatinga, using ISSR. *Psyche: A Journal of Entomology*. 2012.

MORITZ, C.; HILLIS, D.M. **Molecular systematics: context and controversies**. “In” **Molecular Systematics**. 2nd edition (eds. D.M. HILLIS; C. MORITZ E B.K. MABLE), pp. 1-13, Sinauer Associates, Massachusetts. 1996.

MOURE, J.S.; MELO, G.A.R. Bombini Latreille, 1802. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region** - online version, 2012. Disponível em: <<http://www.moure.cria.org.br/catalogue>> Acesso em: 22 out. 2018.

MOURE, J.S.; SAKAGAMI, S.F. As mamangabas sociais do Brasil (*Bombus* Latreille) (Hymenoptera, Apoidea). **Studia Entomologica**. v.5, p.65-194, 1962.

MURRAY, T.E.; FITZPATRICK, U.; BROWN, M.F.F.; PAXTON, R.J. Cryptic species diversity in a widespread bumble bee complex revealed using mitochondrial DNA RFLPs. **Conservation Genetics**. v.9, p.653- 666, 2008.

MUSEU DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PUCRS (MCT) - Coleção de Abelhas: A memória da nossa biodiversidade <<http://www.pucrs.br/mct/colecoes/entomologia/>> <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>> Acesso em: 22 out. 2018.

NEIGEL, J.; AVISE, J.C. Application of a random walk model to geographic distributions of animal mitochondrial DNA variation. **Genetics**. v.135, p.1209–1220, 1993.

O'DONNELL, S.; BESHES, S.N. The role of male disease susceptibility in the evolution of haplodiploid insect societies. **Proc. R. Soc. Lond. B**. v.271, p. 979–983, 2004.

OTTI, O.; SCHMID-HEMPEL, P. A field experiment on the effect of *Nosema bombi* in colonies of the bumblebee *Bombus terrestris*. **Ecological Entomology**. n. 33, p.577–82, 2008.

OTTI, O.; SCHMID-HEMPEL, P. *Nosema bombi*: a pollinator parasite with detrimental effects. **Journal Invertebrate Pathology**. v. 96, n.118–24, 2007.

PAMILO P.; VARVIO-AHO S.-L. E PEKKARINEN A. Low enzyme gene variability in Hymenoptera as a consequence of haplodiploidy. **Hereditas**. v. 88, p. 93-99, 1978.

PAMILO, P.E.; CROZIER, R.H. Genetic variation in male haploids under deterministic selection. **Genetics**. v.98, p.199-214, 1981.

PERES, M.D.; RENESTO, E. Genetic variability in a *Leporinus lacustres* Campos, 1945 (Osteichthyes: Anostomidae) population from lagoa do Carao, Brazil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**. v.27, n.1, p. 79-84, 2005.

PING, L.; XING, H.J.; DONG, A.D.; YU, H.S; JIE, W. Molecular identification and distribution characteristics of the bumblebee *Bombus lucorum* complex in China. **Acta Entomologica Sinica**. v.57, n.2, p.235-243, 2014.

PIROUNAKIS K.; KOULIANOS S.; SCHMID-HEMPEL P. Genetic variation among European populations of *Bombus pascuorum* (Hymenoptera: Apidae) from mitochondrial DNA sequence data. **European Journal Entomology**. v.95, p.27-33, 1998.

RESH, V.H.; CARDÉ, R.T. **Encyclopedia of insects**. 2. ed. Academic Press: Burlington, 2009. 1131 p.

POTTS, S. Global Pollinator Declines: Trends, Impacts and Drivers. **Trends in Ecology & Evolution**. v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.

POUVREAU, A.; MARILEAU, R. L'élevage des bourdons: leur utilisation pour la pollinisation des plantes. **Cahier de Liaison OPIE**. p. 1–20, 1980.

PRYS-JONES, O.E.; CORBET, S.A. **Bumblebees. Naturalists' Handbooks 6**. Ricmond publishing Co. Ltd. 1991.

PULLANDRE, N.; DUPAS, S.; DANGLES, O.; ZEDDAM, J.L.; CAPDEVIELLE-DULAC, C.; BARBIN, K.; TORRES-LEGUIZAMON, M.; SILVAIN, J.F. Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. **Biol. Invasions**. v.10, p. 319-333, 2008.

RICKETTS, T.H. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology Letters**. v.11, p.499-515, 2008.

SARASTE, W.; SIBBALD, P.R.; WITTINGHOFER, A. The P-loop—a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. **Trends Biochemistry Science**. v.15, p. 130-134, 1990.

SHANKAR, P.; KULKARNI, V.M.; KUMAR, L.S. Male biased gene flow in banana pseudostem weevil (*Odoiporus longicollis* Oliver) as revealed by analysis of the COI-tRNA (Leu) COII region. **Genetica**. v. 143, n.1, p. 85-92, 2015.

SHAO, Z.; MAO, H.; FU, W.; ZHANG, Y.P. Phylogenetic relationships of 11 bumblebee species (Hymenoptera: Apidae) based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequences.

SHEPPARD, W.S.; MCPHERON, B.A. **Ribosomal DNA diversity in Apidae**. In: Diversity in the genus *Apis*. Smith DR: Westview, Boulder (CO), p. 89-102, 1991.

SILVEIRA, F.A. et al. **Abelhas brasileiras. Sistemática e Identificação**. Fundação Araucária, Belo Horizonte, 2002.

SILVEIRA, F.A.; GODÍNEZ, L.M. Systematic surveys of local bee faunas. **Melissa**. v.9, p.1-4, 1996.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**. v. 87, p. 651-701, 1994.

SMITH, J.M.; SZATHMARY, E. **The major transitions in evolution**. Oxford University press, 1995.

STEFFAN-DEWENTER, I.; POTTS, S.G.; PACKER, L. Pollinator diversity and crop pollination services are at risk. **Trends Ecology Evol.** v.20, p. 651-653, 2005.

STRASSMANN, J. The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera. **Insectes Soc.** v.48, p.1-13, 2001.

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

TARPY, D.R. Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. **Proc. R. Soc. Lond.** n. 270, p. 99-103, 2003.

TAYLOR, O.M.; CAMERON, S.A. Nest construction and architecture of the Amazonian bumble bee (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie**. v.34, p. 321-331, 2003.

TEMPLETON, A.R. Nested clade analysis of phylogeographic data: testing hypothesis about gene flow and population history. **Molecular Ecology**. v. 7, p. 381-397, 1998.

TORGGLER, M.G.F.; CONTEL, E.P.B.; TORGGLER, S.P. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas**. Sociedade Brasileira de Genética. São Paulo-Ribeirão Preto. 1995, 175p.

VELTHUIS, H. H. W.; VAN DOORN, A. (In press). A Century of Advances in Bumblebee Domestication and the Economic and Environmental Aspects of its Commercialization for Pollination. **Apidologie**. v. 37, 4. ed., 421-451, 2006.

WHITEHORN, P.R.; TINSLEY, M.C.; BROWN, M.J.F.; DARVILL, B.; GOULSON, D. Genetic diversity, 448 parasite prevalence and immunity in wild bumblebees. **Proceedings of the Royal Society of 449 London B**. n.278, p. 1195-202, 2011.

WILLIAMS, P.H. An annotated checklist of bumble bees with an analysis of patterns of description (Hymenoptera: Apidae, Bombini). **Bulletin of The Natural History Museum Entomology**. v. 67, p. 79-152, 1998.

WILLIAMS, P.H. **Bumble bees and their decline in Britain**. Central Association of Bee-Keepers, Ilford, 1989. www.nhk.ac.uk/entomology/bombus/decline.html

WILLIAMS, P.H.; CAMERON, S.A.; HINES, H.M.; CEDERBERG, B.; RASMONT, P. A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus *Bombus*). **Apidologie**. v. 39, p. 46-74, 2008.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**. v. 16, p.97-159, 1931.

ZAYED, A.; PACKER, L. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 102, p. 10742-10746, 2005.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares em el análisis genético**. Brasilia. D.F. Embrapa – Cenargen. 221p. 1998.

8 ANEXOS

Anexo A. Acessos do GenBank usados para formulação da dissertação.

Acesso GenBank	Local
KT187886	Igrapíuna – Bahia
KT187884	Teresópolis - Rio de Janeiro
KC853370	Teresópolis - Rio de Janeiro
KC853369	Brasília - Distrito Federal
KC853368	Igrapíuna - Bahia
1407-B03	Misiones – Argentina
KC853371	Teresópolis - Rio de Janeiro
1408-B03	Misiones – Argentina
KJ848939	Nova Lima - Minas Gerais
KJ848800	Brasília - Distrito Federal
KY029959	Ilha Bela - São Paulo
KY030097	São Paulo - São Paulo
KY030087	São Paulo - São Paulo
KY030073	São Paulo - São Paulo
KY030065	Dores do Rio Preto - Espirito Santo
KY030021	Chapecó - Santa Catarina
KY030035	Chapecó - Santa Catarina
KY030012	Lajeado - Rio Grande do Sul
KY029988	Caxias do Sul - Rio Grande do Sul
KY029982	Ibiuna - São Paulo
KY029985	Caxias do Sul - Rio Grande do Sul
KY029966	Guaratuba - São Paulo
KY029943	Igrapíuna - Bahia
KY029944	Igrapíuna - Bahia
KY029953	Petrópolis - Rio de Janeiro
KY029922	Santa Tereza do Oeste – Paraná
KY029938	Brasília - Distrito Federal
KY030096	São Paulo - São Paulo
KY029980	Vacaria - Rio Grande do Sul
KY029948	Londrina – Paraná
KY030059	São Paulo - São Paulo
KY030067	São Paulo - São Paulo
KY030040	Chapecó - Santa Catarina
KY030042	Chapecó - Santa Catarina
KY030033	Chapecó - Santa Catarina
KY030038	Chapecó - Santa Catarina
KY030049	Ibiuna - São Paulo
KY029990	Caxias do Sul - Rio Grande do Sul
KY029993	Santo Antonio do Barreiro - São Paulo
KY029955	Aipiaí - São Paulo
KY029939	Jundiá - Minas Gerais
KY029918	Terezinha do Itaipu - Paraná

KY030124	Brasília - Distrito Federal
KY029981	Vacaria - Rio Grande do Sul
KY029991	Caxias do Sul - Rio Grande do Sul
KY029989	Caxias do Sul - Rio Grande do Sul
KY029984	Caxias do Sul - Rio Grande do Sul
KY029985	Caxias do Sul - Rio Grande do Sul
KY029986	Caxias do Sul - Rio Grande do Sul
KY029987	Caxias do Sul - Rio Grande do Sul
KY029988	Caxias do Sul - Rio Grande do Sul
KY029980	Vacaria - Rio Grande do Sul
KY029994	Porto Alegre - Rio Grande do Sul
KY029995	Porto Alegre - Rio Grande do Sul
KY029996	Porto Alegre - Rio Grande do Sul
KY029997	Porto Alegre - Rio Grande do Sul
KY029998	Porto Alegre - Rio Grande do Sul
KY029999	Porto Alegre - Rio Grande do Sul
KY030000	Porto Alegre - Rio Grande do Sul
KY030001	Porto Alegre - Rio Grande do Sul
KY030007	Lajeado - Rio Grande do Sul
KY030008	Lajeado - Rio Grande do Sul
KY030009	Lajeado - Rio Grande do Sul
KY030010	Lajeado - Rio Grande do Sul
KY030011	Lajeado - Rio Grande do Sul
KY030012	Lajeado - Rio Grande do Sul
KY030013	Lajeado - Rio Grande do Sul
KY030015	Lajeado - Rio Grande do Sul
KY030016	Lajeado - Rio Grande do Sul
KY030017	Lajeado - Rio Grande do Sul
KY030002	Lajeado - Rio Grande do Sul
KY030003	Lajeado - Rio Grande do Sul
KY030004	Lajeado - Rio Grande do Sul
KY030005	Lajeado - Rio Grande do Sul
KY030006	Lajeado - Rio Grande do Sul
KY029918	Teodoro Sampaio - São Paulo
KY029920	Teodoro Sampaio - São Paulo
KY029968	Goiania - Goiás
KY029977	Predidente Nereu - São Paulo
KY029969	Água Limpa - São Paulo
KY029975	Água Limpa - São Paulo
KY029915	Ribeirão Preto - São Paulo
KY029961	Uberlândia - Minas Gerais
