

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**“Ferramentas auxiliares na identificação de espécies de abelhas
Meliponini, com ênfase no gênero *Schwarziana* (Lepelletier, 1836)”**

Raphael Antonio de Oliveira Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área:
Entomologia.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**“Ferramentas auxiliares na identificação de espécies de abelhas
Meliponini, com ênfase no gênero *Schwarziana* (Lepeletier, 1836)”**

Raphael Antonio de Oliveira Silva

Orientadora: Vera Lúcia Imperatriz Fonseca

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área:
Entomologia.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2010

Silva, Raphael Antonio de Oliveira

Ferramentas auxiliares na identificação de abelhas Meliponini, com ênfase no gênero

Schwarziana (Lepeletier, 1836)/ Raphael Antonio de Oliveira Silva; orientador Vera Lúcia Imperatriz Fonseca.

--Ribeirão Preto, 2010.

76 f.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Entomologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Palavras-chave: 1. Morfometria geométrica. 2. *Schwarziana* 3. Meliponíneos. 4. DNA mitocondrial. 5. Identificação automática de espécies. 6. Gene *COI*. 7. Gene *16S*.

SILVA, Raphael Antonio de Oliveira

Ferramentas auxiliares na identificação de abelhas Meliponini, com ênfase no gênero *Schwarziana* (Lepeletier, 1836).

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Entomologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Prof. Dra. Vera Lucia Imperatriz Fonseca, orientadora deste trabalho. A ela, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade e pelos conhecimentos adquiridos durante os últimos anos, desde o período da Graduação até este momento.

Ao mesmo tempo que agradeço por tudo, aproveito também para dedicar aos meus pais, Antonio e Olézia, e minha irmãs Má e Taty, este trabalho que marca mais um passo em minha vida. Junto à minha família agradeço à minha namorada, Marina, a pessoa que sem dúvida nenhuma esteve sempre ao meu lado, curtindo, apoiando e suportando cada momento, seja ele bom ou ruim. Obrigado a todos vocês!

Obrigado ao Prof. Dr. Tiago Mauricio Franco, que considero o co-orientador de todo este trabalho, me ensinando todas as técnicas de morfometria.

Agradeço a todos do Laboratório de Ecologia de Abelhas da FFCLRP-USP/RP e também do IB-USP em São Paulo. Pelo auxílio em coletas de material, na manutenção de colônias e pelo conhecimento que também adquirimos no dia a dia. No fim desta etapa conseguimos entender melhor o valor do trabalho em equipe. Agradeço também a toda a equipe do Laboratório de Genética e Evolução de Himenópteros da UFSCar, sob a orientação do Prof. Dr. Marco A. Del Lama. Especialmente à Cíntia Akemi Oi, que pacientemente me ensinou os experimentos relacionados a parte molecular da dissertação.

A todos os colegas pesquisadores e meliponicultores, apaixonados pelas abelhas sem ferrão, que gentilmente nos cederam amostras e, mais do que isso, dedicaram seu tempo em favor deste trabalho, muitas vezes até sem muito nos conhecer. Ao Prof. Dirk Koedam, ao

Cleyton em Santa Catarina, ao Eurico de Sabará, ao Sélvio e à Neura em Cambará, ao Marcos da Bahia, e tantos outros que contribuíram demais para que tudo pudesse acontecer.

Aos meus queridos amigos e amigas, companheiros e ex-companheiros de República Kremutcho, que se for citar um a um não haveria fim. Amizade é amizade quando o tempo e a distância não superam os bons momentos que se passaram e os que ainda estão por vir. Obrigado, galera.

RESUMO

SILVA, R. A. O. **Ferramentas auxiliares na identificação de abelhas Meliponini, com ênfase no gênero *Schwarziana***. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

As abelhas sem ferrão estão entre os animais mais importantes para o equilíbrio do meio ambiente, isso devido a fatores como sua enorme diversidade e principalmente por serem importantes polinizadores tanto de ecossistemas naturais como de agroecossistemas. A necessidade de identificação dos animais amostrados por especialistas é fundamental para estudos ecológicos. Neste trabalho foram feitas análises interespecíficas e intra-populacionais sobre os indivíduos do gênero *Schwarziana* a fim de aperfeiçoar a utilização da técnica de morfometria geométrica, que nos permite identificações baseadas apenas nos padrões de venação das asas desses insetos. Não obstante, foram realizadas também análises de sequenciamento de dois genes do DNA mitocondrial, o *COI* e o *16S*. O gênero estudado foi *Schwarziana*, com duas espécies válidas, *S. quadripunctata* e *S. mourei*. Nas análises morfométricas, os testes realizados por indivíduos os testes de validação cruzada identificaram de forma correta 70% das amostras de um total de 10 localidades diferentes. Esta acurácia aumenta ainda mais à medida que novos grupos são formados, alcançando próximo de 85% quando separadas por regiões. Em todos os ensaios realizados com a morfometria geométrica (*partial warps* e coordenadas alinhadas) atingiu-se uma taxa de 100% de identificação correta entre as duas espécies e nos ensaios feitos com as médias das colônias esta taxa também foi atingida para a identificação de todas as populações amostradas. Os testes feitos com os *partial warps* mostraram-se mais eficazes em relação às coordenadas alinhadas, já que nestes últimos a tolerância mínima para a separação dos

grupos não foi atingida em alguns ensaios. As análises moleculares apontaram 53 sítios polimórficos para o gene *COI*, com um índice de diversidade nucleotídica de 0,02180 e de diversidade haplotípica de 0,8854, separando as amostras em 9 haplótipos, porém a rede de haplótipos não foi suficientemente conclusiva. A diferenciação genética total medida pelo parâmetro F_{st} somente para as populações de *S. quadripunctata* foi de 0.9453 ($P < 0,05$). Já para o gene *16S* foram encontrados 14 sítios polimórfico e um índice de diversidade nucleotídica de 0,00649 e de diversidade haplotípica de 0,8419, com 7 haplótipos gerados. O parâmetro F_{st} para todas amostras foi de 0.9552 ($P < 0,05$) e somente para as de *S. quadripunctata* foi de 0.8736 ($P < 0,05$). Para ambos os genes os testes F_{st} par-a-par mostraram uma maior variação entre as populações dos estados, mostrando que estas populações estão estruturadas. Os testes de Mantel correlacionaram positivamente os dados morfométricos, geográficos e moleculares. Das duas metodologias aplicadas em nossa pesquisa, podemos afirmar que a morfometria mostrou-se extremamente eficiente na diferenciação das populações amostradas. As análises moleculares indicaram que estas populações estão estruturadas mesmo analisando poucas amostras. No entanto ao unirmos estas duas metodologias, combinamos a simplicidade e a rapidez da morfometria geométrica com a capacidade sempre inovadora de estudos moleculares, obtendo desta forma ferramentas eficazes para acessar a biodiversidade em Meliponini, inclusive para rastrear geograficamente espécimes a partir de estudos com indivíduos de sua área de distribuição natural.

Palavras-chave: 1. Morfometria geométrica. 2. *Schwarziana* 3. Meliponíneos. 4. DNA mitocondrial. 5. Identificação automática de espécies. 6. Gene *COI*. 7. Gene *16S*.

ABSTRACT

SILVA, R. A. O. **Auxiliar tools for Meliponini bees' identification, emphasizing the genus *Schwarziana***. 76p. Master Thesis - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Stingless bees are among the most important animals to the environmental balance, that due to their diversity and mainly because they are important pollinators of both natural and agro-ecosystems. The need for identification of sampled animals by experts is essential for ecological studies. In this work, intra and interspecific population analysis was performed in order to improve the technique of geometric morphometry, which allows us to access this biodiversity through identifications based on patterns of wing venation of these insects. We also sequenced two mitochondrial genes, the *COI* and *16S*. *Schwarziana* Lepeletier 1836 was the gender studied with two valid species, *S. quadripunctata* and *S. mourei*. In morphometric analysis, cross-validation tests carried out by individuals correctly identified 70% of samples from a total of 10 different locations. This accuracy increases further as new groups are formed, according to geographic proximity, reaching around 85% when separated by regions. In all tests with geometric morphometry (partial warps and aligned coordinates) reached a rate of 100% correct identification between the two species and the tests made with the averages of the colonies that rate achieved the perfect identification of all populations sampled. Partial warps tests were more effective in relation to aligned coordinates ones, as these last a minimum tolerance for the separation of the groups was not achieved in some tests. Molecular analysis showed 53 polymorphic sites for the *COI* gene, with nucleotide diversity of 0.02180 and haplotype diversity of 0.8854, separating the samples into 9 haplotypes, but their network of haplotypes was not sufficiently conclusive. The total genetic differentiation measured by F_{st} parameter only for the

populations of *S. quadripunctata* was 0.9453 ($P < 0.05$). As for the gene *16S*, we found 14 polymorphic sites and a nucleotide diversity of 0.00649 and haplotype diversity of 0.8419, with seven haplotypes generated. The parameter F_{st} for all samples was 0.9552 ($P < 0.05$) and only for *S. quadripunctata* was 0.8736 ($P < 0.05$). For both genes F_{st} pairwise tests showed greater variation among populations of the states, showing these groups as a genetic structure. Mantel tests were positively correlated for morphometric, geographical and molecular data. Of the two methodologies in our research, we can affirm that the morphometry proved to be extremely efficient in the differentiation of populations. Molecular analysis showed that populations are consistent, even that a low sample size is available. However combining these two methodologies, we have joined the simplicity and speed of geometric morphometric with the always innovative ability of molecular studies, thus achieving effective tools for accessing biodiversity in Meliponini, including a geographically trace for specimens by studying individuals from their natural range.

Keywords: 1. Geometric morphometrics. 2. *Schwarziana* 3. Meliponini. 4. Mitochondrial DNA 5. Automated species identification. 6. *COI* gene. 7. *16S* gene.

SUMÁRIO

1. Introdução	24
1.1 - O gênero <i>Schwarziana</i>	16
1.2 – A morfometria geométrica e o DNA mitocondrial em estudos populacionais	20
2. Objetivos	13
2.1 – Objetivos específicos	23
3. Material e Métodos	24
3.1 – Material biológico:.....	26
3.2 – Análises Morfométricas:	27
3.3 – Análises Moleculares:	29
3.3.a) Extração de DNA.....	29
3.3.b) Amplificação do DNA mitocondrial	29
3.3.c) Sequenciamento do DNA mitocondrial	30
3.4 – Análises Estatísticas:.....	31
4. Resultados	32
4.1 – Morfometria geométrica	33
4.1.a) Análises por indivíduos	33
4.1.b) Análises por médias das colônias	38
4.2 – Sequenciamento de DNA mitocondrial	40
4.2.a) COI.....	41
4.2.b) 16S	44
4.2.c) Genes concatenados.....	48
4.3 – Análises morfométricas baseadas nos haplótipos gerados pelo sequenciamento do mtDNA.....	50
4.3.a)COI.....	51
4.3.b)16S	53
4.4 – Análises de correlação entre as distâncias (testes de Mantel).....	56
5. Discussão	58
6. Conclusão.....	64
7. Referências Bibliográficas	68
8. Apêndices.....	73

1.Introdução

O atual estado de degradação dos ambientes naturais e os níveis de desmatamentos ainda crescentes em diversas regiões têm sido alguns dos fatores que preocupam ambientalistas quando o assunto é diminuição da biodiversidade, principalmente devido a extinções em todo o planeta. Dada ainda a própria falta de conhecimento de grande parte desta biodiversidade, com espécies que ainda precisam ser descritas, ou mesmo descobertas, esforços para catalogar e explicar essa biodiversidade devem ser priorizados (Bickford et al., 2006).

Entre tantos grupos de animais importantes para o equilíbrio dos ecossistemas naturais (seja no patamar local, regional ou global), o grupo das abelhas requer especial atenção pela sua enorme diversidade e principalmente por serem importantes polinizadores de ecossistemas naturais e agroecossistemas (Klein et al., 2003). Um exemplo disso é o papel destes insetos na produção de alimentos como tomates, morangos e diversas outras culturas (Maeta et al., 1992; Cauich et al., 2004; Malagodi-Braga & Kleinert, 2004). Seus habitats são fundamentais para a sobrevivência não só de suas populações, mas também de diversas espécies de plantas a elas relacionadas. Muitos grupos de insetos são conhecidos como polinizadores, mas as abelhas provavelmente fazem parte do grupo mais importante em número e diversidade de espécies de plantas polinizadas (Bawa et al., 1985), uma vez que todas as suas 20.000 espécies, exceto as cleptoparasitas e as necrófagas, são visitantes obrigatórias das flores, utilizando pólen como principal fonte de proteínas para adultos e larvas (Roubik, 1989).

No Brasil, de acordo com Silveira et al. (2002), ocorrem cerca de 1600 espécies de abelhas, agrupadas nas famílias *Colletidae*, *Halictidae*, *Andrenidae*, *Megachilidae* e *Apidae*. A busca de informação sobre a identificação de abelhas é muito grande, e o desenvolvimento de técnicas auxiliares à identificação, como análises morfométricas e DNA barcode, estão evoluindo constantemente.

Desta maneira, este trabalho está voltado principalmente para o aperfeiçoamento de uma nova ferramenta, a qual nos permite acessar essa biodiversidade por meio de identificações automáticas baseadas apenas nos padrões de venação das asas de grupos de insetos. Aliada a outros ramos da sistemática e taxonomia, esta técnica, chamada de morfometria geométrica, tem se mostrado bastante eficaz no reconhecimento de diversos grupos de insetos como lepidópteros (Watson & O'Neill, 2003; Mozaffarian et al., 2007), dípteros (Haas & Tolley, 1998; Carreira et al., 2008; Francuski et al., 2009; Milankov et al., 2009), himenópteros parasitas (Baylac et al., 2003; Villemant et al., 2007) e mais especificamente em grupos de abelhas (Silva, 2006; Aytekin et al., 2007; Mendes et al., 2007; Francisco et al., 2008; Franco et al., 2009).

A morfometria geométrica utiliza uma série de técnicas que visam descrever e representar a geometria das formas estudadas. Enquanto nas abordagens morfométricas tradicionais a variação da forma é estudada através da covariação entre pares de medidas lineares, a morfometria geométrica é capaz de descrever e localizar mais claramente as regiões de mudanças na forma e, sobretudo de reconstruir e reconstituir graficamente estas diferenças (Moraes, 2003). Ela é uma ferramenta muito usada para detectar mínimas variações morfológicas, geralmente indetectáveis por estudos baseados apenas na morfometria tradicional (Villemant et al., 2007), extremamente útil por exemplo em estudos envolvendo a identificação dos chamados “complexos de espécies”, que são caracterizados por altos níveis de especificidade e mínimas diferenças morfológicas entre seus membros (Baylac et al., 2006).

Antes da utilização desta técnica, outros sistemas automáticos de identificação foram criados. Um dos primeiros foi o ABIS- Automated Bee Identification System (Schröder et al., 1995), que já usava a venação das asas como pontos de análise. Neste sistema inicialmente, as espécies bem conhecidas e identificadas por taxonomistas foram utilizadas para a construção de

Introdução

um banco de dados de espécies, com foco nas nervuras das asas anteriores das abelhas. Por sua importância na disponibilização e automatização de identificações corretas, S. Schroeder ganhou o prêmio Ebbe Nielsen de bioinformática em 2003, outorgado pelo GBIF (Global Biodiversity Information Facility). Esta técnica não é utilizada para Meliponini porque estes têm as nervuras das asas anteriores interrompidas e o uso do ABIS se restringe a espécies que apresentem um padrão completo de venação de asas.

O primeiro trabalho utilizando morfometria geométrica para diferenciação de grupos de abelhas foi realizado para a identificação de um grupo de abelhas africanizadas e suas subespécies ancestrais. A análise de deformações relativas dos padrões de nervura de asa atingiu uma taxa de 85% de classificações corretas nas subespécies de *Apis mellifera* (Francoy et al., 2006). Já para as abelhas nativas sem ferrão, o primeiro estudo realizado com este tipo de análise demonstrou que duas populações de *Plebeia remota* não apresentavam fluxo gênico, sendo que até o momento as populações eram reconhecidas como sendo pertencentes à mesma espécie. Juntamente com outros marcadores como DNA mitocondrial, que também será objeto de estudo de nossa pesquisa, e hidrocarbonetos de quitina, tais resultados foram reforçados na proposição de que as populações são duas espécies distintas (Francisco et al., 2008). Dentro da tribo Meliponini resultados expressivos foram também obtidos em outros trabalhos. Em análises anteriores realizadas dentro do gênero *Plebeia* com seis espécies, foi possível a diferenciação de 93,4% dos indivíduos de forma correta nos testes de validação cruzada (Silva, 2006). A técnica se mostrou também eficiente na discriminação de indivíduos de três diferentes sub-populações de *Nannotrigona testaceicornis* separadas por alguns quilômetros, atingindo um acerto de até 74% na classificação dos indivíduos dentro de seus respectivos grupos de origem (Mendes et al., 2007). Recentemente, Francoy et al. (2009) testaram as diferenças entre os sexos das espécies, e

descobriram que o padrão de venação de cada um é mais semelhante entre si do que em relação aos espécimes de outras espécies, mesmo que entre sexos iguais.

1.1 - O gênero *Schwarziana*

Diante destes resultados, onde se conseguiu a separação de níveis tão restritos, como a análise intrapopulacional de *N. testaceicornes* (Mendes et al., 2007), a utilização da técnica para o gênero *Schwarziana* foi levantada como uma opção de análise. Originalmente descrita por Lepeletier (1836) como *Melipona quadripunctata*, sua distribuição geográfica vai desde a Argentina e Paraguai até a região Centro-Norte do Brasil (Figura 1). Moure (1943) foi o primeiro a sugerir uma separação em um subgênero (*Schwarziana*) dentro de *Trigona*, sendo posteriormente reconhecida como um gênero a parte na revisão de Schwarz (1948), com duas subespécies: *S. quadripunctata* e *S. bipartita*. Já para Camargo (1974), estas duas subespécies sugeridas por Schwarz são na verdade sinônimos. De acordo com Melo (2003), a diversidade dentro de *Schwarziana* é maior do que tem sido reconhecida atualmente. Além de descrever essa nova espécie (*S. mourei*), a partir de amostras da região central do território brasileiro e de amostras vindas do Paraguai, eles mencionam outras duas formas não descritas de regiões diferentes, porém não nos aponta quais seriam estas regiões.

As abelhas deste gênero possuem hábito de nidificação subterrâneo, aproveitando cavidades pré-existent de ninhos abandonados de formigas, termitas ou ainda de ocos de raízes de árvores secas (Camargo, 1974). Possuem entradas características, com túneis feitos geralmente com barro (Figura 2.a e 2.e). Os ninhos por nós coletados se encontravam em média de 1,0 m a 1,5 m abaixo do solo, e em algumas ocasiões alguns pequenos besouros da família Leiodidae estavam presentes junto à colônia. Bezerra *et al.* (2000) descreveu o comportamento

Introdução

forético de coleópteros desta mesma família com colônias de *Melipona quadrifasciata*. No caso de *Schwarziana*, acredita-se tratar de uma relação comensal entre duas espécies de insetos, onde o pequeno coleóptero se beneficia alimentando-se do lixo produzido pela colônia (Imperatriz-Fonseca, informação pessoal).



Figura 1: Mapa indicando a distribuição geográfica para o gênero *Schwarziana* (fonte: Moure's Catalogue of Bees).

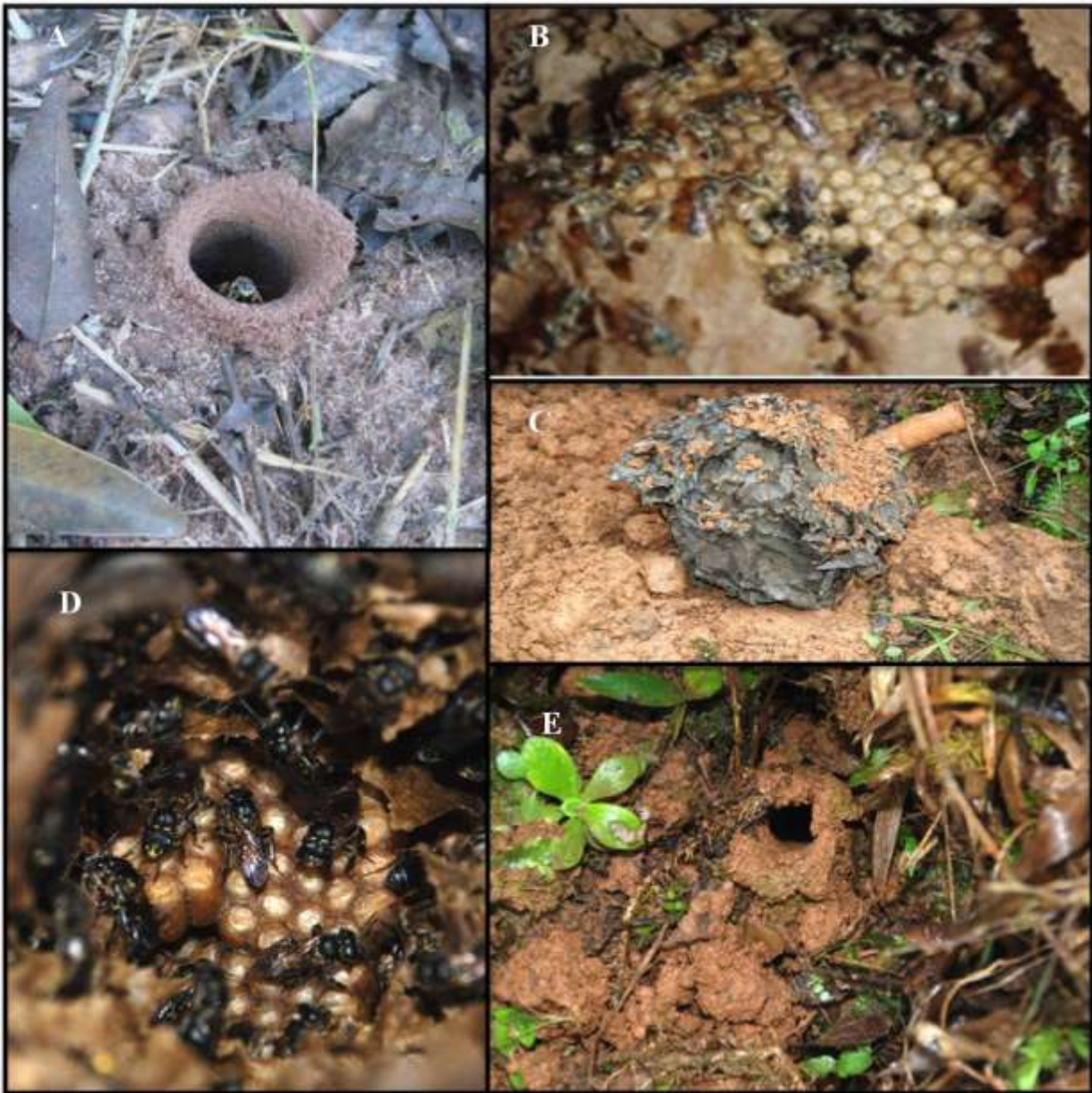


Figura 2: Aspectos da biologia de *Schwarziana*. Entradas dos ninhos (A e E), estrutura externa com invólucro (C) e favos (B e D). Fotos de Fernando Kluwe Dias e Raphael A.O. Silva

Faz-se hoje necessária uma revisão para o gênero (Pedro¹, informação pessoal). *Schwarziana mourei*, considerada atualmente como uma espécie válida, apesar de muito parecida

¹Silvia M. Pedro, FFCLRP/USP-RP.

Introdução

com *S. quadripunctata*, difere-se desta última por detalhes como escutelo inteiramente amarelo (variável em *S. quadripunctata*, fig. 3.a e 3.c), depressão corbicular normal (na segunda estende-se até por mais da metade da tíbia, fig. 3.b e 3.d), pilosidade amarelada, principalmente na região do mesepisterno (Figura 3.a e 3.c).

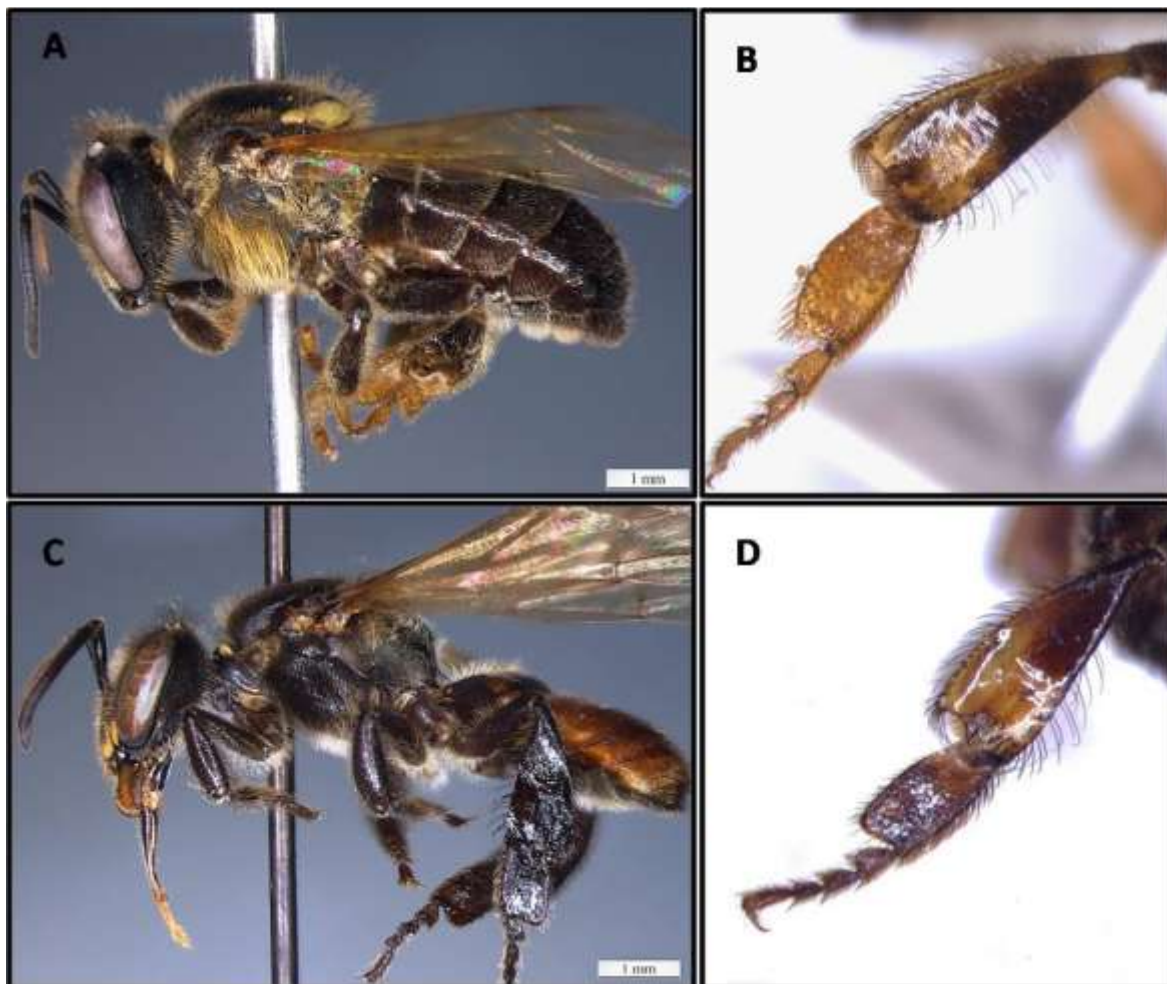


Figura 3: **A.** Exemplar de operária de *Schwarziana mourei*; **B.** Detalhe da perna posterior direita de *S. quadripunctata*; **C.** Exemplar de operária de *Schwarziana quadripunctata*; **D.** Detalhe da perna posterior direita de *S. quadripunctata*. (ênfase em algumas pequenas diferenças entre as duas espécies: pêlos mais longos e amarelados em *S. mourei* (principalmente na região do mesepisterno); cavidade corbicular em *S. mourei* estende-se ao ápice da tíbia). Fotos de Kátia Aleixo e Raphael A. O. Silva.

Embora ressalvemos uma variação morfológica mínima mesmo entre espécimes da mesma população, analisando o material cuidadosamente com auxílio de lupas, podemos notar as diferenças apontadas por Melo (2003). A revisão do grupo permitiria uma análise completa, com exemplares de museus e coleções, e ainda amostras de todas as regiões de ocorrência destas espécies, o que permitiria um avanço nos estudos taxonômicos e biogeográficos.

1.2 – A morfometria geométrica e o DNA mitocondrial em estudos populacionais

A análise de DNA mitocondrial (mtDNA), por RFLP ou sequenciamento, tem contribuído significativamente na resolução de questões filogenéticas em diversas espécies (Arias et al., 2006). Muito tem sido repercutido atualmente sobre o chamado DNA Barcode. Esta metodologia consiste basicamente na identificação de espécies através do sequenciamento de uma pequena porção de um único gene, o *COI*. Assim como a morfometria geométrica, ela tem sido bastante útil na identificação de complexos de espécies ou mesmo de espécies crípticas (Dasmahapatra & Mallet, 2006; Herbert et al., 2004a). O DNA Barcode já se mostrou bastante efetivo em diversos grupos de animais, como em pássaros (Herbert et al., 2004b), em peixes (Ward et al., 2005) e mesmo em insetos (Herbert et al., 2003, 2004a; Smith et al., 2006).

Por uma série de características genéticas e estruturais extremamente peculiares e únicas (vide Arias et al., 2003), o emprego do mtDNA em estudos populacionais permite que, de acordo com o nível taxonômico, possamos selecionar a região mais apropriada para o estudo. Este uso de novas metodologias a fim de conhecer a biodiversidade é extremamente importante, e nos ajuda a entender a dinâmica que envolve esses grupos (Francisco et al., 2008).

Segundo Hajibabaei et al. (2007), diversos outros genes têm sido aplicados em sistemática a nível de espécie. Visto isto, como forma de complementar as análises populacionais

Introdução

das espécies de *Schwarziana* feitas por morfometria geométrica, e assim podermos comparar diferentes resultados de diferentes metodologias, foi feito também a análise de variabilidade genética destas populações, analisando para isso as sequências de dois genes mitocondriais, o *COI*, considerado o gene padrão para o *barcoding*, e o *16S*, sob orientação do Prof. Dr. Marco A. Del Lama (LGEH - UFSCar).

Esta união de estudos morfométricos e moleculares tem sido aplicada com sucesso em diversos estudos de biogeografia e evolução (Quezada-Euán & Hinsull, 1995; Quezada-Euán 2000; Sheppard & Smith, 2000; Milankov et al., 2002; Quezada-Euán et al., 2007; Francisco et al., 2008; entre outros). De acordo com Arias et al. (2003), entre as abelhas, a maior parte dos estudos se restringem ao gênero *Apis*, sendo poucos os trabalhos utilizando ambas metodologias em Meliponini (Francisco et al., 2008).

Quezada-Euán *et al.* (2007) encontraram diferenças em 11 caracteres morfométricos analisados, além de polimorfismos em 6 *loci* de microssatélites, indicando diferenças em 2 populações de *Melipona beecheii*. Já Francisco et al. (2008) demonstraram por meio de análises morfométricas, moleculares e bioquímicas que duas populações de diferentes localidades de *Plebeia remota* não apresentavam fluxo gênico mesmo após anos de simpatria.

Em síntese, os resultados alcançados neste trabalho são baseados nestas duas metodologias recentes de identificação automática. Com o aperfeiçoamento cada dia maior de tecnologias aplicadas à ciência, estas metodologias já são, atualmente, capazes de responder algumas importantes questões biológicas.

2. Objetivos

Objetivos

Muitos estudos com abelhas sem ferrão (Meliponini) são dificultados pela falta de especialistas que identifiquem o material amostrado. Desta forma, o objetivo geral deste trabalho é aperfeiçoar uma nova metodologia que vem sendo utilizada como forma de identificação automática para estas espécies, a morfometria geométrica, e relacioná-las com as análises moleculares de genes do DNA mitocondrial. As diferenças entre alguns grupos de abelhas são mínimas, e somente técnicas bastante apuradas seriam adequadas para o reconhecimento das espécies por não especialistas de forma confiável.

2.1 – Objetivos específicos

- ⇒ Verificar a acurácia da metodologia acima mencionada, de acordo com os grupos pré-definidos para cada análise de coordenadas cartesianas e *partial warps*;
- ⇒ Permitir, através da morfometria geométrica, o rastreamento geográfico de espécies e/ou populações;
- ⇒ Aliar estudos moleculares à morfometria geométrica, por meio de sequenciamento de genes do mtDNA (*COI* e *16S*), de forma a comparar tanto fenotipicamente quanto genotipicamente as populações amostradas;
- ⇒ Caracterizar estes genes do DNA mitocondrial das espécies de *Schwarziana* e permitir o acesso aos dados moleculares, a fim de serem utilizados em futuros estudos populacionais e/ou biogeográficos;
- ⇒ Corroborar através de ambas análises as diferenças entre duas espécies de *Schwarziana*, incluindo espécie nova descrita por Melo (2003), *Schwarziana mourei*. Comparando ainda os resultados destas metodologias, verificar a correlação entre as distâncias geográficas, genéticas e morfológicas das populações amostradas.

3. Material e Métodos

Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado considerando duas espécies descritas: *Schwarziana quadripunctata* (*S. quadripunctata quadripunctata* e *S. quadripunctata bipartita*, aqui consideradas sinônimas) e *Schwarziana mourei*.

Como pontos principais de análise, foram feitas comparações tanto entre as duas espécies consideradas quanto entre as populações das diferentes regiões coletadas no Brasil (Figura 4).



Figura 4: Imagem por satélite com todas as localidades onde espécimes foram coletados (fonte: Google Earth).

3.1 – Material biológico:

Foram realizadas coletas em diferentes localidades da região de ocorrência do gênero. As amostras de *Schwarziana quadripunctata* são provenientes de diversas localidades do território brasileiro e as amostras de *Schwarziana mourei* são originais de Botucatu/SP (Tabela I). Algumas amostras foram coletadas de ninhos naturais, muitas vezes encontrados por parceiros das próprias regiões amostradas, ou cedidos por pesquisadores parceiros do projeto Biota, além de criadores de abelhas sem ferrão que possuíam material de origem conhecida.

Tabela I. Localidades das amostras de *Schwarziana quadripunctata* e *Schwarziana mourei* (*), indicando região, estado, cidade, coordenadas geográficas e quantidade de ninhos (espécimes) amostrados.

REGIÃO	ESTADO	CIDADE	COORDENADAS	NINHOS
Sudeste	São Paulo	Cunha	23°04'S 44°57'W	3(28)
		Vargem Grande Paulista	23°36'S 47°01'W	2(18)
		Botucatu*	22°57'S 48°25'W	2(19)
	Minas Gerais	Ouro Preto	20°23'S 43°30'W	5(50)
		Carandaí	20°57'S 43°48'W	1(10)
	Espírito Santo	Domingos Martins	20°15'S 40°53'W	2(20)
Sul	Rio Grande do Sul	Cambará do Sul	29°02'S 50°08'W	5(49)
	Santa Catarina	Luzerna	27°08'S 51°29'W	1(09)
		Passos Maia	26°44'S 01°47'W	2(20)
Nordeste	Bahia	Pres. Tancredo Neves	13°26'S 39°25'W	2(20)

Para a discriminação das espécies por morfometria geométrica do padrão de venação da asa, obtivemos no total uma amostragem de 243 espécimes de *Schwarziana*. Exemplos adicionais (Vouchers) foram depositados na Coleção Camargo, em Ribeirão Preto (nº do tombo: 100479 - 100539), e um exemplar de cada ninho de cada localidade foi utilizado nas análises moleculares. De acordo com Borisenko et al. (2009), em trabalhos como o desenvolvido aqui,

baseados em análises de DNA, um elemento chave é estabelecer estas amostras adicionais dos espécimes analisados para que, se necessário, novos testes possam ser refeitos

3.2 – Análises Morfométricas:

Foram retiradas, com o auxílio de pinças, as asas anteriores do lado direito de aproximadamente 10 operárias por colônia e montadas entre lâmina e lamínula. Essas asas foram fotografadas com o auxílio de uma câmera digital (Leica DFC500) acoplada a um estereomicroscópio (Leica MZ16) e então capturadas pelo programa Leica Soft IM50.

Com o auxílio do software tpsDig versão 2.04 (Rohlf, 2005a), foram plotados 11 *landmarks* ou marcos anatômicos nas junções de nervuras das células das asas anteriores (Figura 5). Todos os programas do pacote TPS estão disponíveis gratuitamente na internet (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>).

Resumidamente, os *landmarks* (LM) são a base de toda a análise morfométrica e indicam regiões homólogas, nas quais as estruturas biológicas são analisadas e que permitem identificar as variações de forma entre as mesmas estruturas morfológicas nos diferentes exemplares em estudo (Rodrigues et al, 2003).

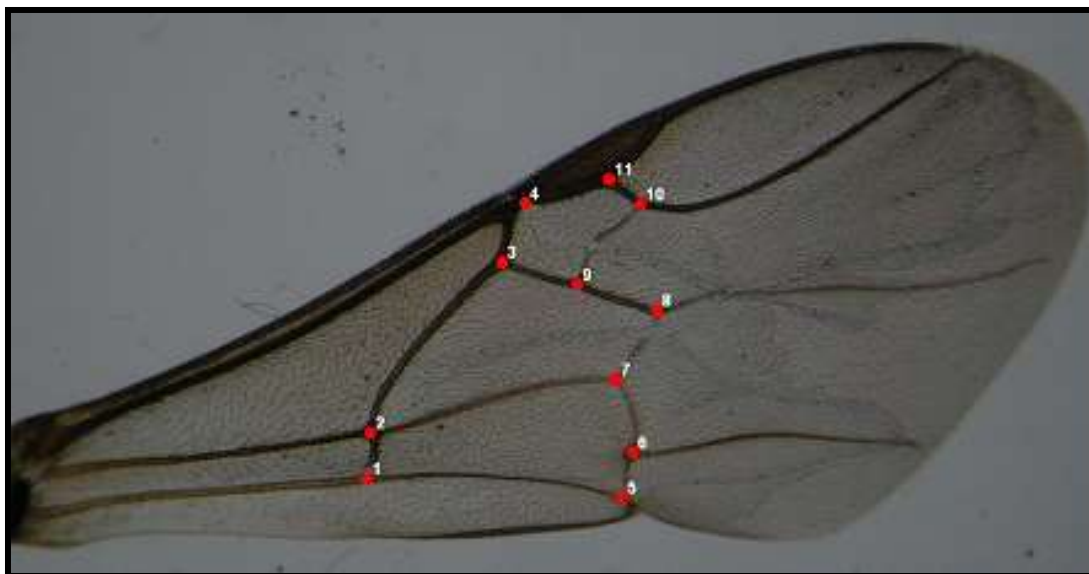


Figura 5: Exemplar de asa anterior direita de operária de *Schwarziana quadripunctata*. Os pontos vermelhos indicam o posicionamento das *landmarks*.

Mesmo com os excelentes resultados alcançados em outros trabalhos, algumas adaptações têm sido feitas de forma que a técnica possa alcançar melhores resultados. Nos primeiros trabalhos, os testes eram baseados nos *relative warps* (deformações relativas), os quais são vetores relacionados à variação das coordenadas dos *landmarks* com respeito à energia gasta para ocorrerem essas deformações. A partir de Franco et al. (2009), as análises dos dados das amostras sofreram alterações. A mudança nos testes ocorreu na maneira de organizar e de analisar os dados. Ao invés de basearmos nossos testes em *relative warps*, onde só conseguíamos saber em quais destes ocorriam variações significativas sem apontar onde essa diferença ocorria na asa, utilizamos agora as Coordenadas Cartesianas alinhadas dos marcos anatômicos marcados nos espécimes da amostra, além de análises de *partial warps*, realizadas com o programa tpsRelw versão 1.42 (Rohlf, 2005b).

A vantagem da utilização dos dados dessa maneira é justamente a oportunidade de demonstrar, através das posições alinhadas dos LM's, a forma da asa de uma população ou

espécie (de acordo com o tipo de agrupamento que for relevante), e assim ainda poderemos indicar onde está ocorrendo a variação entre os grupos em questão.

3.3 – Análises Moleculares:

Esta parte do trabalho, realizada no Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros (DGE-Ufscar), sob coordenação do Prof. Dr. Marco A. Del Lama, baseou-se em 3 etapas: extração do DNA das amostras, amplificação dos genes mitocondriais *16S* e *COI*, e posterior seqüenciamento e análise dos eletroferogramas.

3.3.a) Extração de DNA

Após a retirada da cabeça, asas e abdômen, o tórax e as pernas de um indivíduo de cada ninho amostrado foram macerados em nitrogênio líquido. O DNA dos indivíduos amostrados foi extraído de acordo com o protocolo de fenol-clorofórmio (Sheppard & McPheron, 1991).

3.3.b) Amplificação do DNA mitocondrial

Fragmentos de genes mitocondriais foram amplificados usando os oligos iniciadores heterólogos para espécies de abelhas da Tribo Euglossini 16SWb (Dowton & Austin, 1994) e 874-16S (Cameron et al., 1992) para a região *16S* e para a região *COI* foram utilizados os oligos descritos por Dick et al. 2004.

As reações para amplificação das regiões *16S* e *COI* foram preparadas com 250 µM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, tampão Invitrogen 1x, 1 µM de cada oligo (R e F), 1 U de Taq DNA polimerase (Platinum Invitrogen), 2 µL de DNA extraído e água para completar o volume final de 25 µL. As condições de PCR utilizadas foram: 40 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 46° C e 1 min a 72° C, seguidos de 5 min de extensão a 72° C.

Para a confirmação do sucesso da etapa de PCR, os fragmentos foram visualizados em géis de agarose 1% corados com Gel Red™ e visualizados em luz UV.

3.3.c) Sequenciamento do DNA mitocondrial

Produtos amplificados para as regiões *16S* e *COI* foram purificados utilizando 1 U de SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, GE Healthcare) e 10 U de *ExoI* (Exonuclease I, GE Healthcare) para cada 8 µL de produto de PCR. A mistura foi incubada a 37° C por 1 h e a 80° C por 15 min. A verificação do sucesso da etapa de purificação foi realizada em gel de agarose 1% corado com Gel Red™ e visualizado em luz UV.

A reação de sequenciamento do produto de PCR purificado foi realizada no sequenciador automático MegaBace 750-GE (UNESP-Jaboticabal). Os eletroferogramas foram visualizados no programa Codon Code 1.6.3 (Codon Code Corporation: <http://www.codoncode.com/>) e as sequencias foram editadas e alinhadas pelo programa Clustal X (Thompson et al., 1997) no software BioEdit versão 7.0.5 (Hall, 1999). Foi construída uma rede de haplótipos mitocondriais utilizando o software TCS v. 1.21 (Clement et al., 2000) e DnaSP (Rozas et al., 2003), no qual foram obtidos também os índices de diversidade nucleotídica e diversidade haplotípica destes genes. Para todos os *loci*, inclusive na análise com os mesmos concatenados, foram realizadas análises filogenéticas pelo método de Neighbour-Joining, segundo modelo de máxima verossimilhança composta com 10.000 re-amostragens pelo software MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007). Como grupo externo foi utilizada uma amostra disponível no site NCBI de *Melipona bicolor* (AF466146.1) com a parte correspondente de cada gene.

Foram ainda feitas mais três análises utilizando o software Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2005). A primeira foi para verificar o grau de diferenciação total entre as populações de *S. quadripunctata* (as amostras de *S. mourei* foram descartadas nesta parte) por meio da estimativa

do parâmetro F_{st} , bem como a sua distribuição entre estas populações (F_{st} par-a-par), ambas baseadas no método da distância de Kimura (1980). A segunda foi feita para verificar uma nova distribuição da variação em três níveis hierárquicos distintos (grupo, população e indivíduos) detectada pelo teste de AMOVA. A última teve como objetivo verificar a correlação entre as distâncias obtidas nas análises morfométricas e moleculares com as distâncias geográficas das amostras por meio do teste de Mantel com 10000 permutações.

3.4 – Análises Estatísticas:

No caso dos dados gerados pelas análises de morfometria geométrica, foram realizadas Análises de Componente Principal e Análises Discriminantes junto aos dados alinhados e de *partial warps* com o programa Statistica 7.0, bem como a variabilidade encontrada. Além disso, foram feitos também os testes de validação cruzada com o programa SPSS para Windows, versão 18.0.

Dentro de uma colônia podemos ter grandes diferenças entre os indivíduos (diferenças de desenvolvimento, nutrição, mutações, entre outros fatores), o que pode afetar a acurácia das análises morfométricas (Francoy, informação pessoal). A fim de amenizar esta variação entre as amostras a serem analisadas, mesmo estas sendo da mesma colônia, incluímos também em nossas análises testes feitos com as médias de cada colônia.

4. Resultados

Resultados

Os resultados alcançados por cada metodologia estão apresentados abaixo e foram organizados de forma separada. Desta forma, apresentaremos primeiramente os ensaios realizados com morfometria geométrica e em seguida os resultados das análises moleculares.

4.1 – Morfometria geométrica

Como mencionado anteriormente, foram feitas dois tipos de análises, uma parte considerando o indivíduo como base dos testes e outra considerando as médias para cada colônia coletada.

4.1.a) Análises por indivíduos

Assim como realizamos análises morfométricas baseadas nos haplótipos gerados pelo sequenciamento genético (Item 4.3 do trabalho), estas mesmas análises moleculares foram, por sua vez, baseadas em nosso primeiro ensaio de morfometria, que consiste na análise de um dos pontos principais do trabalho, a variabilidade populacional do gênero *Schwarziana*, incluindo também amostras da espécie recém-descrita por Melo (2003), *S. mourei*.

Nesta primeira parte separamos as amostras em dez grupos, os quais representavam todas as localidades amostradas (Tabela I). A Análise de Discriminantes das coordenadas alinhadas não alcançou a tolerância mínima para a separação dos grupos, porém nos *partial warps* a porcentagem de correção na identificação dos grupos foi de 81,89% (Wilk's $\lambda = 0,00456$, $P < 0,00001$). A Distância de Mahalanobis entre os grupos segue abaixo (Tabela II), e mais a frente a matriz de classificação dos espécimes para os *partial warps* (Tabela IV). Nos testes de validação cruzada alcançamos uma taxa de 70% de correção nas identificações.

Resultados

Tabela II: Distância quadrada de Mahalanobis entre as populações de *S. quadripunctata* (representada pelas localidades) e de *S. mourei* (origem: Botucatu/SP).

GRUPOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cambará do Sul (1)	*****	12.5	15.3	36.1	10.7	8.8	17.3	34.9	10.3	7.7
Cunha (2)		*****	9.2	44.0	14.3	8.9	7.4	27.1	23.7	17.3
Vargem G. Paulista (3)			*****	50.8	12.1	5.7	13.9	30.2	24.6	27.5
Botucatu (4)				*****	42.6	44.7	56.0	50.9	42.8	30.1
Pres. Tanc. Neves (5)					*****	6.6	18.0	32.9	16.6	20.1
Ouro Preto (6)						*****	11.1	33.9	14.5	20.6
Carandaí (7)							*****	33.0	28.9	18.4
Domingos Martins (8)								*****	51.7	40.8
Luzerna (9)									*****	13.1
Passos Maia (10)										*****

No ensaio seguinte colocamos as amostras divididas por seus estados, ficando assim: **1.** Rio Grande do Sul (Cambará do Sul); **2.** Santa Catarina (Luzerna e Passos Maia); **3.** São Paulo (Cunha e Vargem Grande Paulista); **4.** *Schwarziana mourei* (Botucatu - sp. nova); **5.** Bahia (Presidente Tancredo Neves); **6.** Minas Gerais (Ouro Preto e Carandaí); **7.** Espírito Santo (Domingos Martins). A Análise de Componente Principal (PCA) das Coordenadas Cartesianas alinhadas nos deu seis autovalores maiores que 1, o que explicou 74,36% das diferenças entre os grupos. Nos partial warps, obtivemos cinco autovalores maiores que 1, explicando 60,92% da variação. Na Análise de Discriminantes das coordenadas alinhadas, assim como para o primeiro teste, não foi alcançada a tolerância mínima para a separação dos grupos, porém nos *partial warps* a porcentagem de correção na identificação dos grupos foi de 81,89% (Wilk's $\lambda = 0,01189$, $P < 0,00001$), igualando portanto a taxa de acerto do primeiro ensaio. Os testes de validação-cruzada alcançaram uma taxa de 73,7% de acurácia. A Distância de Mahalanobis entre

Resultados

os grupos segue abaixo (Tabela III) e mais a frente a matriz de classificação dos espécimes para os *partial warps* (Tabela IV).

Tabela III: Distância quadrada de Mahalanobis entre as populações de *S. quadripunctata* (representada pelas localidades) e de *S. mourei* (origem: Botucatu/SP).

GRUPOS	Rio G. do Sul	São Paulo	S. <i>mourei</i>	Bahia	Minas Gerais	Espírito Santo	Santa Catarina
Rio G. do Sul	*****	11.27	35.81	10.57	8.48	33.89	5.35
São Paulo		*****	43.56	10.68	4.01	25.58	17.03
<i>S. mourei</i>			*****	41.23	43.57	50.08	30.79
Bahia				*****	7.02	30.83	15.03
Minas Gerais					*****	30.74	14.05
Espírito Santo						*****	41.36
Santa Catarina							*****

Seguindo o raciocínio de agrupar as formas mais próximas entre si do ponto de vista geográfico, no próximo ensaio colocamos as amostras provenientes da Região Sul do território brasileiro como sendo uma população só, desta forma trabalhamos agora com 6 grupos: **1.** Região Sul (Rio G. do Sul e Santa Catarina); **2.** São Paulo (Cunha, Vargem Grande Paulista); **3.** *Schwarziana mourei* (sp. nova); **4.** Bahia; **5.** Minas Gerais (Ouro Preto e Carandaí); **6.** Espírito Santo. Os resultados obtidos nos dois testes (coordenadas alinhadas e *partial warps*) obtiveram taxas semelhantes de identificações corretas, 83,12% para o primeiro (77,4% para os testes de validação cruzada) e 84,77% para o segundo (75,7% nos testes de validação cruzada). Os gráficos gerados pelas análises de Discriminantes também foram semelhantes (Figura 6).

Resultados

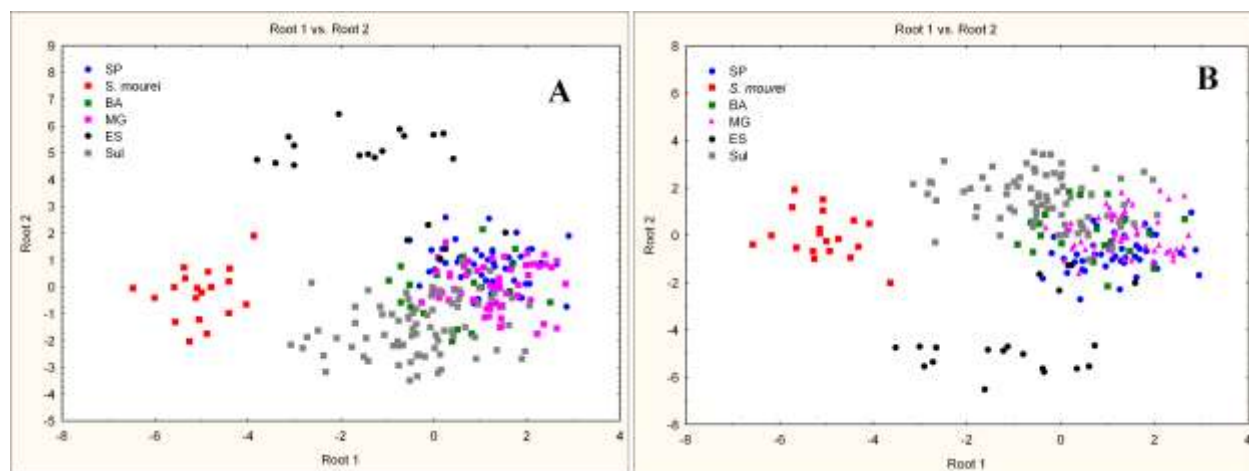


Figura 6: Gráfico da Análise de Discriminantes por indivíduos de *Schwarziana sp.* **A.** Análise de coordenadas alinhadas; **B.** Análise de *partial warps*.

Mais à frente, realizamos outro ensaio, agora dividindo as amostras em 4 grupos (**1.** Região Sul (Rio G. do Sul e Santa Catarina); **2.** Região Sudeste (São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo); **3.** *Schwarziana mourei* (spp. nova) e **4.** Bahia. Nesse ponto as taxas de acerto passaram para mais de 90% de correção e os testes de validação cruzada foram capazes de identificar corretamente 84,8% das amostras.

As respectivas matrizes de classificação para os ensaios realizados até o momento estão expostas conjuntamente na Tabela IV.

Resultados

Tabela IV: Matrizes de classificação dos ensaios realizados por indivíduos de *Schwarziana*.

	Espécimes alinhados	<i>Partial warps</i>
10 grupos	% de classif. Correta	% de classif. Correta
Cambará do Sul – RS	*	81.63
Cunha – SP	*	82.14
Vargem G. Paulista – SP	*	83.33
Botucatu – SP	*	100.00
Pres. Tancredo Neves – BA	*	85.00
Ouro Preto – MG	*	80.00
Carandaí – MG	*	100.00
Domingos Martins – ES	*	75.00
Luzerna – SC	*	66.66
Passos Maia – SC	*	70.00
TOTAL	*	81.89
7 grupos	% de classif. correta	% de classif. Correta
São Paulo	82.61	82.61
<i>S. mourei</i>	100.00	100.00
Bahia	75.00	85.00
Minas Gerais	80.00	80.00
Espírito Santo	75.00	75.00
Região Sul	85.89	88.46
TOTAL	83.13	84.77
6 grupos	% de classif. correta	% de classif. correta
Rio G. do Sul	*	81.63
São Paulo	*	82.61
<i>S. mourei</i>	*	100.00
Bahia	*	85.00
Minas Gerais	*	81.66
Espírito Santo	*	75.00
Santa Catarina	*	72.41
TOTAL	*	81.89
4 grupos	% de classif. correta	% de classif. Correta
<i>S. mourei</i>	100.00	100.00
Bahia	75.00	80.00
Região Sul	87.18	88.46
R. Sudeste	95.24	92.85
TOTAL	91.35	90.94
2 grupos	% de classif. correta	% de classif. Correta
<i>S. quadric</i>	100.00	100.00
<i>S. Mourei</i>	100.00	100.00
TOTAL	100.00	100.00

* Não atinge a tolerância mínima para a Análise de Discriminantes.

4.1.b) Análises por médias das colônias

Para esta parte das análises feitas com as médias de cada colônia, antes de mostrar os resultados obtidos vale ressaltar um aspecto importante em relação ao agrupamento das amostras. Algumas localidades (Luzerna/SC e Carandaí/MG) tiveram apenas um ninho amostrado, o que não é suficiente para analisarmos estatisticamente. Portanto, cada uma destas populações únicas foi alocada dentro da população mais próxima dela geograficamente.

Desta forma, nosso primeiro ensaio com as populações de *Schwarziana* apresentou oito agrupamentos, com Luzerna e Passos Maia agrupadas como população da primeira, e Carandaí e Ouro Preto juntas na população desta última. Nestes testes, o PCA tanto dos espécimes alinhados quanto dos *partial warps* apontaram seis autovalores maiores que 1 (88,13% e 82,84% da variação entre as colônias, respectivamente). Ainda para as populações, os testes realizados tanto com as coordenadas alinhadas quanto com os *partial warps* mostraram-se extremamente eficientes, sendo a técnica capaz de identificar corretamente 100% dos grupos em ambos os ensaios (Figura 7, Tabela V). Os testes de validação cruzada não foram representativos para as análises com as médias das colônias (dados não publicados), isso devido ao fato de o número amostral ficar bem reduzido nestes ensaios. As Distâncias quadradas de Mahalanobis entre as populações para os dois tipos de análise são apresentados na Tabela VI.

Tabela V: Matriz de classificação, por médias das colônias, para as populações de *Schwarziana*.

Resultados

GRUPOS	Espécimes alinhados	<i>Partial warps</i>
	% de classif. Correta	% de classif. Correta
S. mourei	100.00	100.00
Cambará do Sul – RS	100.00	100.00
Cunha – SP	100.00	100.00
Vargem G. Paulista. - SP	100.00	100.00
Pres. Tanc. Neves - BA	100.00	100.00
Ouro Preto – MG	100.00	100.00
Domingos Martins - ES	100.00	100.00
Luzerna - SC	100.00	100.00
TOTAL	100.00	100.00

Tabela VI: Distâncias quadradas de Mahalanobis entre as médias das populações de *Schwarziana*. Abaixo da diagonal os valores resultantes da análise de *partial warps* e, acima da diagonal os valores resultantes da análise de coordenadas alinhadas.

GRUPOS	1	2	3	4	5	6	7	8
S.mourei (1)	*****	11100.1	13653.6	12552.4	8682	15006.6	11491.4	9179.3
Camb. do Sul (2)	979.9	*****	347.1	438.7	287.5	768.9	214.6	737.9
Cunha (3)	855.1	439.6	*****	155.09	752.6	164.2	273.9	935
Vargem G.Pta. (4)	830.3	612.1	46.6	*****	665.5	160.4	287.9	530.6
P. Tanc. Neves (5)	1302.1	249.7	1163.8	1378.8	*****	1251.5	317.7	795.5
Ouro Preto (6)	828.9	181.0	178.1	287.6	499.6	*****	594.2	988.7
Dom. Martins (7)	981.3	337.3	147.9	211.4	816.5	156.3	*****	839.6
Luzerna (8)	412.7	263.7	311.6	390.5	830.5	245.3	410.3	*****

Na análise por médias, os testes realizados baseando-se nos *partial warps* mostraram-se eficientes. Assim como para o primeiro teste com as populações originais, todos os ensaios seguintes baseados nestes dados e seguindo os mesmos moldes do que foi feito para o estudo por indivíduos, alcançaram a taxa de 100% na identificação correta dos grupos (Wilk's $\lambda = 0,00000$, $P < 0,00001$) (Figura 7). Porém os testes com as coordenadas alinhadas só atingiu a tolerância mínima para diferenciação entre os grupos quando as amostras foram agrupadas por espécies.

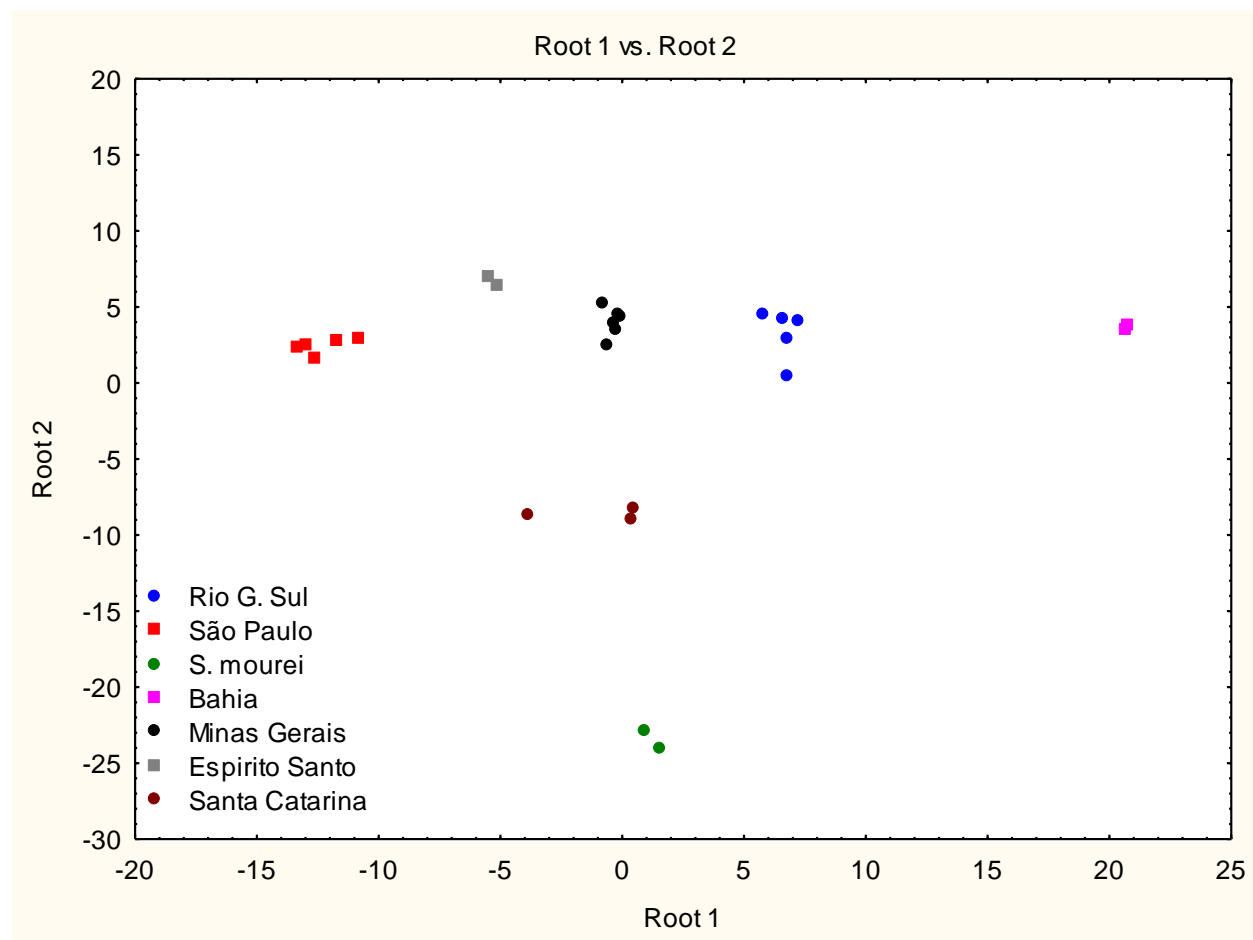


Figura 7: Gráfico da Análise de Discriminantes (*partial warps*) para as médias das colônias de *Schwarziana sp*, separadas por estados de origem e por *S. mourei*.

4.2 – Sequenciamento de DNA mitocondrial

Nas análises moleculares as amostras foram separadas por colônias, sendo nomeadas de acordo com a Tabela VII.

Resultados

Tabela VII: Nomenclatura aplicada para cada amostra das análises de mtDNA. Nos resultados dos ensaios realizados, para cada gene específico (*COI* e *16S*), foi acrescido seu respectivo nome ao fim de cada nomenclatura.

CIDADE	COLÔNIAS	NOMENCLATURA
Pres. Tancredo Neves – BA	N-1	BA_N-1
	N-2	BA_N-2
Domingos Martins - ES	N-1	ES_N-1
Cunha – SP	V-1	Cunha_SP_V-1
	G-1	Cunha_SP_G-1
	G-2	Cunha_SP_G-2
Vargem Grande Paulista - SP	N-1	VGP_SP_N-1
	N-2	VGP_SP_N-2
	N-3	VGP_SP_N-3
Botucatu – SP	N-1	Bot_SP_N-1
	N-2	Bot_SP_N-2
Ouro Preto – MG	N-1	OP_MG_N-1
	N-2	OP_MG_N-2
	N-3	OP_MG_N-3
	N-4	OP_MG_N-4
	N-5	OP_MG_N-5
Carandaí – MG	N-1	Carand_MG_N-1
Cambará do Sul - RS	L-1	RS_L-1
	L-2	RS_L-2
	N-1	RS_N-1
	N-2	RS_N-2
Luzerna – SC	N-1	SC_N-1
	N-2*	SC_N-2

*Amostra de Passos Maia (SC), aqui considerada como de Luzerna, pela proximidade geográfica.

4.2.a) COI

A amplificação do gene *COI*, com um total de 611 pares de bases (pb), apontou um total de 53 sítios polimórficos (Apêndice A), porém quando analisamos o alinhamento das sequências de aminoácidos (Apêndice C) apenas 3 polimorfismos não são sinônimos. Submetemos os sequenciamentos a dois diferentes programas que analisam dados moleculares, o TCS e o DnaSP. Ambos dividiram as amostras de forma igual, separando-as em 9 haplótipos diferentes (Tabela VIII). Ainda por meio do DnaSP, obtivemos os índices de diversidade haplotípica (Hd) de 0,8854 e o de diversidade nucleotídica de 0,02180 para o gene *COI*. Foi gerada ainda pelo

Resultados

TCS uma rede de haplótipos (Figura 8). Vemos que para este gene as amostras não foram suficientemente conclusivas. Como afirma Melo (2003), a variedade dentro do gênero *Schwarziana* parece ser maior do que vem sendo considerada, sendo assim a descontinuidade desta rede pode ser devido à nossa amostragem, que não está englobando toda esta variedade. Nas análises filogenéticas por NJ utilizamos como grupo externo a sequencia disponível de *Melipona bicolor* no site NCBI (AF466146.1), referente a porção do gene amplificado. A árvore filogenética gerada é apresentada mais a frente (Figura 9).

Tabela VIII: Haplótipos gerados por análises através dos programas TCS (v. 1.21) e DnaSP para o gene *COI*.

HAPLÓTIPOS (9)	AMOSTRAS
H-1	BA_N-1 e BA_N-2
H-2	ES_N-1
H-3	Bot_SP_N-1 e Bot_SP_N-2
H-4	Cunha_SP_V-1
H-5	Cunha_SP_G-1; Cunha_SP_G-2; VGP_SP_N-1; VGP_SP_N-2 e VGP_SP_N-3
H-6	OP_MG_N-1; OP_MG_N-2; OP_MG_N-3; OP_MG_N-4 e OP_MG_N-5
H-7	Carand_MG_N-1
H-8	RS_L-1; RS_L-2; RS_N-1 e RS_N-2
H-9	SC_N-1 e SC_N-2

Resultados

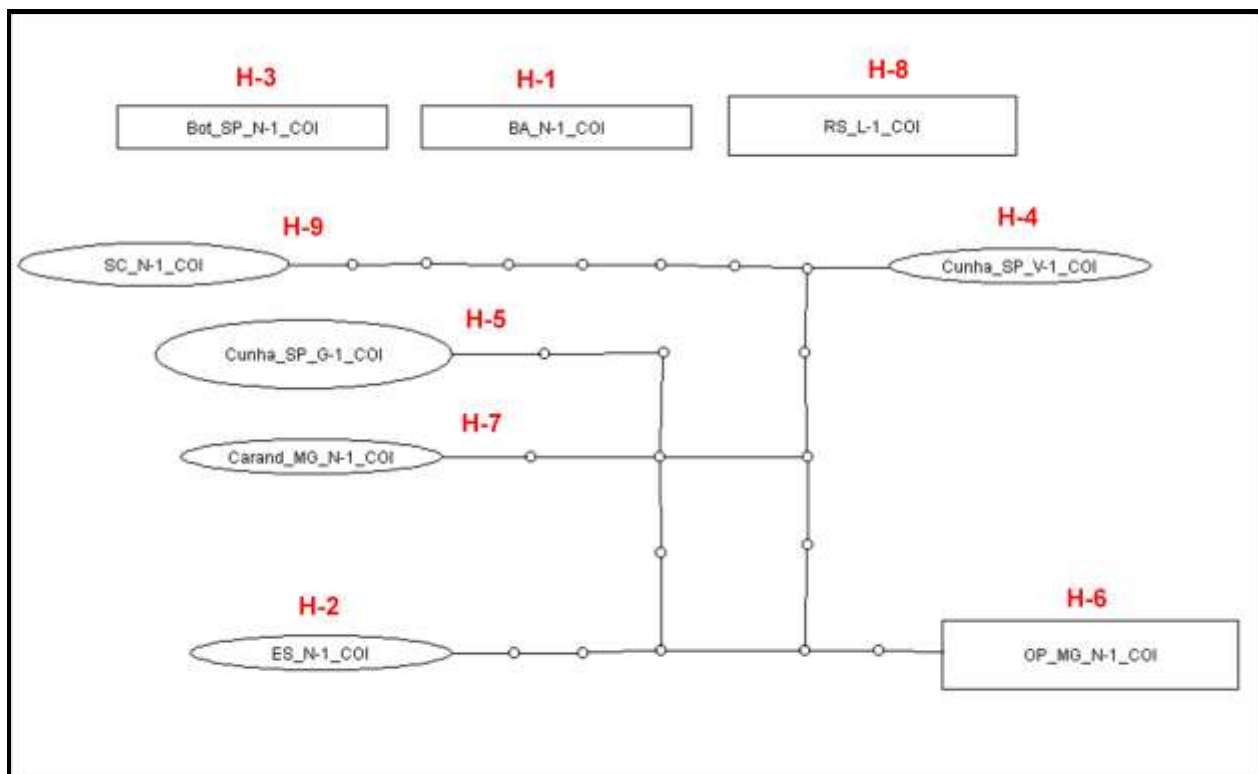


Figura 8: Rede de haplótipos gerada pelo TCS para o gene *COI*. Em vermelho temos os respectivos haplótipos.

A diferenciação total entre as populações de *S. quadripunctata* foi estimada pelo parâmetro F_{st} (0.9453, $P < 0,05$). A fim de examinar onde esta variação se distribuía entre as populações pareadas realizamos também o F_{st} par-a-par (Tabela IX). No teste AMOVA verificamos uma nova distribuição da variação, só que considerando três níveis hierárquicos distintos: entre grupos (populações por estados), entre populações e entre indivíduos (Tabela X).

Resultados

Tabela IX: Abaixo da diagonal, valores de Fst par-a-par da região *COI* de amostras de *S. quadripunctata* de Vargem Grande Paulista (VG), Cunha (Cu), Ouro Preto (OP), Carandaí (Ca), Santa Catarina (SC), Espírito Santo (ES) e Bahia (BA). Em vermelho, Fst de valor significativo ($P \leq 0,05$). Acima da diagonal, valores da significância de cada Fst calculado (P).

GRUPOS	1	2	3	4	5	6	7	8
VG(1)	***	0.999	0.016	0.999	0.076	0.033	0.999	0.099
Cu(2)	0	***	0.024	0.999	0.086	0.025	0.999	0.134
OP(3)	1	0.785	***	0.999	0.028	0.01	0.999	0.033
Ca(4)	1	0.123	1	***	0.357	0.211	0.999	0.305
SC(5)	1	0.717	1	1	***	0.066	0.999	0.337
RS(6)	1	0.862	1	1	1	***	0.999	0.039
ES(7)	1	0.441	1	1	1	1	***	0.291
BA(8)	1	0.835	1	1	1	1	1	***

Tabela X: Porcentagem da variação, entre as seqüências de *COI*, presente nos diferentes níveis hierárquicos (entre os grupos, populações e indivíduos), estimada por AMOVA, pelo teste de distância de Kimura (1980). P=significância.

Fonte de variação	Porcentagem da variação	P
Entre grupos	74.02	0.016
Entre populações	20.51	0.16
Entre indivíduos	5.47	0

4.2.b) *16S*

Para o gene *16S*, a amplificação nos forneceu um total de 568 pares de bases, apontando um total de 14 sítios polimórficos (Apêndice B). As seqüências quando submetidas às análises pelos programas TCS e DnaSP tiveram resultados iguais, separando-as em 7 haplótipos distintos (Tabela XI). O índice de diversidade haplotípica (H_d) para o *16S* foi de 0,8419 e o de diversidade nucleotídica foi de 0,00649. A rede de haplótipos do *16S* (Figura 10) mostrou-se mais resolvida, demonstrando, por exemplo, que *S. mourei* apresenta um número maior de mutações em relação às populações de *S. quadripunctata*. Nas análises filogenéticas por NJ,

Resultados

utilizamos também como grupo externo a sequência disponível de *M. bicolor* no site NCBI (AF466146.1), referente a porção deste gene. A árvore filogenética gerada é apresentada mais a frente (Figura 9).

Tabela XI: Haplótipos gerados por análises através dos programas TCS (v. 1.21) e DnaSP para o gene *16S*.

HAPLÓTIPOS (7)	AMOSTRAS
H-1	RS_L-1; RS_L-2; RS_N-1 e RS_N-2
H-2	ES_N-1; OP_MG_N-1; OP_MG_N-2; OP_MG_N-3; OP_MG_N-4 e OP_MG_N-5 Carand_MG_N-1
H-3	Bot_SP_N-1 e Bot_SP_N-2
H-4	Cunha_SP_V-1
H-5	Cunha_SP_G-1; Cunha_SP_G-2; VGP_SP_N-1; VGP_SP_N-2 e VGP_SP_N-3
H-6	SC_N-1 e SC_N-2
H-7	BA_N-1 e BA_N-2

Foram estimados os parâmetros F_{st} para todas as amostras (0.9552, $P < 0,05$) e para as amostras de *S. quadripunctata* ($F_{st}=0.8736$, $P < 0,05$) além do F_{st} par-a-par para estas últimas (Tabela XII). A distribuição da variação também foi verificada pelo teste de AMOVA, considerando os mesmos três níveis hierárquicos para o *16S*: entre grupos (populações por estados), entre populações e entre indivíduos (Tabela XIII).

Resultados

Tabela XII: Abaixo da diagonal, valores de Fst par-a-par da região 16S de amostras de *S. quadripunctata* de Vargem Grande Paulista (VG), Cunha (Cu), Ouro Preto (OP), Carandaí (Ca), Santa Catarina (SC), Espírito Santo (ES) e Bahia (BA). Em vermelho, Fst de valor significativo ($P \leq 0,05$). Acima da diagonal, valores da significância de cada Fst calculado (P).

GRUPOS	1	2	3	4	5	6	7	8
VG(1)	***	0.999	0.016	0.999	0.076	0.014	0.999	0.119
Cu(2)	0	***	0.014	0.999	0.210	0.033	0.999	0.076
OP(3)	1	0.537	***	0.999	0.042	0.006	0.999	0.026
Ca(4)	1	-0.144	0	***	0.33	0.187	0.999	0.335
SC(5)	1	0.603	1	1	***	0.055	0.999	0.333
RS(6)	1	0.746	1	1	1	***	0.999	0.088
ES(7)	1	-0.144	0	0	1	1	***	0.304
BA(8)	1	0.725	1	1	1	1	1	***

Tabela XIII: Porcentagem da variação, entre as seqüências de *COI*, presente nos diferentes níveis hierárquicos (entre os grupos, populações e indivíduos), estimada por AMOVA, pelo teste de distância de Kimura (1980). P=significância.

Fonte de variação	Porcentagem da variação	P
Entre grupos	83.97	0.01
Entre populações	3.39	1
Entre indivíduos	12.64	0

Resultados

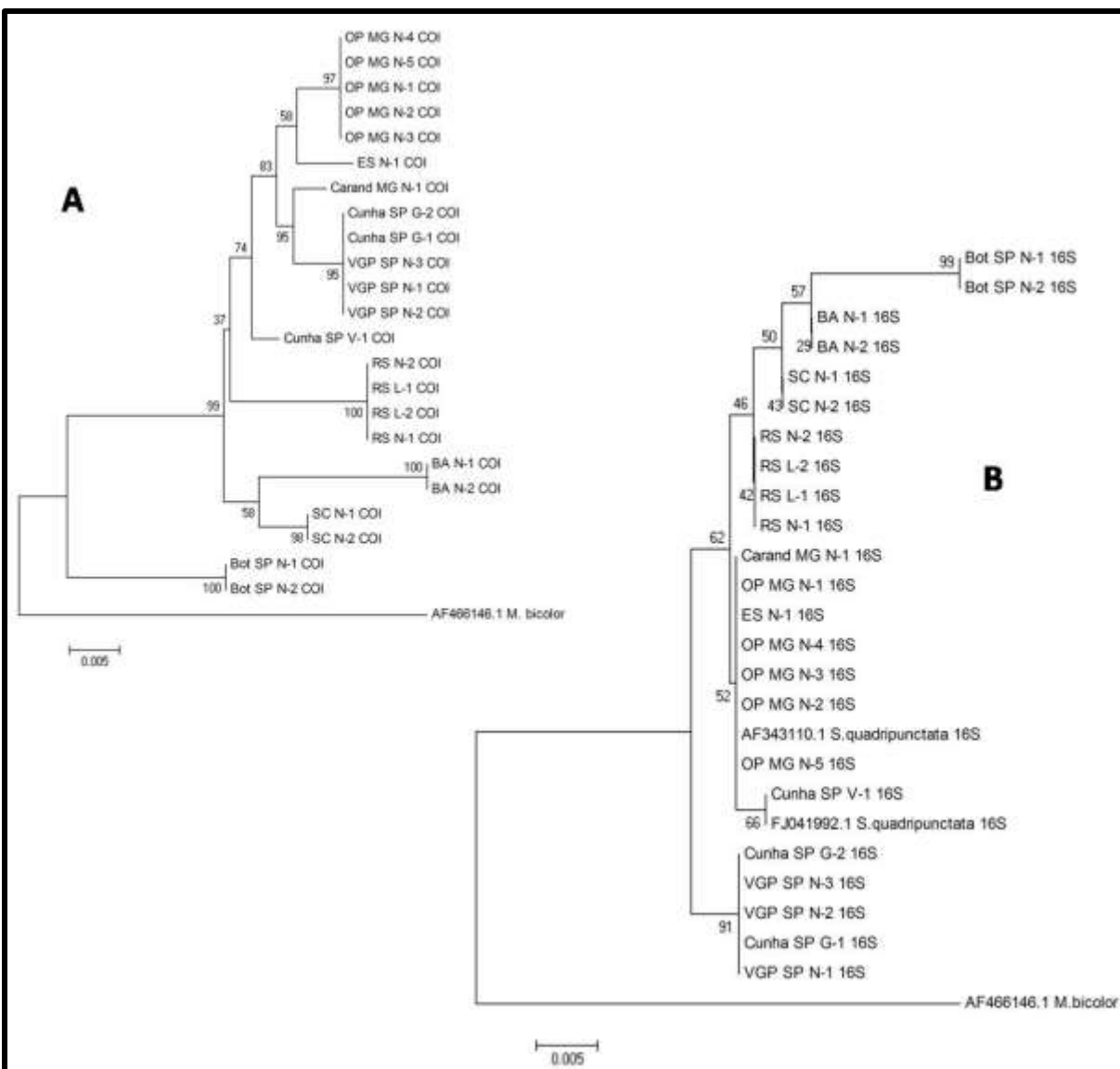


Figura 9: Análise de reconstrução filogenética para as populações de *Schwarziaria*, com a sequência de *M. bicolor* (NCBI: AF466146.1) como grupo externo. **A.** Gene *COI*; **B.** Gene *16S*.

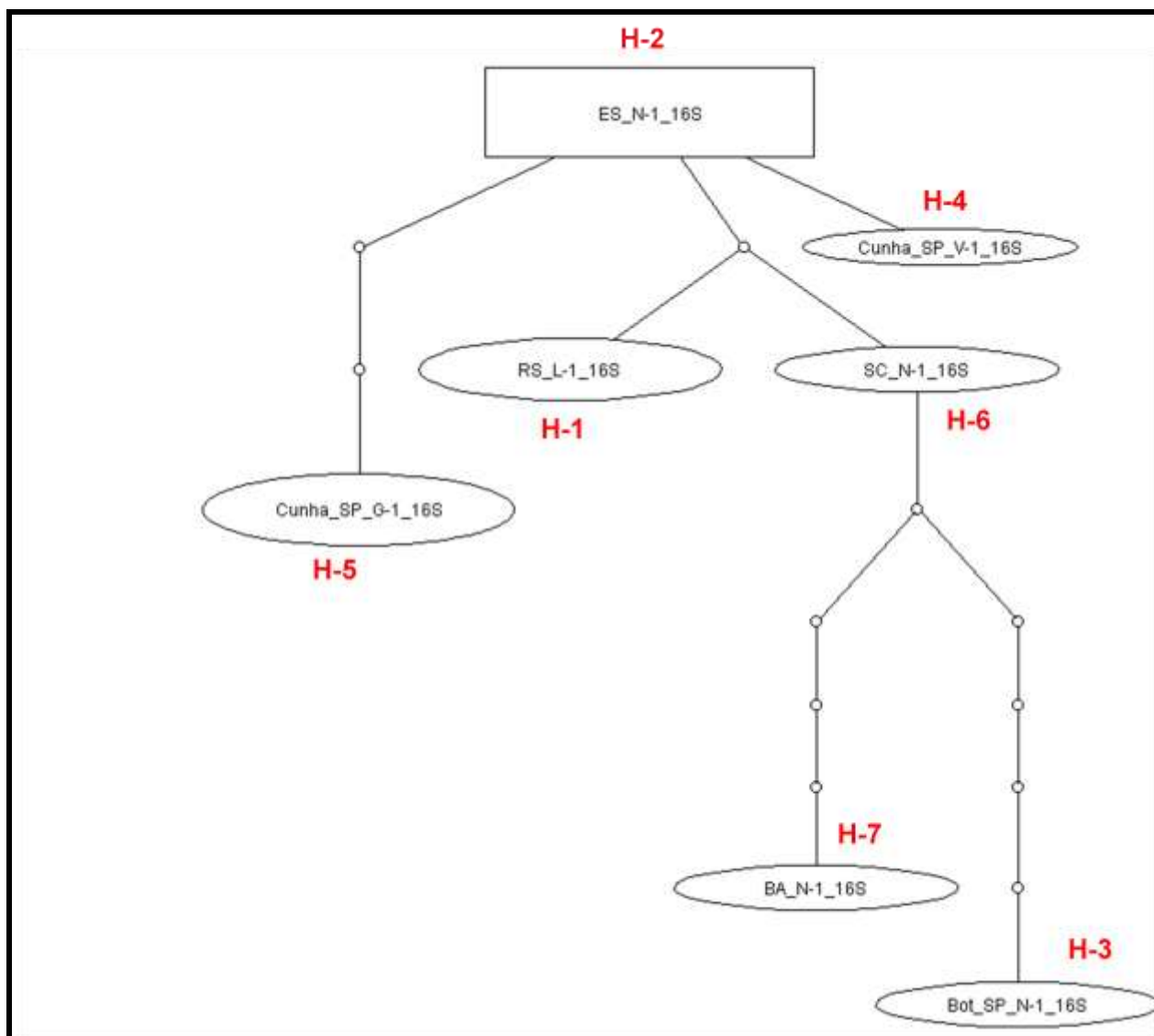


Figura 10: Rede de haplótipos gerada pelo TCS para o gene *16S*. Em vermelho temos os respectivos haplótipos.

4.2.c) Genes concatenados

De acordo com Gadagkar et al. (2005) o uso de múltiplos genes é capaz de melhorar significativamente a acurácia de análises filogenéticas. No caso de genes do DNA mitocondrial, onde as sequências são pequenas e a taxa de mutação é bastante reduzida, análises filogenéticas com um único gene podem resultar em árvores filogenéticas extremamente ramificadas

Resultados

internamente. A concatenação dos genes aumenta o número de mudanças evolutivas permitindo assim uma maior acurácia nas inferências, tornando-as mais parcimoniosas.

Desta forma, realizamos uma análise de NJ com os dois genes concatenados. Além de uma nova rede de haplótipos, uma árvore de reconstrução filogenética também foi gerada (Figuras 11 e 12, respectivamente).

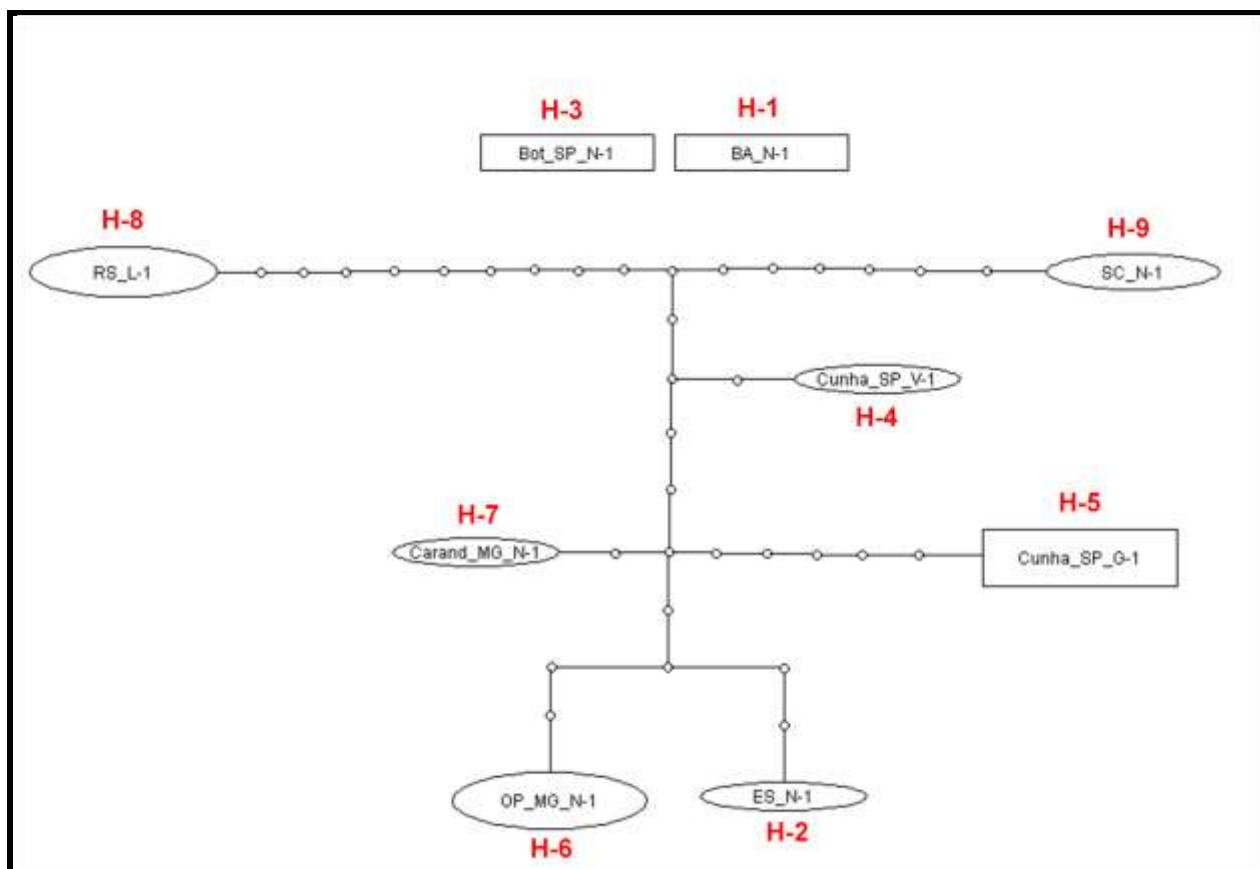


Figura 11: Rede de haplótipos gerada pelo TCS para os dois genes concatenados (*COI* e *16S*). Em vermelho temos os respectivos haplótipos.

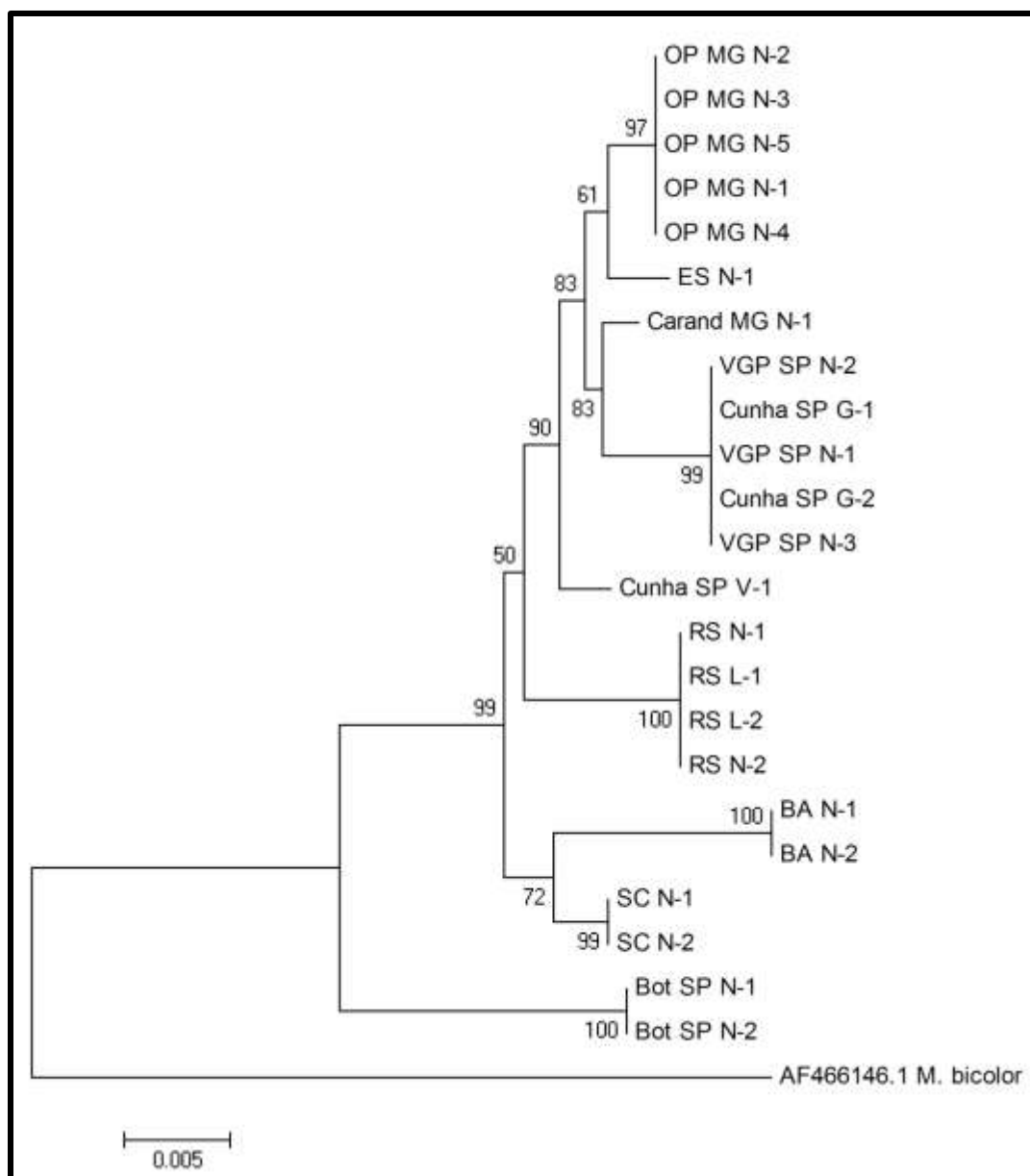


Figura 12: Análise de reconstrução filogenética para as populações de *Schwarzia*, baseado nos dois genes (*COI* e *16S*) concatenados.

4.3 – Análises morfométricas baseadas nos haplótipos gerados pelo sequenciamento do mtDNA

O objetivo do trabalho é integrar duas ferramentas modernas de identificação de abelhas. Para atingir esta meta realizamos novos ensaios morfométricos baseados nos grupos de

Resultados

haplótipos gerados nas análises de mtDNA para os dois genes estudados. Os resultados são apresentados a seguir.

4.3.a)COI

Os ensaios baseados nos espécimes alinhados não atingiram a tolerância mínima para a separação dos grupos. Porém para os *partial warps* obtivemos resultados bastante expressivos. No teste feito por indivíduos, com todos os haplótipos, a PCA nos deu cinco autovalores maiores que 1, o que explicou 60,92% das diferenças entre os grupos. Já a Análise de Discriminantes a porcentagem de correção na identificação dos grupos foi de 84,77% (Wilk's $\lambda = 0,00523$, $P < 0,00001$), enquanto que para o teste com as médias das colônias² (também com *partial warps*) a porcentagem de correção foi de 100% (cinco autovalores maiores que 1, 78,93% da variação entre os grupos) (Tabela XIV, Figura 13).

²Nos testes realizados com as médias das colônias os haplótipos H-4 e H-7 não puderam ser inclusos porque as amostras eram de apenas uma colônia, não sendo possível serem analisadas estatisticamente.

Resultados

Tabela XIV: Matrizes de classificação da análise de Discriminantes para os *partial warps*, tanto por indivíduos quanto por médias das colônias.

Análise por indivíduos		Análise por média das colônias	
GRUPO	% de classif. Correta	GRUPO	% de classif. correta
H-1	85.00	H-1	100.00
H-2	75.00	H-2	100.00
H-3	100.00	H-3	100.00
H-4	100.00	H-5	100.00
H-5	86.11	H-6	100.00
H-6	84.00	H-8	100.00
H-7	90.00	H-9	100.00
H-8	85.71	TOTAL	100.00
H-9	72.41		
TOTAL	84.77		

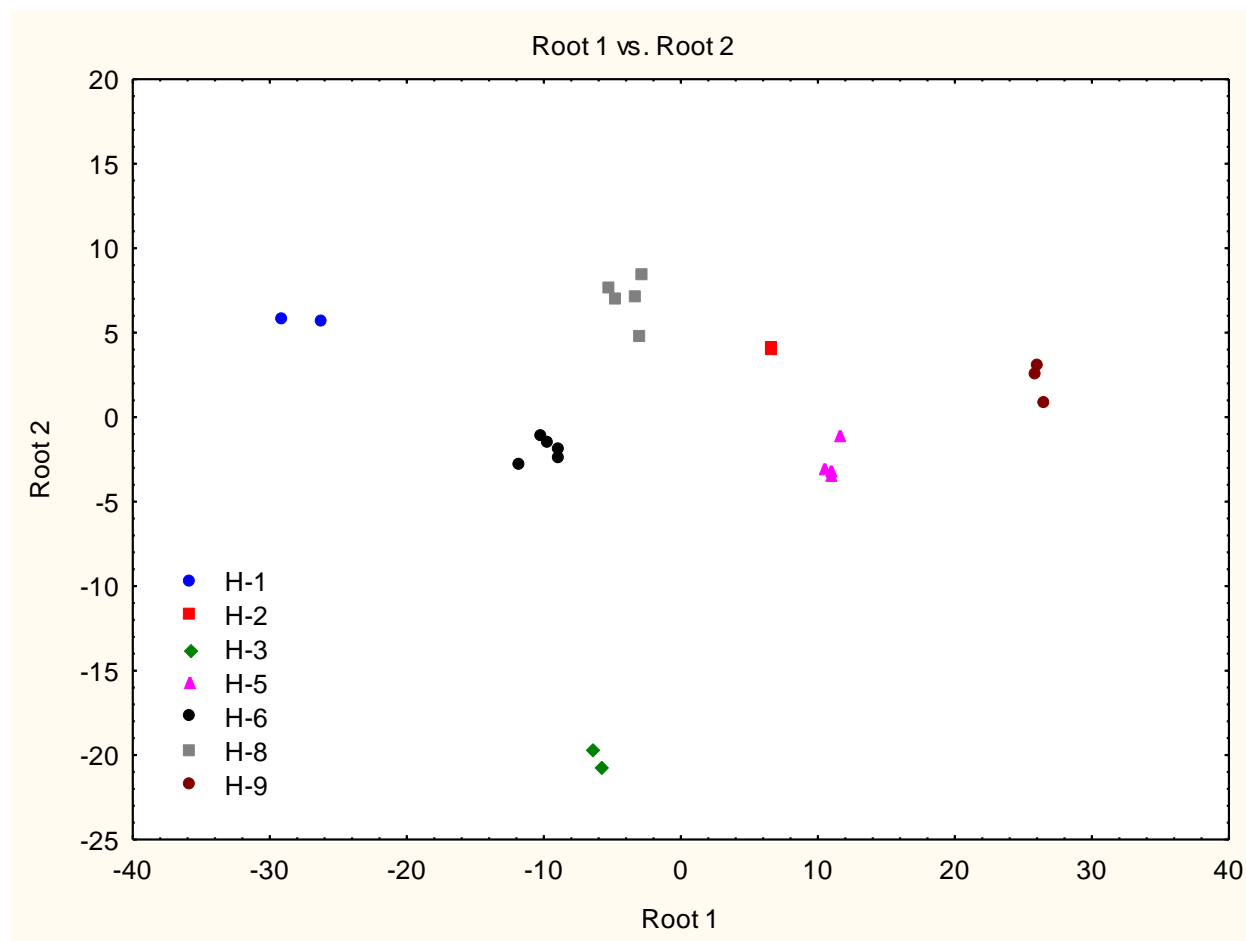


Figura 13: Gráfico da análise de Discriminantes para os haplótipos gerados pelo *COI*, para as médias das colônias (*partial warps*).

4.3.b)16S

Assim como para o *COI*, as análises por espécimes alinhados não atingiram a tolerância mínima para separação dos grupos. Os resultados obtidos foram todos baseados nos *partial warps*. No teste por indivíduos, a PCA também foi semelhante a da análise feita com o *COI*. Já a Análise de Discriminantes a porcentagem de correção na identificação dos grupos foi um pouco menor em relação ao *COI*, atingindo a taxa de 81,48% (Wilk's $\lambda = 0,02107$, $P < 0,00001$) (Tabela XV).

Resultados

Nos testes com as médias das colônias³ a porcentagem de correção na Análise de Discriminantes foi de 100%. A PCA nos deu seis autovalores maiores que 1, explicando 83,18% da variação entre os grupos. Segue abaixo tabela com as distâncias quadradas de Mahalanobis tanto para o ensaio com indivíduos quanto por colônias (Tabela XVI), bem como o gráfico de Discriminantes (Figura 13), todos a partir dos dados gerados pelos *partial warps*.

Tabela XV: Matrizes de classificação da análise de Discriminantes para os *partial warps*, tanto por indivíduos quanto por médias das colônias.

Análise por indivíduos		Análise por média das colônias	
GRUPO	% de classif. correta	GRUPO	% de classif. correta
H-1	81.63	H-1	100.00
H-2	82.50	H-2	100.00
H-3	100.00	H-3	100.00
H-4	100.00	H-5	100.00
H-5	72.22	H-6	100.00
H-6	72.41	H-7	100.00
H-7	80.00	TOTAL	100.00
TOTAL	81.48		

³Para o 16S, o haplótipos H-4 não pôde ser incluso por que a amostra era de apenas uma colônia, não sendo possível ser analisada estatisticamente.

Resultados

Tabela XVI: Distância quadrada de Mahalanobis entre os haplótipos de *I6S*. Acima da diagonal os valores são dados por indivíduos e abaixo da diagonal os valores são dados pelas médias das colônias.

GRUPOS	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7
H-1		8.57	33.99	26.52	11.28	5.53	10.65
H-2	991.24		39.16	17.47	3.81	14.45	7.05
H-3	4392.11	6129.88		60.87968	41.84	28.57	39.66
H-4	*****	*****	*****		19.42	33.49	29.70
H-5	3370.45	881.83	8067.33	*****		16.83	10.08
H-6	21502.64	14502.25	25363.71	*****	8803.72		15.23
H-7	3781.78	7951.32	6979.02	*****	13781.84	42350.5	

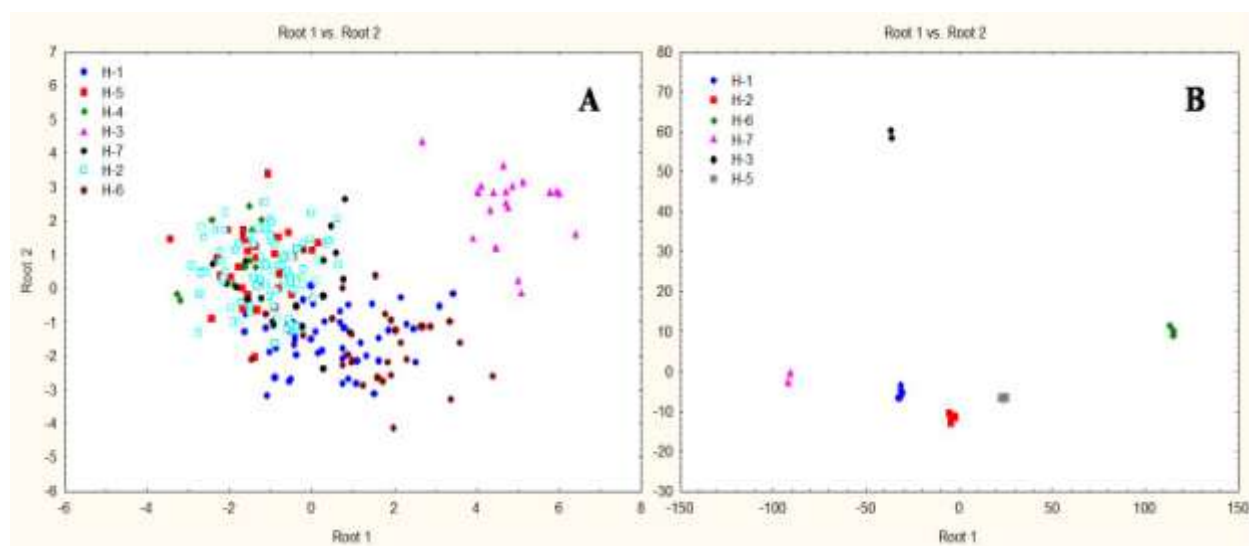


Figura 13: Gráficos de Discriminantes (*partial warps*) para os haplótipos do *I6S*. **A.** Por indivíduos; **B.** Por médias das colônias.

4.4 – Análises de correlação entre as distâncias (testes de Mantel)

Foram feitas três tipos de correlações para cada gene estudado: i- correlação entre as distâncias geográficas e as distâncias moleculares; ii- correlação entre as distâncias morfométricas e as distâncias moleculares e; iii- correlação entre as distâncias geográficas, morfométricas e moleculares. Para isso tivemos que organizar duas novas matrizes compatíveis com os valores gerados pelo Fst par-a-par, uma para as distâncias geográficas entre as localidades (Tabela XVII) e outra com as distâncias de Mahalanobis (Tabela XVIII). Os resultados estão apresentados na Tabela XIX.

Tabela XVII: Distância par-a-par (em km) entre as cidades amostradas e utilizadas nos testes de Mantel.

Localidades	VGP	Cu	OP	Ca	Lu	RS	ES	BA
Vargem Grande Paulista(VGP)	0							
Cunha (Cu)	218.7	0						
Ouro Preto(OP)	509	332.7	0					
Carandaí(Ca)	442.4	265.4	70.6	0				
Luzerna(Lu)	596.2	796.8	1105.3	1037.5	0			
Cambará do Sul(RS)	681.1	843.8	1172.6	1102	244.3	0		
Domingos Martins(ES)	748.3	533.6	296.8	328.1	1335.1	1359.2	0	
Pres. Tancredo Neves(BA)	1382.9	1218.9	883.5	953.9	2056.5	2056.5	778	0

Tabela XVIII: Distâncias de Mahalanobis entre as amostras utilizadas nos testes de Mantel.

Localidades	VGP	Cu	OP	Ca	Lu	RS	ES	BA
Vargem Grande Paulista(VGP)	0							
Cunha (Cu)	9.2	0						
Ouro Preto(OP)	5.7	8.9	0					
Carandaí(Ca)	13.9	7.4	11.1	0				
Luzerna(Lu)	23.7	10.3	14.5	28.9	0			
Cambará do Sul(RS)	15.3	12.5	8.8	17.3	10.3	0		
Domingos Martins(ES)	30.2	27.1	33.9	33	51.7	34.9	0	
Pres. Tancredo Neves(BA)	14.3	14.3	6.6	18	16.6	10.7	32.9	0

Resultados

Tabela XIX: Correlações entre as matrizes das distâncias de Mahalanobis(morfométricas), das distâncias geográficas e das distâncias genéticas (Fst par-a-par) nas populações de *S. quadripunctata*. Em vermelho, correlações significativas ($P \leq 0,05$).

genes	Morfométrico/molecular	Geográfico/molecular	Geográfico/morfométrico/ molecular
16S	0.002817(P=0.522)	0.595589 (P=0.0003)	0.121234(P=0.0003)
COI	0.25587 (P=0.14)	0.363676 (P=0.015)	0.121234(P=0.029)

Das análises acima somente a correlação entre os dados morfométricos e os moleculares não foram significativos. Para os outros vemos uma correlação positiva significativa ($P < 0.05$), inclusive quando avaliamos as três variáveis.

5. Discussão

O uso de novas metodologias a fim de conhecer melhor toda a biodiversidade que existe no planeta ajuda a entender toda a dinâmica dos grupos envolvidos nos estudos (Francisco et al., 2008). No caso deste, e de diversos outros trabalhos, a utilização de dados morfométricos e análises moleculares tem alcançado resultados cada vez mais promissores no sentido de alcançarmos um sistema ideal de identificação automática de espécies.

De acordo com o padrão seguido durante todo este manuscrito, começaremos discutindo os resultados obtidos primeiramente pela morfometria geométrica. Para isso, três pontos principais que procurávamos avaliar com a metodologia vão ser destacados. O primeiro diz respeito à diferenciação entre as duas espécies (*S. quadripunctata* e *S. mourei*) objetos deste estudo. Neste ponto, em todas as análises feitas, sejam elas por indivíduos ou por médias de colônias, por *partial warps* ou pelas coordenadas alinhadas, as amostras de *S. mourei* foram sempre identificadas com 100% de correção (Tabela IV). Considerando-se que até alguns anos atrás, tais espécies eram consideradas uma só, este valor alcançado pela metodologia é considerável.

O segundo ponto a ser avaliado na morfometria diz respeito ao aperfeiçoamento da metodologia. Os diversos testes feitos, com diferentes agrupamentos ou ainda com análises diferentes, por indivíduo ou por colônia, teve o objetivo de avaliar qual a melhor maneira de organizar nossos experimentos. Assim como Franco et al. (2009) avaliaram a diferença entre os sexos de diversas espécies de meliponíneos, a fim de ressaltar a importância da padronização amostral, aqui nós pudemos notar uma maior eficiência na diferenciação entre os grupos quando estes eram analisados através dos dados gerados pelos *partial warps*. Isso levando em consideração que em diversos ensaios com coordenadas alinhadas a tolerância mínima para a

diferenciação entre os grupos não foi alcançada. No entanto, nos ensaios em que ambos testes foram realizados, os resultados eram aproximados.

Ainda com relação à metodologia, outro ponto analisado foi o teste com indivíduos e com colônias. Como esperado, a porcentagem de acerto nas identificações ao utilizarmos as médias de cada colônia ao invés dos dados por indivíduos foi bem maior. Acreditamos que desta maneira erros de classificação ocorridos por causa de alguns espécimes considerados, no mínimo, diferentes podem ser amenizados. Outra inovação foram as análises morfométricas baseadas nos haplótipos gerados pela análises moleculares (item 4.3). Só um exemplo para mostrar estes testes com os haplótipos apontam uma maior acurácia nos testes com as médias das colônias: nos testes realizados pelo haplótipos gerados a partir do sequenciamento do *16S*, enquanto que por indivíduos foi possível identificar 81,5% dos haplótipos dos indivíduos de forma correta, no teste com as médias de cada colônia esta taxa sobe para 100%, e este padrão é acompanhado em todos os testes realizados desta maneira.

Depois de tantos pontos positivos levantados, definitivamente a técnica da morfometria geométrica mostrou-se extremamente apurada. A evolução da metodologia tem sido crescente, enquanto trabalhos anteriores atingiram, por exemplo, taxas de acerto na identificação de 74% em sub-populações de *Nannotrigona testaceicornes* (Mendes et al., 2007), ou mesmo 93,4% para espécies de *Plebeia* (Silva, 2006), nossos ensaios realizados com todas as populações de *Schwarziana*, um grupo com mínimas diferenças entre si, obtiveram 100% de acerto (item 4.1.b). Assim como em outros trabalhos com outras espécies (Haas & Tolley, 1998; Sadeghi et al. 2009), estes resultados mostraram que esta é uma técnica capaz de identificar até mesmo variações intrapopulacionais. Este resultado viabiliza uma das utilidades da técnica, o rastreamento geográfico de populações.

Discussão

Aproveitando a menção a este resultado alcançado pelos testes morfométricos, partimos para a discussão dos resultados moleculares. Isso porque um dos principais objetivos do trabalho foi a análise de populações de *Schwarziana*, e como vimos a morfometria foi capaz de identificar 100% destas populações. Além disso são nestes grupos que focamos toda a análise molecular.

Nesta parte o gene *COI* apresentou um número maior de haplótipos em relação ao *16S*. A razão para isso acontecer deve-se à presença de mais polimorfismos no primeiro, 53 contra 14 do *16S*. Repare que a diferença nos haplótipos fica por parte das amostras do Espírito Santo e de Carandaí /MG, que enquanto apresentam haplótipos separados para o *COI*, no outro gene analisado estes se encontram no mesmo haplótipo das amostras de Ouro Preto/MG, o que consideramos plausível, considerando a amostra e a proximidade destes entre si. Porém quando analisamos as sequencias de aminoácidos (Apêndice C) vemos que apenas três destes sítios geram aminoácidos diferentes, ou seja, não-sinônimos, um na amostra da Bahia e dois na amostra de *S. mourei*.

Alguns pontos das sequencias encontradas nos alinhamentos (Apêndices A e B) chamam a atenção, sendo possível apontar algumas pequenas diferenças. Na região do *16S* as amostras da Bahia apresentam três pares de bases a mais que todas as outras amostras. Pelas nossas amostragens e pela comparação de duas sequencias do mesmo gene da rede (FJ041992.1 e AF343110.1) pode-se afirmar que estas inserções devem ser recentes. Outro exemplo, as amostras de uma colônia de Cunha (Cunha_SP_V-1) se diferenciaram das outras amostras, até mesmo das de mesma localidade, pois apresentava algumas substituições únicas (*COI*: pb 33; *16S*: pb 235). Outras amostras apresentaram pequenas mutações como esta. No gene *COI*, as amostras de Carandaí/MG tiveram substituições de bases nos sítios 126 e 162, diferenciando-se geneticamente até de espécimes próximos a elas, como os de Ouro Preto/MG. Com relação às

diferentes espécies estudadas, é possível perceber que a população de *S. mourei* apresenta a maior taxa de mutações exclusivas (principalmente substituições) entre todas as amostras, tanto no gene *COI* quanto no gene *16S*.

Outra população que apresentou algumas diferenças como as mencionadas anteriormente foi a do Espírito Santo. Fica aparente neste ponto que as duas metodologias apontam algumas similaridades. Comparando as árvores geradas nas análises filogenéticas (Fig. 9 e fig. 12) com as Distâncias quadradas de Mahalanobis (Tab. II e Tab. III) vemos que as amostras de *S. mourei* e a população do ES são bem separadas em relação às populações de *S. quadripunctata*. Podemos ainda notar nestas árvores que estas últimas se encontram bem distantes das amostras de *S. mourei* (Bot SP_N-1 e Bot SP_N-2), fato este corroborado pelas Distâncias geradas nas análises morfométricas. Estes espécimes, juntamente com a espécie nova, apresentam sempre uma maior distância quadrada de Mahalanobis em relação aos outros grupos (Tabela II, III), o que pode ser notado visualmente nas figuras 6 e 7, pelo gráfico de Discriminantes. As sequências obtidas pelo site NCBI foram corretamente posicionadas nas análises por NJ entre as populações de *S. quadripunctata* (Fig. 9).

Algumas amostras evidenciaram a eficácia da análise de mtDNA para estudos relacionados a variabilidade genética intrapopulacional. Os parâmetros F_{st} realizados com as populações de *S. quadripunctata* foram significativos e a AMOVA indicou uma maior variação entre os grupos (estados de origem) do que em qualquer outro nível para os dois genes (Tab. X e Tab. XIII). Isso demonstra estruturação destas populações, já que elas se parecem mais entre si do que em relação aos outros grupos. Encontramos ainda uma correlação positiva nos testes de Mantel entre os três fatores analisados (distâncias geográficas, morfométricas e moleculares) e também entre os dados moleculares e geográficos somente, indicando isolamento por distância.

Discussão

Este pode então ser mais um ponto favorável à metodologia como ferramenta de rastreamento de populações. Um ponto que pode ter impedido uma correlação entre dados morfométricos e moleculares é que estes marcadores estão sob efeitos diferentes no meio ambiente. Outro ponto é que utilizamos os dados por indivíduos, como para as médias algumas amostras ficaram agrupadas, não foi possível correlacionar estas com os dados do F_{st} par-a-par.

6. Conclusão

Conclusão

Este trabalho foi feito a fim de alcançar diversos objetivos. De acordo com cada um destes objetivos e analisando os resultados obtidos é possível fazer algumas considerações finais.

- i. Na busca pelo aperfeiçoamento da morfometria geométrica como ferramenta de identificação automática de espécies, a técnica mostrou resultados excelentes. Mais do que identificar espécies, foi possível, através de apenas uma característica simples como o padrão de venação das asas, identificar corretamente 100% das populações de *Schwarziana*. Esta acurácia em uma análise com amostras que possuem diferenças tão pequenas entre si (variação intrapopulacional), às vezes até imperceptíveis, mostra que a metodologia é bastante promissora. Aliando os dois tipos de análises, a técnica ainda separou 100% dos haplótipos gerados pelo mtDNA. Os dados aqui apresentados permitem ainda atribuímos à técnica novas funções, como por exemplo, o rastreamento geográfico de populações de uma espécie.
- ii. Nas análises de mtDNA, também verificamos que ocorrem diferenças entre as populações. Mesmo pequenas mutações ocorreram entre populações da mesma localidade, como é o caso das amostras de Cunha/SP, por exemplo. A AMOVA demonstrou que a variação entre as populações de *S. quadripunctata* separada por estados de origem são responsáveis pela maior parte da variação genética. Contudo ao analisarmos a rede de haplótipos geradas pelos genes estudados (*COI* e *16S*), não é possível fazer uma relação da origem ancestral do grupo. Neste ponto se faz necessário a busca por amostras mais diversificadas e em maior número para que se possa elucidar alguns pontos que permaneceram obscuros na

Conclusão

análise. Acreditamos que com uma amostra mais fiel à distribuição do gênero em questão possamos esclarecer estes pontos parcimoniosamente.

- iii. As diferenças exibidas nas duas técnicas aplicadas entre as duas espécies aqui estudadas, *S. quadripunctata* e *S. mourei*, corroboram a separação destas. Mais do que isso, alguns resultados ainda nos fazem acreditar que a variação dentro do gênero pode ser mesmo maior do que vem sendo apresentada. Há indícios de que a população do Espírito Santo possa ser diferente de qualquer outra população. Novas análises devem ser feitas incluindo mais amostras desta região.
- iv. Os testes de Mantel correlacionaram significativamente as distâncias morfométricas (Distância de Mahalanobis), moleculares e geográficas. Porém isto não ocorreu para os dados morfométricos e moleculares, já que estas características possuem herança distintas entre si. Como esta é a primeira análise que fizemos desta forma, acreditamos que ainda atingiremos correlações mais significativas, principalmente com um maior número amostral.

Das duas metodologias aplicadas em nossa pesquisa, podemos afirmar que ambas apresentaram resultados satisfatórios. A simplicidade e rapidez da morfometria geométrica associada à capacidade sempre inovadora de estudos moleculares fazem delas ferramentas importantíssimas quando o objetivo é facilitar o acesso a biodiversidade.

Sempre que novas técnicas são aplicadas muitas críticas são feitas. Neste caso não é diferente. Os taxonomistas trabalham arduamente na identificação e descrição de novas espécies, porém não são em número suficiente para atender a enorme demanda que decorre da identificação de nossa fauna tão diversa. Com o intuito de dinamizar as identificações de espécies e com o avanço cada dia maior de tecnologias aplicadas à Ciência, acreditamos que

Conclusão

tanto a morfometria geométrica como a análise de mtDNA podem exercer esta função de maneira eficaz.

7. Referências Bibliográficas

Referências bibliográficas

- Arias M.C., Francisco F.O. & Silvestre, D. 2003. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos, **Apoidea Neotropica: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Editora UNESCO, Criciúma.
- Arias M.C., Brito R.M., Francisco F.O., Moretto G., de Oliveira F.F., Silvestre D. & Sheppard W.S. 2006. Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. **Apidologie**, 37: 259-274.
- Aytekin A.M., Terzo M., Rasmont P. & Çagatay N. 2007. Landmark based geometric morphometric analysis of wing shape in *Sibiricobombus* Vogt (Hymenoptera: Apidae: *Bombus* Latreille). **Ann. Soc. Entomol. Fr.**, 43: 95 – 102.
- Bawa K. S., Bullock S.H., Perry D.R., Coville R.E. & Grayum M.H. 1985. Reproductive Biology of Tropical Lowland Rain Forest Trees. II. Pollination Systems. **Am. J. of Bot.**, 72: 346-356.
- Baylac M., Villemant C. & Simbolotti G. 2003. Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. **Biol. J. of Linnean Soc.**, 80: 89-98.
- Bezerra J.M.D., Peruquetti R.C. & Kerr W.E. 2000. Adaptive behavior of *Scotocryptus melitophilus* Reitter (Coleoptera, Leiodidae) to live with its host *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Bras. Zool.**, 17 (1): 199 – 203.
- Bickford D., Lohman D.J., Sodhi N. S., Ng P.K.L., Meier R., Winker K., Ingram K.K. & Das I. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends Ecol. Evol.**, 22(3):148-155.
- Borisenko A.V., Sones J.E. & Hebert P. D. N. 2009. The front-end logistics of DNA barcoding: challenges and prospects. **Mol. Ecol. Res.**, 9(s1): 27-34.
- Camargo J.M.F. 1974. Notas sobre a Morfologia e Biologia de *Plebeia (Schwarziana) quadripunctata quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae: Meliponinae). **Studia Ent.**, 17(1-4): 433-470.
- Cameron S.A, Derr, J.N, Austin A.D, Wooley J.B & Wharton R.A. 1992. The application of nucleotide sequence data to phylogeny of Hymenoptera: a review. **J. of Hym. Res.**, 1: 63-79.
- Carreira V.P., Soto I .M., Fanara J.J. & Hasson E. 2008. A study of wing morphology and fluctuating asymmetry in interspecific hybrids between *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. **Genetica**, 133: 1-11.
- Cauch O., Quezada-Euan J.J.G., Macias-Macias J.O., Reyes-Oregel V., Medina-Peralta S. & Parra-Tabla Z. 2004. Behavior and pollinator efficiency of *Nannotrigona perilampoides* (Hymenoptera: Meliponini) on greenhouse tomatoes (*Lycopersicum esculentum*) in Subtropical México. **Hort. Ent.**, 97(2): 475-481.
- Clement M., Posada D. & Crandall K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Mol. Ecol.**, 9: 1657–1660.
- Corpet F. 1988. MultAlin: Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucl. Acids Res.**, 16(22): 10881-10890.
- Dasmahapatra K.K. & Mallet J. 2006. DNA Barcodes: recent successes and future prospects. **Heredity**. 97: 254–255.
- Dick C.W., Roubik D.W., Gruber K. F. & Bermingham E. 2004. Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. **Mol. Ecol.**, 13: 3775–3785.

Referências bibliográficas

- Dowton M. & Austin A.D. 1994. Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, **91**: 9911-9915.
- Drauschke M., Steinhage V., Pogoda A., Muller S., Francoy T.M., Wittmann D. 2007 Reliable Biometrical Analysis in Biodiversity Information Systems, In: **Proceedings of the 7th International Workshop on Pattern Recognition in Information Systems**, Funchal, Portugal pp. 25-36.
- Excoffier L., Laval G. & Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, **1**: 47-50.
- Francisco F.O., Nunes-Silva P., Francoy T.M., Wittmann D., Imperatriz-Fonseca V.L., Arias, M.C., Morgan E.D. 2008. Morphometrical, biochemical and molecular tools for assessing biodiversity. An example in *Plebeia remota* (Holmberg, 1903)(Apidae, Meliponini), **Ins. Soc.**, **55**: 231-237.
- Francoy T.M., Goncalves L.S., Wittmann D. 2006 Changes in the patterns of wing venation of Africanized honey bees over time. In: **Anais do VII Encontro sobre Abelhas**, p. 173-177.
- Francoy T.M., Silva R.A.O, Nunes-Silva P., Menezes C. & Imperatriz-Fonseca V. 2009. Gender identification of five genera of stingless bees (Apidae, Meliponini) based on wing morphology. **Gen. Mol. Res.**, **8**(1): 207-214.
- Francuski L., Ludoški J., Vujić A. & Milankov V. 2009. Wing Geometric Morphometric Inferences on Species Delimitation and Intraspecific Divergent Units in the *Merodon ruficornis* Group (Diptera, Syrphidae) from the Balkan Peninsula. **Zool. Sci.**, **26**(4): 301-308.
- Gadagkar S.R., Rosenberg M.S. & Kumar S. 2005. Inferring species phylogenies from multiple genes: Concatenated sequence tree versus consensus gene tree. **J. of Exp. Zool**, **304B**: 64–74.
- Haas, H. L. & K. A. Tolley. 1998. Geographic variation of wing morphology in three Eurasian populations of the fruit fly, *Drosophila lummei*. **J. Zool.**, **245**:197–203.
- Hajibabaei M., Singer G.A.C., Hebert P.D.N. & Hickey D.A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Trends in Gen.**, **23**(4): 167-172.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, **41**: 95–98.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L & deWaard J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc. R. Soc. Lond. B**. **270**: 313–321.
- Hebert P.D.N., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H. & Hallwachs W. 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA. **101**:14812-14817.
- Hebert P.D.N., Stoeckle M.Y., Zemplak T.S. & Francis C.M. 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biol.** **02**:1657-1663.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.**, **16**:111-120.
- Klein A.M., Steffan-Dewenter I., Tscharrntke T. 2003. Pollination of *Coffea canephora* in relation to local and regional agroforestry management. **J. of Applied Ecol.**, **40**: 837-845.
- Maeta Y., Tezuka T., Nadano H. & Suzuki K. 1992. Utilization of the Brazilian stingless bee, *Nannotrigona testaceicornis*, as a pollinator of strawberries. **Honeybee Sci.**, **13**: 71-78.

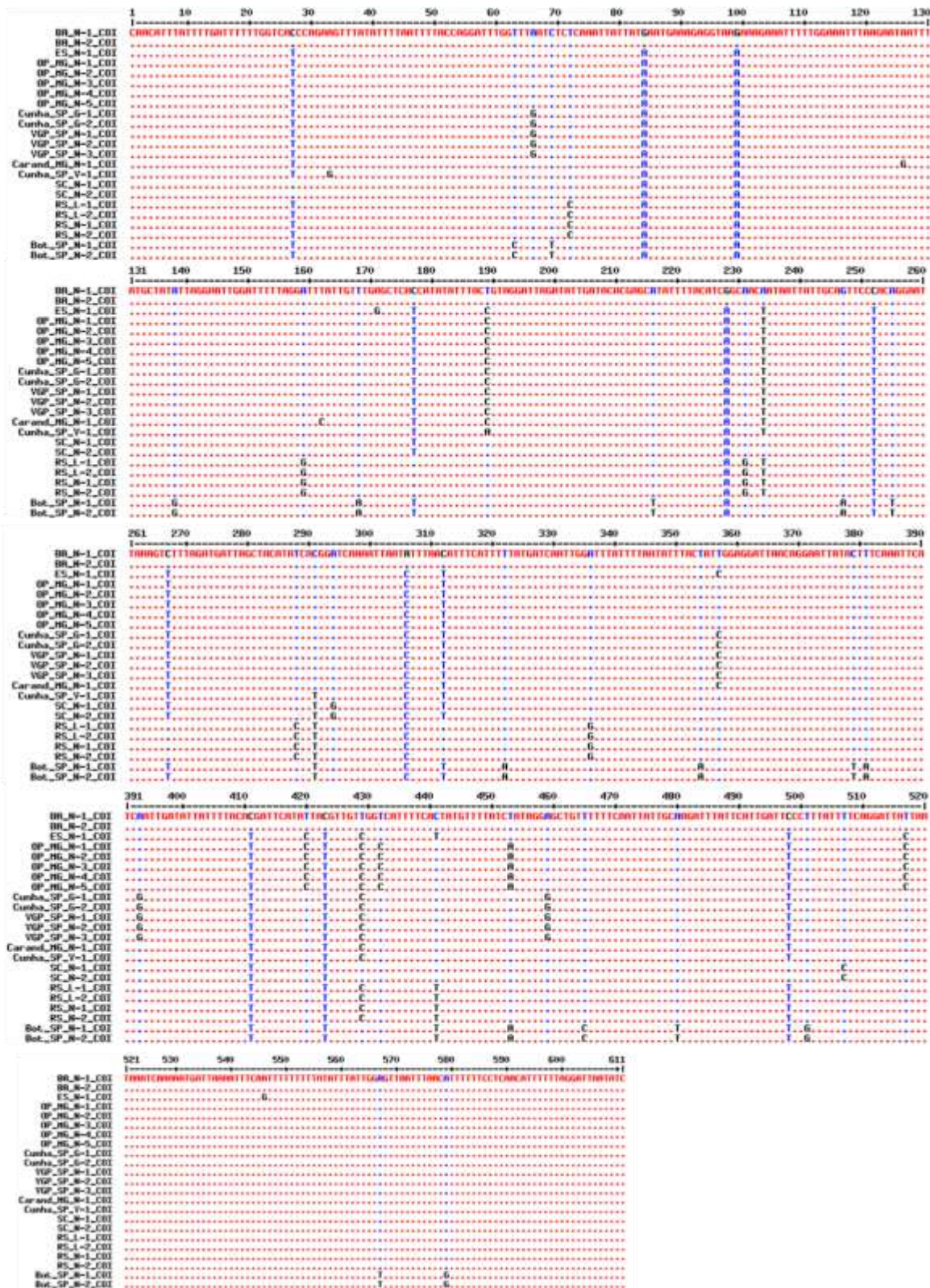
- Malagodi-Braga K.S. & Kleinert A.M.P. 2004. Could *Tetragonisca angustula* Latreille (Apinae, Meliponini) be effective as strawberry pollinator in greenhouses? **Aust. J. of Agric. Res.**, **55**(7): 771-773.
- Melo G.A.R. 2003. Notas sobre meliponíneos neotropicais, com a descrição de três novas espécies (Hymenoptera, Apidae). In: Melo G.A.R. & Alves-dos-Santos I (ed.). *Apoidea Neotropical: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure*. Editora UNESC, Criciúma.
- Mendes M.F.M., Franco T.M., Nunes-Silva P., Menezes C., Imperatriz-Fonseca V.L. 2007. Intra-populational variability of a population of *Nannotrigona testaceicornes* Lepeletier 1836 (Hymenoptera, Meliponini) assessed using relative warps analysis. **Biosci. J.**, Uberlândia, **23**: 147- 152, Supplement 1.
- Milankov V., Vujić A. & Šimić S. 2002. Identifying the species of the *ruficornis* group of the genus *Merodon* Meigen (Diptera: Syrphidae) using morphological and genetic markers. **Stud. Dipterol.**, **9**: 319–326.
- Milankov V., Ludoški J., Ståhls G., Stamenković J. & Vujić A. 2009. High molecular and phenotypic diversity in the *Merodon avidus* complex (Diptera, Syrphidae): cryptic speciation in a diverse insect taxon. **Zool. J. of Linnean Soc.**, **155**: 819–833.
- Moraes D.A. 2003. A morfometria geométrica e a “Revolução na morfometria”: localizando e visualizando mudanças na forma dos organismos. **Bioletim**, ano III, n. 3.
- Moure J.S. 1943. Abelhas de Batatais (Hymenoptera, Apoidea). **Arq. Mus. Paran.**, **3**: 146-147.
- Mozaffarian F., Sarafrazi A. & Nouri G.G. 2007. Host plant-associated population variation in the carob moth *Ectomyelois ceratoniae* in Iran: A geometric morphometric analysis suggests a nutritional basis. **J. of Ins. Sci.**, **7**(02): 11pp.
- Pedro S.R.M. & Camargo J.M.F. 1999. Apoidea Apiformes. In C.R.F. Brandão & E.M. Cancellato (ed.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo**. Brasil. vol. 5: Invertebrados Terrestres. São Paulo, FAPESP. pp. 195-211.
- Quezada-Euán J.J.G. & Hinsull S.M. 1995. Evidence of continued European morphometrics and mtDNA in feral colonies of honeybees (*Apis mellifera*) from the Yucatan peninsula. Mexico. **J. Apic.Res.** **34**: 161–166
- Quezada-Euán J.J.G. 2000. Hybridization between European and Africanized honeybees in tropical Yucatan, Mexico. II. Morphometric, allozymic and mitochondrial DNA variability in feral colonies. **Apidologie**, **31**: 443-453.
- Quezada-Euán J.J.G., Paxton R.J., Palmer K.A., Itzá W.J.M., Tay W.T. & Oldroyd B.P. 2007. Morphological and molecular characters reveal differentiation in a Neotropical social bee, *Melipona beecheii* (Apidae: Meliponini). **Apidologie**, **38**: 247 – 258
- Rozas J., Sanchez-Delbarrio J.C., Messeguer X. & Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, **19**: 2496-2497.
- Rodrigues L.A. & Santos V.F. 2003. Morfometria geométrica – aplicações em paleobiologia de Dinossauros. **Ciências da Terra (UNL)**, Lisboa, n° esp. V, CD-ROM, pp. A141-A145.
- Rohlf F.J. (2005a) tpsDig, version 2.04, Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.
- Rohlf F.J. (2005b) tpsRelw, version 2.04, Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.
- Roubik D. W. 1989. **Ecology and natural history of tropical bees**. Cambridge Tropical Biology Series. Cambridge: Cambridge University Press.

Referências bibliográficas

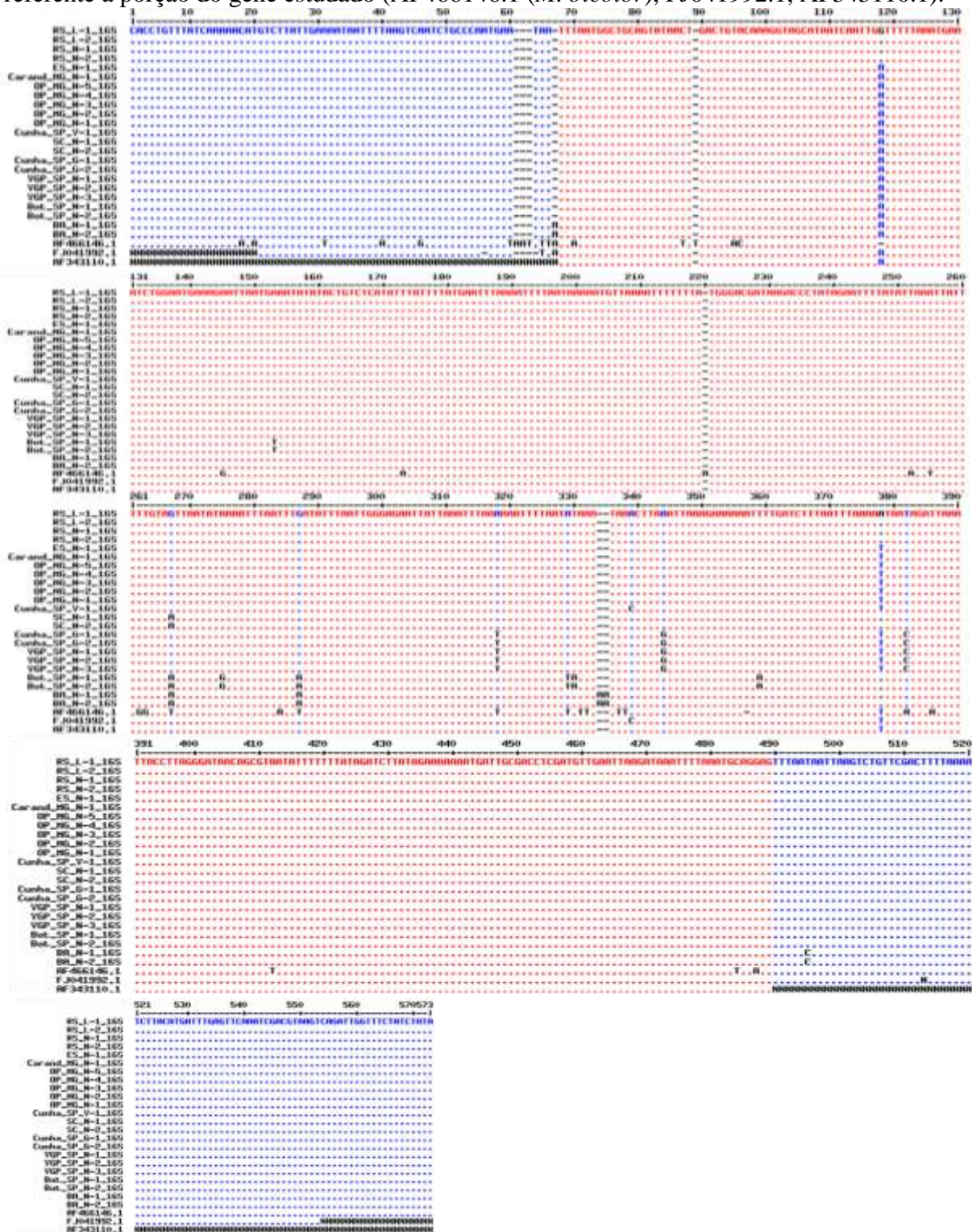
- Sadeghi S., Adriaens D. & Dumont H.J. 2009. Geometric morphometric analysis of wing shape variation in ten European populations of *Calopteryx splendens* (Harris, 1782) (Zygoptera: Odonata). **Odonatologica**, **38**(4): 343-360.
- Schröder S., Drescher W., Steinhage V., Kastenholz B. 1995. An automated method for the identification of bee species (Hymenoptera: Apoidea). In: **Proc. Intern. Symp. on Conserving Europe's Bees**. Int. Bee Research Ass. & Linnean Society, London, UK, 6-7.
- Schwarz F.H. 1948. Stingless bees (Meliponidae) of the western hemisphere. **Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.**, 90: I-XVIII, 1-546.
- Sheppard W.S. & McPherson B.A. 1991. Ribosomal DNA diversity in *Apidae*. In: Smith D. R. (ed.): **Diversity in the genus *Apis***. Boulder: Westview, pp. 89-102.
- Sheppard W.S. & Smith D.R. 2000. Identification of African-derived bees in the Americas: A survey of methods. **Ann. Entomol. Soc. Am.** **93**: 159–176
- Silva, R.A.O. 2006. A morfometria geométrica e a diferenciação de espécies do gênero *Plebeia* (Apidae, Meliponini). Monografia apresentada à FFCLRP. 42p.
- Silveira F. A., Melo G. A. R. & Almeida E. A. B. 2002. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Fundação Araucária, Belo Horizonte, Brasil
- Smith M.A., Woodley N.E., Janzen D. H., Hallwachs W. & Herbert P. D. N. (2006) DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). **Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.** **103**: 3657–3662.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. 2007. *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. and Evol.**, **24**: 1596-1599.
- Villemant C., Simbolotti G. & Kenis M. 2007. Discrimination of *Eubazus* (Hymenoptera, Braconidae) sibling species using geometric morphometrics analysis of wing venation. **Syst. Ent.**, **32**: 625–634.
- Watson A.T., O'Neill M.A. & Kitching I.J. 2003. Automated identification of live moths (Macrolepidoptera) using Digital Automated System (DAISY). **Syst. and Biodiv.**, Cambridge University Press, **1**(3): 287-300.

8. Apêndices

APÊNDICE A – Alinhamento obtido pelo software MultAlin (Corpet, 1988) do sequenciamento do gene *COI*.



APÊNDICE B – Alinhamento obtido pelo software MultAlin (Corpet, 1988) do sequenciamento do gene *I6S*. As três últimas sequencias foram obtidas no site NCBI referente a porção do gene estudado (AF466146.1 (*M. bicolor*), FJ041992.1, AF343110.1).



Sequence logo for the 200203 region. The logo displays nucleotide conservation across 200203 positions. The top sequence is the reference sequence: QHFLWTFQWPEVYLILPVPGLISQIIMSSGKKEIFQALSNLYNNLGTGLFLFYVHHHHFTVGLQDITRVYTSNTHIINPTTGVNYSALNHTHSGALNMSISFLASDGLNFTTGLGLTGLNMS. Below this are 15 other sequences, each with a red line indicating a mismatch from the reference. The sequences are: BR_N-1_COI, BR_N-2_COI, ES_N-1_COI, SC_N-2_COI, SC_N-1_COI, RS_N-2_COI, RS_N-1_COI, RS_L-2_COI, RS_L-1_COI, Corand_NG_N-1_COI, OP_NG_N-5_COI, OP_NG_N-4_COI, OP_NG_N-3_COI, OP_NG_N-2_COI, OP_NG_N-1_COI, VGP_SP_N-3_COI, VGP_SP_N-2_COI, VGP_SP_N-1_COI, Curba_SP_N-2_COI, Curba_SP_N-1_COI, Curba_SP_V-1_COI, Bot_SP_N-1_COI, Bot_SP_N-2_COI, and a gene identifier g11275448401.g118F466. The logo has a color scale from 0 to 1.00. A second sequence logo is shown below the first, for the 200203 region, with a reference sequence: SSGELDHSYTYVYVAVNYVLSMNVVGLISQFIDHPLFLSGALNMGHGLASQFTFHTGVNLTFFPHNLTGLN. It also shows 15 other sequences with red lines indicating mismatches, and the same gene identifier at the bottom.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)