



**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Primer registro de la abeja nativa *Mourella caerulea* para Uruguay
mediante análisis morfológico y molecular

Sofía Palacios

Dra. Ivanna Tomasco

Co-orientadora: Estela Santos

Diciembre, 2019

Facultad de Ciencias, Udelar

Introducción

La polinización es definida como el movimiento de polen de las anteras al estigma de la misma flor u otra de la misma especie, y es necesaria para la mayoría de las plantas que producen semillas (Michener 2000). Para lograr este transporte, que a veces implica distancias muy grandes, las plantas utilizan variados vectores, entre los que se encuentran el viento, el agua, la gravedad, pájaros y murciélagos, aunque la amplia mayoría son polinizadas por los insectos (Goulson 2010). Los polinizadores juegan un rol fundamental en el funcionamiento de los ecosistemas y son claves en el servicio de polinización que necesita el humano para obtener sus alimentos (principalmente la producción agrícola, hortifrutícola y ganadera) (Klein et al. 2007; Rickett et al. 2008).

Actualmente la biodiversidad está decayendo drásticamente, al punto de que un cuarto del total de especies de animales, plantas y hongos conocidas han sido categorizadas por la IUCN (International Union for Conservation of Nature) como amenazadas por su posible extinción (Butchart et al. 2010; Maxwell et al. 2016; IUCN Red List). Para poder entender el ritmo de la pérdida de la biodiversidad, es necesario el estudio de los patrones de cambios de la biodiversidad a lo largo del tiempo y el espacio (Vellend et al. 2017). A su vez, los invertebrados son el grupo más diverso y en particular los insectos los que dominan en tierra, aunque curiosamente este grupo es mucho menos estudiado que los vertebrados (Goulson 2019). Uno de los estudios más extensos fue el realizado por Hallmann et al. (2017), quienes determinaron un descenso en la diversidad de insectos de un 75% en el período 1989-2014 en Malasia, siendo éste uno de los escasos trabajos con esa amplitud temporal.

Las abejas (Hymenoptera: Apoidea) son las principales polinizadoras de la mayoría de los cultivos a nivel mundial (~75%) (Klein et al. 2007), siendo un grupo muy diverso (se han descrito alrededor de 18.000 especies) (Michener 2007). Actualmente sus poblaciones están decayendo drásticamente por muchas causas: la pérdida y fragmentación de hábitat, el cambio climático, introducción de especies exóticas, así como por el uso de agroquímicos en los cultivos (Potts et al. 2010; Allen-Wardell et al. 1998). Los humanos son responsables de una gran parte del problema, al utilizar pesticidas en los cultivos, así como también al introducir colonias comerciales de insectos no nativos con enfermedades (Goulson et al. 2015). Existe hoy una gran preocupación a nivel mundial por esta problemática que afecta a las abejas y su servicio de polinización (Geldmann & González-Varo 2018), y es por esto que resulta de suma importancia investigar este tema en el marco de la crisis de la biodiversidad. Estudios en Uruguay han determinado incluso un porcentaje mayor que lo normal en pérdida de colmenas de abejas melíferas (*Apis mellifera*) entre los años 2009-2010, encontrando como causas principales el mal manejo apícola, así como las condiciones climáticas extremas y los virus asociados a parásitos que se ven favorecidos por estas condiciones climáticas (Antúnez et al. 2013).

La especie de abeja más estudiada a nivel mundial es *A. mellifera*, debido a la gran importancia económica que poseen los productos de su crianza para el ser humano (e.g. miel, polen, jalea real, apitoxina, ceras, propóleos y polinización de cultivos). Esta especie fue introducida en Uruguay en el año 1834 (Cordara 2005). Sin embargo, existen en América varios cientos de especies de abejas nativas que se responsables de mantener la diversidad vegetal del continente (Michener 2000). Estas abejas son responsables en gran parte de polinizar los bosques tropicales del continente, así como también las especies de las áreas

desérticas y los bosques de climas más templados, todos ellos dependientes de los insectos para su reproducción (Michener 2000). Incluso hay varios estudios que demuestran que las abejas nativas tienen una igual o mayor capacidad de polinizar cultivos que *A. mellifera* (Winfree et al. 2007; Rader et al. 2009; Garibaldi et al. 2013; Salvarrey et al. 2017).

Un caso particular de abejas endémicas de Sudamérica y que presentan una importancia notable de polinización, son las abejas de pequeño tamaño de la tribu Meliponini (Hymenoptera: Apidae), comúnmente llamadas “abejas sin aguijón” por tener el aguijón reducido en las hembras (Rasmussen & Cameron 2007). Son abejas eusociales que tienen una alta riqueza de especies en el Neotrópico (Freitas et al. 2009). Para esta región están registradas cerca de 400 especies de estas abejas, lo que representa el 75% del total de los taxones descritos mundialmente (Camargo & Pedro 2007; Álvarez 2016). Las abejas sin aguijón son polinizadores fundamentales de los bosques tropicales (Roubik 1992), y han sido criadas por los humanos desde antes de la llegada de los europeos a América, siendo el más antiguo ejemplo el de la civilización Maya (Álvarez 2016). Han acompañado la cultura de los pueblos, por proveer alimento, propóleos para curación y cera para impermeabilizar cerámicas, desde hace mucho tiempo y por lo tanto tienen un alto valor cultural en toda la región.

Existe un gran desconocimiento científico acerca de las abejas sin aguijón en Uruguay. Si bien no han sido descritas formalmente, se han hecho varios estudios filogenéticos en países vecinos (Galaschi et al. 2018; Álvarez 2016; Werneck 2016; Rasmussen & Cameron 2009; Silveira 2002) y por ende es esperable encontrarlas en nuestro país. Además, los pobladores locales afirman conocerlas e incluso consumir su miel. El conocimiento de estas abejas es fundamental por muchas razones. Están en nuestro territorio desde mucho antes que la abeja melífera (*A. mellifera*), desde el Cretácico inferior según Camargo & Wittmann (1989), por lo que es razonable esperar que guarden una estrecha relación con la flora nativa del Uruguay. Además, por esta misma razón estas abejas tienen una gran importancia cultural para el país, y su estudio permitiría volver a encontrar las raíces de la relación de estas abejas con las poblaciones humanas y con otras especies de animales que se alimentan de la flora nativa.

Conocer la diversidad de la fauna de nuestro país es clave para poder implementar planes de manejo y preservación, así como reducir el impacto y favorecer la proliferación de las especies nativas del Uruguay, no solo de los polinizadores sino también de las plantas con que se relacionan. Para conservar los bosques nativos es imprescindible también conservar las poblaciones de abejas nativas, ya que si ellas desaparecen, una gran proporción de la flora se verá limitada (Michener 2000).

Este trabajo utilizó análisis morfológico y molecular para caracterizar una especie de abeja melipona presente en Uruguay, ya que es la combinación de ambas metodologías lo que permite obtener mayor cantidad de información y más confiable (Hillis 1987). Si bien a lo largo de la historia siempre se han realizado análisis taxonómicos a partir de caracteres morfológicos, las técnicas moleculares brindan confirmación, resolución y apoyo (Scotland et al. 2003). Es por esto que se considera esencial un análisis integrado para trabajos de identificación y sistemática de organismos.

Los objetivos generales de este estudio fueron aportar al conocimiento de la fauna nativa para su conservación, y generar información de base para futuras investigaciones sobre la

diversidad de abejas nativas de la tribu Meliponini en el Uruguay.

Para cumplir con estos objetivos generales, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Colectar muestras de abejas de nidos con características de meliponas
- Describir el ambiente y las características del nido
- Identificar morfológicamente las abejas a partir de claves taxonómicas
- Identificar las abejas mediante herramientas de sistemática molecular
- Relacionar la especie local de abeja con sus especies cercanas mediante herramientas de análisis filogenético

Materiales y Métodos

Colecta y conservación de las muestras

Las muestras a analizar se colectaron manualmente en diferentes puntos del litoral este del país, donde hay reporte oral de pobladores de la zona sobre posibles abejas meliponas (Fig. 1). Se colectaron un total de 6 obreras, de las cuales 2 fueron de un nido en el departamento de Maldonado (-34.568850, -55.085439), 1 de un nido en el departamento de Rocha (-34.3825053, -54.4933653), 1 en vuelo en la localidad de Solís de Mataojo (-34.60117, -55.46377) y 2 en vuelo cerca de la localidad de San Francisco de la Sierra (-34.424794, -55.193039), ambas en el departamento de Lavalleja. Las colectas se realizaron en primavera y verano que coincide con el ritmo de mayor actividad de las abejas por la presencia de mayor diversidad floral en el ambiente. Todos los ejemplares colectados se preservaron en alcohol 95° para su posterior análisis.

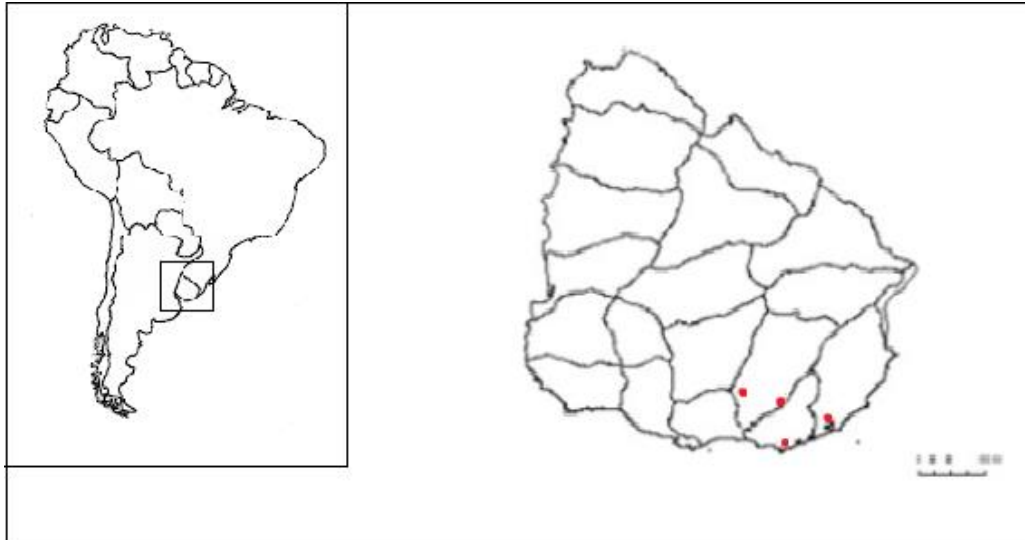


Figura 1. Puntos de colecta de las muestras a analizadas (rojo), en los departamentos de Lavalleja, Maldonado y Rocha.

Descripción del sitio de anidamiento

Se observaron y registraron características topográficas del entorno donde están ubicados los nidos. Se midió el diámetro de la entrada del nido, así como la profundidad aproximada de la misma.

Análisis morfológico

Para la identificación morfológica y clasificación taxonómica se utilizó la clave de identificación de especies de Michener (2000), donde se eligió la clave correspondiente a la región Neotropical. Además, se consultó con especialistas (Dr. Leopoldo Alvarez - Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina; Dra. Juliana Galaschi - Instituto tecnológico VALE, Pará, Brasil, Dra. Favízia Freitas de Oliveira de Universidade Federal da Bahia, Instituto de Biología), ya que no se poseen claves taxonómicas locales ni experiencia en los caracteres taxonómicos importantes a ser observados.

Análisis molecular

Se realizó una extracción de ADN de las muestras utilizando el protocolo de extracción de uso corriente en el laboratorio de Evolución, Facultad de Ciencias (modificado de Miller et al. 1988). Luego se realizó la amplificación del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa 1 (COI) por PCR, ya que es un buen marcador molecular de identificación a nivel de especies, utilizado en el proyecto Barcode of Life Data System para animales en general. En particular, según la identificación morfológica realizada hasta el momento, es el gen del cual más secuencias hay publicadas en la base de datos pública GenBank, de donde se tomaron datos de referencia para comparar. Para amplificar este gen se utilizaron los cebadores Mtd9 (Simon et al. 1994) y BarBeeF (Françoso & Arias 2013). Las condiciones de PCR fueron las mismas que las utilizadas por Galaschi-Teixeira et al. (2018). El fragmento amplificado se visualizó en un gel de agarosa al 1%, con tinción de Gel Red™ y con luz UV. La purificación del producto de PCR y posterior secuenciación por el método Sanger fue realizado por la empresa MacroGen (www.macrogen.com) desde ambos extremos.

Análisis bioinformático

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa ProSeq3 (Filatov 2009), corroborando cada una de las sustituciones nucleotídicas, y verificando la ausencia de inserciones/deleciones que modifiquen el marco de lectura. Luego se alinearon con secuencias descargadas de GenBank de la potencial especie (KY274882.1; KY274873.1; KY274859.1; KY274858.1; KY274853.1; KY274852.1), las que presentaban mayor similitud luego de un Blast con las secuencias de GenBank, y de especies cercanas filogenéticamente (*Tetragonisca weyrauchi* (KC853324.1); *Tetragonisca fiebrigi* (KC853322.1); *Tetragonisca angustula* (KC853323.1); *Frieseomelitta* sp. (MK397275.1); *Lestrimelitta niitkib* (MH917100.1); *Melipona bicolor* (AF370439.1; AF466146.1); *Melipona. scutellaris* (KP202303.1)).

En todos los análisis bioinformáticos se tomó a cada nido como un individuo, ya que debido a la forma de reproducción de los himenópteros (sistema haplodiploide), los organismos de una misma colonia comparten en promedio un 75% de sus genes. Además, el genoma mitocondrial de los animales es de herencia materna, por lo que todos los individuos del mismo nido lo compartirán. En solo un caso (Turuçu) hubo 2 variantes de secuencias dentro de la población, y por ende fueron tomadas ambas secuencias para los análisis. Se tomó como población al conjunto de nidos/individuos de cada región. De esta forma, se trabajó con una muestra de 39 individuos en total.

Para la reconstrucción filogenética se utilizó sólo un representante por haplotipo conocido, tanto de las muestras uruguayas, como las otras de la especie descargadas de GenBank® y de especies cercanas, utilizándose el programa MEGA X (Kumar et al. 2018). Se utilizaron diferentes métodos de reconstrucción con las opciones por defecto del programa, como Máxima Parsimonia (Maximum Parsimony, MP), Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood, ML) con el modelo de sustitución General Time Reversible (GTR) (Nei & Kumar 2000) y distancias (algoritmo Unión de Vecinos (Neighbour Joining, NJ; Saitou & Nei 1987) con la distancia Maximum Composite Likelihood), y se compararon los resultados. En todos los casos, para evaluar el apoyo estadístico de los nodos, se realizaron 1000 pseudoréplicas de Bootstrap.

Con el software Arlequín 3.5 (Excoffier & Lischer 2010) se estimó el F_{ST} entre todos los pares de poblaciones y utilizando distancias genéticas derivadas del F_{ST} , i.e. Slatkin (Slatkin 1995) y Reynolds (Reynolds et al. 1983). También se realizó el análisis estadístico de variación molecular (AMOVA), probando dos agrupamientos entre poblaciones. En un primer caso se consideraron tres grupos, i.e.: Grupo 1: Uruguay + Sur de Brasil; Grupo 2: Viamão; Grupo 3: Alegrete. La otra agrupación fue de todas las poblaciones y Alegrete aparte. La cantidad de localidades, individuos y haplotipos se resume en la tabla 1.

Por último, se realizaron tests de neutralidad, de Fu (Fu 1997) y de Tajima (Tajima 1996), para toda la población en conjunto.

Para evaluar la presencia de un patrón de aislamiento por distancia en la especie, se realizó un test de Mantel (PAST, 9999 permutaciones) para comprobar una posible correlación

significativa entre la matriz de distancias genéticas y las distancias geográficas. Para eso se utilizaron las distancias genéticas estimadas en el programa MEGAX (p-distance) y las distancias geográficas entre poblaciones, estimadas como el punto medio entre los distintos puntos geográficos.

Por último, se construyó una red de haplotipos del tipo Median-Joining (MJ), un algoritmo que permite comparar secuencias que tienen diferentes nucleótidos en una misma posición, con el software Network versión 5.0.1.1 (Fluxus Technology Ltd. 2014).

Tabla 1. Poblaciones utilizadas para los análisis bioinformáticos con las localidades, número de individuos y número de haplotipos incluidos en cada una.

	Población	Localidades incluidas	Nº individuos	Nº haplotipos
1	Uruguay	Solís de Mataojo, S. Francisco de la Sierra, Maldonado, Rocha	6	1
2	Sur de Brasil	Bagé, Candiota, Turuçu	18	4
3	Viamão	Viamão	1	1
4	Alegrete	Alegrete	14	1

Resultados

Descripción del sitio de anidamiento

Todos los puntos donde se colectaron las muestras están incluidos en el bioma Pampa. La topografía del entorno de los nidos en los departamentos de Maldonado y Rocha, así como los del sitio de captura de las obreras, consiste en un paisaje de tipo serrano, con rocas graníticas. Todos los puntos de colecta están incluidos en el sector de Serranías del Este (Chebataroff & Zavala de Alcuri 1975). La entrada del nido mide aproximadamente 5 mm de diámetro y más de 20 cm de profundidad (Fig. 2). En ambos casos los nidos fueron hechos en el suelo. Las zonas donde se colectaron los individuos son relativamente altas para el relieve de la región, variando desde 164 msnm en Maldonado, 178 msnm en Rocha a 227 msnm en Lavalleja. El terreno alrededor de los nidos en ambos casos estaba despejado, sin otra vegetación más que gramíneas. Una imagen del nido se encuentra en la Figura 1 del Anexo: Imagen del nido de Camargo (1989).



Figura 2. Entrada del nido del departamento de Rocha

Análisis morfológico

Siguiendo la clave de Michener (2007) (ver Anexo), se constataron las características morfológicas que permitieron llegar al género *Plebeia*, dentro del cual el autor incluye al género *Mourella*.

Los individuos se observaron bajo lupa binocular de diferentes aumentos y se determinaron las características morfológicas que permitieron identificar las obreras al nivel de especie. El cuerpo de la obrera de esta especie mide aproximadamente 7 mm de longitud (Fig. 3), posee el ala anterior de aproximadamente 4 mm de longitud, extendiéndose más allá del ápex del metasoma, con la celda marginal más ancha que el área submarginal. Poseen 7 hamulis, el estigma con un margen dentro de la celda marginal sutilmente convexo. La tibia posterior de la obrera no es muy ancha, tiene forma de cuchara, y es menos de 3 veces más ancha que el fémur. El margen inferior de la tibia es convexo, el área basal del propodeo no tiene vellos. La superficie interna de esta tibia tiene una zona marginal superior deprimida más superficial (mucho menos que la mitad de ancha que el área con keirottrichias), con keirottrichias extendiéndose casi hasta el margen. Por otro lado, la superficie externa es plana o cóncava distalmente, formando una

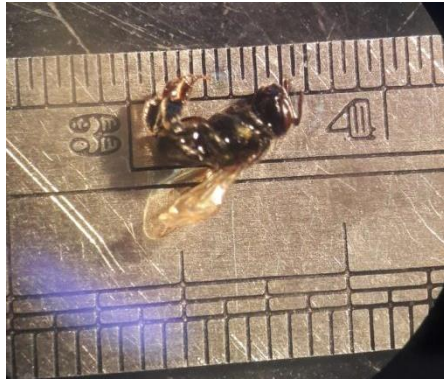


Figura 3. Obrera de *Mourella caerulea*.

corbícula, y el margen inferior poco convexo, no como el margen superior que es todo convexo. Además penicillum presente. El primer segmento flagelar de la antena de la obrera es más corto que el segundo y el tercero juntos. La parte anterior del escutelo no tiene una depresión mediana brillante. Las mandíbulas de la obrera tienen dos dentículos en los márgenes superior y apical. El espacio malar es mucho menos que $1/5$ de largo que el ojo. El margen superior del basitarso del último par de patas es muy convexo en la zona media. Tiene marcas amarillas en el contorno del escutelo y en la cara (Fig. 4 y 5). El escutelo visto lateralmente, grueso y redondeado, no está proyectado como un delgado escudo sobre el metanoto como tienen las *paratrigonas* (Fig. 4).

Entre obreras del nido de Maldonado se encontró un dimorfismo en la coloración del abdomen (anaranjado o negro). Esta diferencia no se encontró en el nido de Rocha.



Figura 4. Escutelo de individuo de *M. caerulea* con marcas amarillas en el contorno.



Figura 5. Cabeza de individuo de *M. caerulea* con marcas amarillas sobre el labro.

Análisis molecular

Del fragmento amplificado se recuperó una secuencia legible de 663 nucleótidos. Todas las muestras uruguayas analizadas presentaron un único haplotipo, diferente de todos los haplotipos previamente reportados de la especie. En general, para la especie se encontraron 26 sitios polimórficos, todos sinónimos, como es esperable para una región codificante de proteína. Los números de cambios en las secuencias de a pares se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Número de cambios de bases nucleotídicas de a pares entre los 7 haplotipos encontrados.

Uruguay	Turuçu a	Turuçu b	Bagé	Candiota	Viamão	Alegrete
Turuçu a	1					
Turuçu b	2	1				
Bagé	4	3	4			
Candiota	4	3	4	6		
Viamão	12	11	12	12	10	
Alegrete	16	15	16	16	14	16

Análisis bioinformático

La reconstrucción filogenética por el método de ML del haplotipo encontrado en relación a los de Brasil se muestra en la Figura 2. Las reconstrucciones por MP y NJ en las figuras 2 y 3 del Anexo. Los diferentes métodos de reconstrucción son concordantes entre ellos al recuperar la monofilia de la especie con un alto valor de Bootstrap (53-76). También hay consenso entre los diferentes métodos al reunir en un grupo monofilético con fuerte apoyo de Bootstrap a los haplotipos del sur de Brasil con el de Uruguay, separándose de Viamão y Alegrete. No se puede afirmar cuál de los dos haplotipos basales (Viamão y Alegrete) es el más próximo al grupo del sur. Tanto por NJ como por ML se encuentra que Turuçu es la población más cercana a la de Uruguay, y la siguiente en cercanía a Bagé. Sin embargo, por MP se encuentra otra organización, donde uno de los haplotipos de Turuçu es el más cercano al de Uruguay y luego Bagé le sigue en cercanía. También se recupera la monofilia de otros géneros como *Melipona* y *Tetragonisca* con valores de Bootstrap altos (99-100; 66-85), respectivamente.

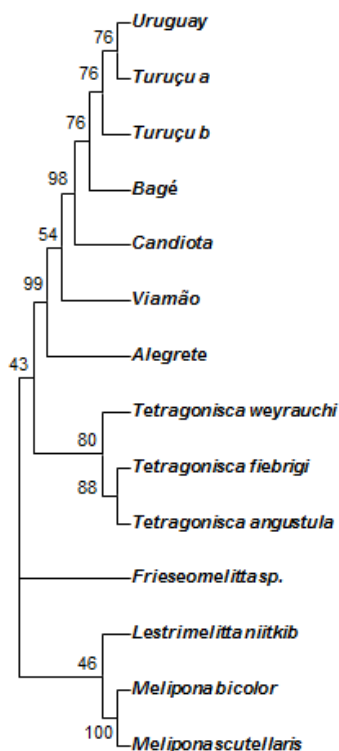


Figura 2. Árbol filogenético con el método Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood) y el modelo de GTR (General Time Reversible) de poblaciones de *M. caerulea* y grupos externos (*T. weyrauchi*; *T. fiebrigi*; *T. angustula*; *Frieseomelitta sp.*; *L. niitkib*; *M. bicolor*; *M. scutellaris*). Los números son los valores del consenso de 1000 pseudoréplicas de bootstrap.

Los análisis de diferenciación poblacional basado en frecuencias de haplotipos muestra que hay diferencias significativas en el conjunto global de las poblaciones (p valor < 0.0001). Cuando las poblaciones se comparan de a pares, se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones de Uruguay con el sur de Brasil (p valor = 0,0004) y con Alegrete, (p valor = 0,00025) así como entre el sur de Brasil y Alegrete (p valor = 0,0001).

El valor de F_{ST} del conjunto de poblaciones fue de 0,67. Los valores de F_{ST} entre pares de poblaciones son altos para la mayoría de los pares de poblaciones ($>0,5$), excepto el par sur de Brasil-Viamão, donde el valor fue menor a 0,5, indicando que estados están más relacionadas entre ellas que los otros pares (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de F_{ST} de a pares de poblaciones. Los asteriscos indican los valores significativos (p valor $< 0,05$).

	Uruguay	Sur de Brasil	Viamão	Alegrete
Uruguay	0			
Sur de Brasil	0.51*	0		
Viamão	1.00	0.32	0	
Alegrete	1.00*	0.63*	1.00	0

En el test AMOVA se diferencian los resultados al hacer los dos tipos de agrupaciones (Tabla 3). Cuando se agrupan todas las poblaciones menos Alegrete (agrupación b) se obtiene un 10% de variación entre grupos, mientras que al organizarlas de a tres grupos el porcentaje es menor, obteniéndose un 7.3% (agrupación a). A su vez, con la agrupación b disminuye el porcentaje de diferenciación entre poblaciones.

Tabla 3. Porcentaje de variación correspondiente a diferentes niveles

	Agrupación a	Agrupación b
Tipo de variación	% de variación	
Entre grupos	7,34	10,01
Entre poblaciones de los grupos	59,41	57,07
Entre poblaciones	33,26	32,92

Los tests de neutralidad no dieron resultados significativos, tanto el de Tajima como el de Fu.

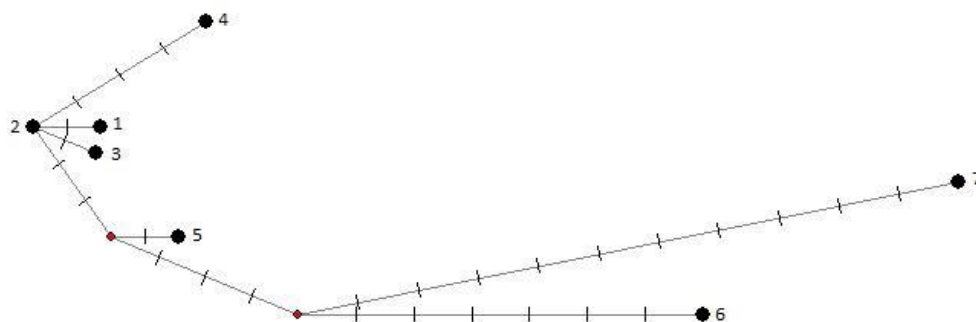


Figura 2. Red de haplotipos. Haplotipos: 1-Uruguay; 2-Turuçu a; 3-Turuçu b; 4-Bagé; 5-Candiota; 6-Viamão; 7-Alegrete. Cada guión indica un cambio nucleotídico en la secuencia.

Al igual que en los resultados anteriores, en la red de haplotipos se observa que los haplotipos presentes en Alegrete y Viamão son los más diferentes al tener más cantidad de cambios en sus secuencias, mientras que las muestras del sur de Brasil y de Uruguay están mucho más relacionadas entre ellas (Fig. 2).

Discusión

En este estudio se buscó aportar conocimiento sobre las abejas nativas del Uruguay, y se encontró una nueva especie para el país. Esto constituye entonces el primer registro formal de *Mourella caerulea* (Friese 1900) para Uruguay.

Se observó la disposición del nido en el suelo, con una entrada sin ornamentación, coincidente con la descripción realizada por Camargo & Wittmann (1989) para la especie *M. caerulea*. A su vez, las características morfológicas que presentan las abejas uruguayas son concordantes con las de esta especie. El dimorfismo en la coloración encontrada no se distinguió en el análisis molecular, donde las secuencias eran idénticas en todos los casos.

A nivel molecular, en todas las reconstrucciones filogenéticas el haplotipo uruguayo quedó incluido en un grupo monofilético con *M. caerulea*, lo que corrobora el estatus monofilético de la especie y la pertenencia de las muestras uruguayas a la misma. Por otro lado, según el árbol filogenético y la red de haplotipos, podría plantearse una invasión en sentido norte-sur, debido a que las muestras del sur de Brasil y de Uruguay están más relacionadas entre ellas, y presentan un ancestro común más recientes.

Al ser animales que construyen nidos bajo tierra, se podría pensar que el territorio nacional de baja altura se colonizó luego de los últimos 5.000 años, ya que en ese momento el nivel del mar era más alto, y por lo tanto la costa este del país estaba cubierta de agua (Cavalotto et al. 2004). Una posibilidad es que hayan colonizado el territorio por la región noreste del país, en territorio de sierras. Para dilucidar ésto sería necesario realizar estudios biogeográficos con un muestreo mucho más denso y utilizando Sistemas de Información Geográficas, donde fuera posible analizar estas opciones superponiendo variables ambientales. Esto, sumado a información paleoclimática y de predicciones sobre cambio

climático, podría estimar la presencia de la especie en el pasado, y las consecuencias de los cambios futuros.

Un factor a tener en cuenta en este último aspecto es la influencia de los humanos sobre el posible transporte de estos animales. Estas abejas anidan en el suelo y por lo tanto no son de uso comercial, descartándose así el transporte antrópico de colmenas (Galaschi et al. 2018). Los análisis moleculares indicarían que las poblaciones están diferenciadas, aunque para confirmarlo hacen falta más puntos de muestreo. Esta diferenciación se podría explicar por la limitada capacidad de dispersión de estas abejas. Ellas tienen un establecimiento muy gradual y progresivo de sus colonias (Nogueira-Neto 1954), que no permite el traslado de grandes distancias por tierra ni a través de agua, ya sea de individuos como de enjambres (Michener 2007). Concordantemente con lo anterior, los resultados muestran un aislamiento por distancia (mayor distancia genética cuanto mayor es la distancia geográfica), lo que sugiere una diferenciación gradual y neutral (diferenciación por deriva genética en equilibrio con el flujo génico). Los test de neutralidad no dieron significativos, lo que es coherente con lo anterior, aunque no se puede afirmar nada por el bajo muestreo. Habría que encontrar más nidos de esta especie para aumentar el número de muestras y así poder sacar más conclusiones al respecto.

El conjunto de los resultados morfológicos y moleculares indican que los ejemplares estudiados pertenecen a la especie *M. caerulea*, siendo la primera vez que se registra esta especie para Uruguay, y constituyendo el reporte más austral de la misma. Este género monoespecífico es utilizado a veces como subgénero del género *Plebeia* (Michener 2007).

Si bien este es el primer registro formal de la especie, algunos pobladores locales afirman conocerla desde su infancia, y relatan una práctica común en la zona de extraer miel de sus nidos subterráneos. También una investigadora de la Facultad de Ciencias, Dra. Gloria Daners, colectó un ejemplar de esta especie en la década del 1990 y fue confirmada por comunicación personal la especie por el Dr. Camargo.

Perspectivas

Es razonable pensar que si en toda la región de los alrededores de Uruguay hay muchas especies de abejas nativas, en nuestro país también las debe haber. El desconocimiento de las mismas se debe a una falta de estudios al respecto, aunque hay algunos investigadores como la Mg. Estela Santos que están actualmente investigando la biodiversidad de abejas nativas.

Por otro lado, combinar claves morfológicas con datos moleculares es una gran herramienta para resolver la sistemática. Trabajos como el de Rasmussen & Cameron (2009) aportan un gran conocimiento sobre este grupo de abejas, pero aún queda mucho por saber. Los datos moleculares, por su parte, permitirían descubrir especies crípticas, relacionar especies muy divergentes morfológicamente, e identificar los patrones de biogeografía histórica, como en este caso. A una mayor escala, también permitirían saber más sobre las especies nativas de Sudamérica, así como las distribuciones reales de las diferentes especies, que aportará información para poner a prueba hipótesis más generales de dispersión de estas abejas como las planteadas por Rasmussen & Cameron (2009).

Aún quedan muchas cosas por saber de estas abejas. Aspectos comportamentales, de preferencias de recursos botánicos donde extraer néctar y polen, estacionalidad, su potencial uso como polinizadoras y como productoras de miel. Es razonable pensar que siendo abejas nativas de la región, tengan una estrecha relación con las plantas nativas, y por lo tanto se podrían estudiar estrategias para conservar y regenerar el monte nativo. También se podría estudiar la relación de estas abejas con los frutales nativos, ya que estudios como el de Michener (1979) recalcan su preferencia por la familia de plantas *Myrtaceae*, dentro de la cual se encuentran algunos frutales nativos de la región.

Otro aspecto importante de las abejas nativas es su relación con los pueblos locales de la región. Las abejas nativas tienen una gran importancia cultural, ya que si bien su relación con los humanos se remonta a la cría (meliponicultura) por parte de los pueblos originarios, se sabe que hoy en día siguen teniendo un gran valor medicinal, cultural y alimenticio entre las personas en muchos países de América (Álvarez 2016). Podría ser muy interesante realizar estudios con enfoques etnobiológicos sobre estas abejas, como el realizado por Zamudio & Hilgert (2012), donde evalúan cómo los conocimientos locales influyen en el conocimiento de las abejas nativas de una región de Misiones, Argentina. Este tipo de estudios que involucran el componente cultural en igual medida que el biológico son claves para resignificar el patrimonio del país, valorizando así la fauna nativa en sus relaciones más íntimas con el humano. Comprender las raíces de este intercambio valoriza el patrimonio biológico del territorio y permite su conservación.

Agradecimientos

Agradezco a mis dos orientadoras para este trabajo, Ivanna Tomasco y Estela Santos, quienes me apoyaron en todo el proceso. También agradezco a los dueños de los establecimientos donde fueron colectadas las abejas, quienes cuidan muy bien de ellas, Eleonore de Wailly, Fons de Muynck, Juan Antía y Mercedes, ya que fueron muy amables en dejarnos entrar en sus hogares y nos recibieron con muy buena predisposición. Al Dr. Leopoldo Álvarez, la Dra. Juliana Galaschi y la Dra. Favízia Freitas de Oliveira por su aporte en la identificación. A Sheena Salvarrey que nos acompañó en algunas salidas de campo y colaboró con información. A los miembros del tribunal, Dres. Ciro Invernizzi y Enrique Morelli por aceptar corregir este trabajo y por sus comentarios que enriquecerán el mismo. A mi familia que me apoyó en todo momento.

Bibliografía

- Allen-Wardell, G.; Bernhardt, P.; Bitner, R.; Burquez, A.; Buchmann, S.; Cane, J.; Inouye, D. (1998). The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conservation biology*, 8-17.

- Alvarez, L. J. (2016). *Diversidad de las abejas nativas de la tribu Meliponini (Hymenoptera, Apidae) en Argentina*. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Naturales y Museo.
- Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campá, J., Martín-Hernández, R.; ...; Zunino, P. (2013). Despoblación de colmenas. *Proyecto FPTA-258 Despoblación de colmenas: determinación de sus causas en Uruguay. Serie FPTA-INIA*.
- Butchart, S. H., Walpole, M., Collen, B., Van Strien, A., Scharlemann, J. P., Almond, R. E.; ...; Carpenter, K. E. (2010). Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science*, 328: 1164-1168.
- Camargo, J. M.; Wittmann, D. (1989). Nest architecture and distribution of the primitive stingless bee, *Mourella caerulea* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae): evidence for the origin of *Plebeia* (s. lat.) on the Gondwana continent. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 24: 213-229.
- Camargo, J. M. F. D.; Pedro, S. R. M. (2007). Meliponini Lepeletier, 1836. *Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region*, 272-578.
- Cavallotto, J.; Violante, R.; Parker, G. (2004), «Sea-level fluctuations during the last 8600 years in the de la Plata river (Argentina)», en *Quaternary International*, 114: 155-165.
- Chebataroff, J.; Zavala de Alcuri, M.E. (1975). Relieve del Uruguay. *Revista Uruguaya de Geografía. Segunda Serie* (3) (1975): 2-47.
- Cordara J. (2005). *La Historia de la Apicultura en Uruguay* (Facultad de Ciencias Agrarias), Universidad de la Empresa. Montevideo Uruguay.
- Filatov, D. A. (2009). Processing and population genetic analysis of multigenic datasets with ProSeq3 software. *Bioinformatics*, 25: 3189-3190.
- Excoffier, L.; Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10: 564-567.
- Françoso, E.; Arias, M. C. (2013). Cytochrome c oxidase I primers for corbiculate bees: DNA barcode and mini- barcode. *Molecular ecology resources*, 13(5), 844-850.
- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.
- Galaschi-Teixeira, J. S.; Falcon, T.; Ferreira-Caliman, M. J.; Witter, S.; Francoy, T. M. (2018). Morphological, chemical, and molecular analyses differentiate populations of subterranean nesting stingless bee *Mourella caerulea* (Apidae: Meliponini). *Apidologie*, 49: 367-377.
- Garibaldi, L. A.; Steffan-Dewenter, I.; Winfree, R.; Aizen, M. A.; Bommarco, R.; Cunningham, S. A.; ...; Bartomeus, I. (2013). Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science*, 339(6127), 1608-1611.
- Geldmann, J.; González-Varo, J. P. (2018). Conserving honey bees does not help wildlife. *Science*, 359(6374), 392-393.
- Goulson, D. (2010). *Bumblebees: behaviour, ecology, and conservation*. Oxford University Press on Demand.
- Goulson, D.; Nicholls E.; Botías C.; Rotheray, E.L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347: 1255957.

- Hallmann, C. A.; Sorg, M.; Jongejans, E.; Siepel, H.; Hofland, N.; Schwan, H.; ...; Goulson, D. (2017). More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PloS one*, 12: e0185809.
- Hillis, D. M. (1987). Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annual review of Ecology and Systematics*, 18: 23-42.
- Klein, A. M.; Vaissiere, B. E.; Cane, J. H.; Steffan-Dewenter, I.; Cunningham, S. A.; Kremen, C.; Tscharntke, T. (2006). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: biological Sciences*, 274: 303-313.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35: 1547-1549.
- Maxwell, S. L.; Fuller, R. A.; Brooks, T. M.; Watson, J. E. (2016). Biodiversity: The ravages of guns, nets and bulldozers. *Nature News*, 536(7615), 143.
- Michener, C. D. (1979). Biogeography of the bees. *Annals of the Missouri botanical Garden*, 277-347.
- Michener, C. D. (2000). *The bees of the world*. JHU press.
- Michener, C. D. (2007). *The Bees of the World*. 2da Edición. Johns Hopkins University Press; Baltimore, MD, 953 pp.
- Miller, S. A.; Dykes, D. D.; Polesky, H. F. R. N. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16:1215.
- Nei M.; Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nogueira-Neto P. (1954). Notas bionomicas sobre Meliponineos. III. Sobre a enxameagem (Hymenoptera, Apoidea). *Arquivos do Museu Nacional*, 42: 419–451.
- Potts, S. G.; Biesmeijer, J. C.; Kremen, C.; Neumann, P.; Schweiger, O.; Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in ecology & evolution*, 25: 345-353.
- Rader, R.; Howlett, B. G.; Cunningham, S. A.; Westcott, D. A.; Newstrom- Lloyd, L. E.; Walker, M. K.; ... ; Edwards, W. (2009). Alternative pollinator taxa are equally efficient but not as effective as the honeybee in a mass flowering crop. *Journal of Applied Ecology*, 46: 1080-1087.
- Rasmussen, C.; Cameron, S. A. (2007). A molecular phylogeny of the Old World stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the non- monophyly of the large genus *Trigona*. *Systematic Entomology*, 32: 26-39.
- Rasmussen, C.; Cameron, S. A. (2009). Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99: 206-232.
- Reynolds, J.; Weir, B. S.; Cockerham, C. C. (1983). Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, 105: 767-779.
- Ricketts, T. H.; Regetz, J.; Steffan- Dewenter, I.; Cunningham, S. A.; Kremen, C.; Bogdanski, A; ...; Morandin, L. A. (2008). Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? *Ecology letters*, 11: 499-515.
- Roubik, D. W. (1992). *Ecology and natural history of tropical bees*. Cambridge University Press.
- Saitou N.; Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

- Salvarrey, S.; Arbulo, N.; Rossi, C.; Santos, E.; Salvarrey, L.; Invernizzi, C. (2017). Utilización de abejorros nativos (*Bombus atratus* Franklin y *Bombus bellicosus* Smith) para mejorar la producción de semillas del trébol rojo (*Trifolium pratense*). *Agrociencia Uruguay*, 21: 95-104.
- Scotland, R. W.; Olmstead, R. G.; Bennett, J. R. (2003). Phylogeny reconstruction: the role of morphology. *Systematic Biology*, 52(4), 539-548.
- Silveira, F. A.; Melo, G. A.; Almeida, E. A. (2002). *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*.
- Simon, C.; Frati, F.; Beckenbach, A.; Crespi, B.; Liu, H.; Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the entomological Society of America*, 87:, 651-701.
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Tajima, F. (1996). The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics*, 143: 1457-1465.
- Vellend, M.; Baeten, L.; Becker-Scarpitta, A.; Boucher-Lalonde, V.; McCune, J. L., Messier, J; ... ; Sax, D. F. (2017). Plant biodiversity change across scales during the Anthropocene. *Annual Review of Plant Biology*, 68.
- Werneck, H.D.A. (2016). Sistemática molecular e evolução do clado Plebeia: análises baseadas em filogenia e datação molecular da tribo Meliponini. *Biologia Celular e Estrutural*, Tesis de Doctorado, Universidade Federal de Vicosa.
- Winfree, R.; Williams, N. M.; Dushoff, J.; Kremen, C. (2007). Native bees provide insurance against ongoing honey bee losses. *Ecology letters*, 10: 1105-1113.
- Zamudio, F.; Hilgert, N. I. (2012). ¿Cómo los conocimientos locales aportan información sobre la riqueza de especies de abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) del norte de Misiones, Argentina?. *Interciencia*, 37: 36-43.

ANEXOS

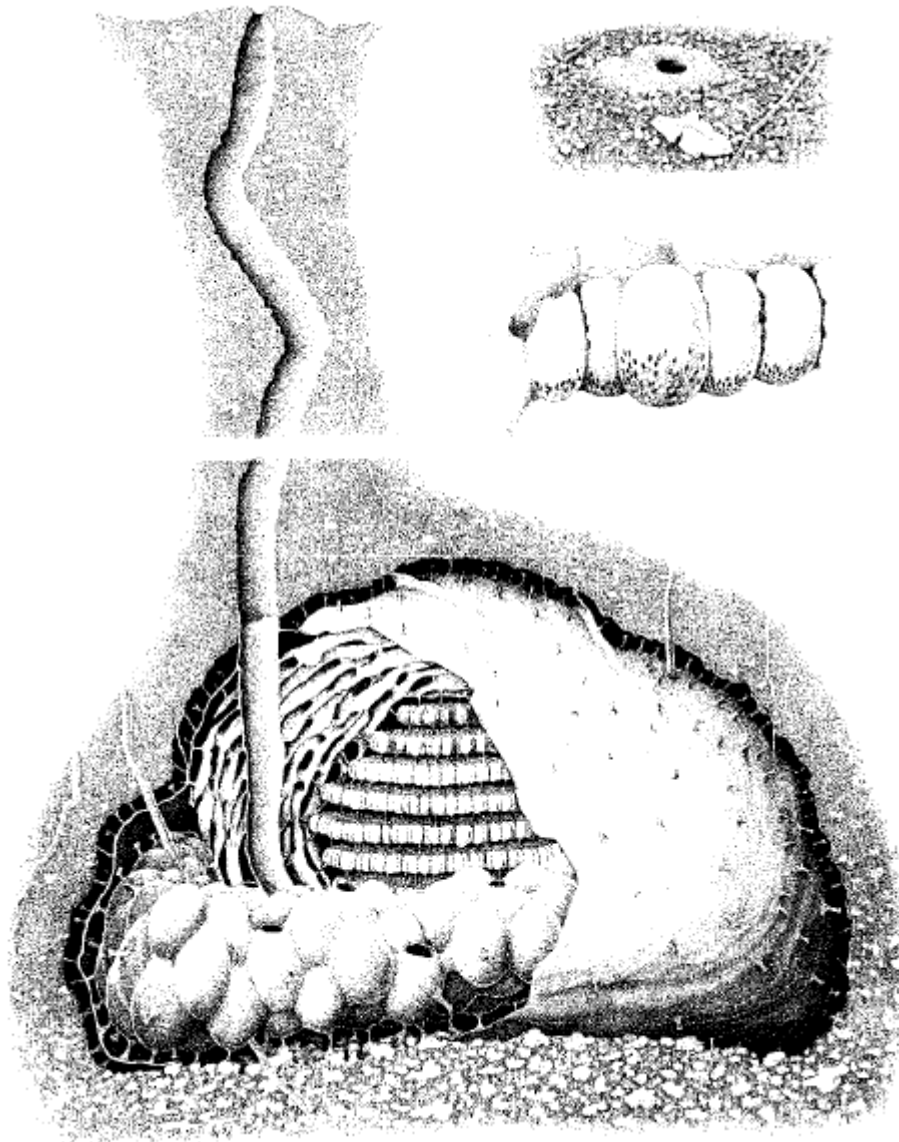


Figura 1. Nido de *Mourella caerulea*. Arriba a la derecha se muestra la entrada del nido y debajo una porción de capullos. A la izquierda se ve el túnel de entrada hecho de cerúmen. El nido está rodeado por varias capas de batúmen y sostenido con varios pilares a las paredes de la cavidad. El involucro rodea los discos con las celdas de cría. Abajo a la izquierda se ven las vasijas de reserva de alimento. La ilustración original pertenece a Camargo & Wittmann (1989).

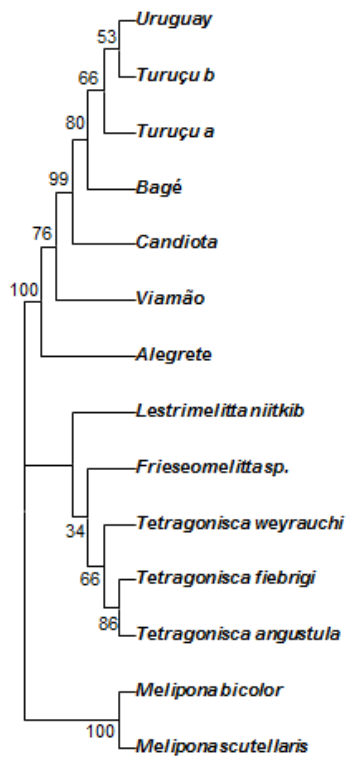


Figura 2. Árbol filogenético construido con el método Unión de Vecinos (NJ) de poblaciones de *M. caerulea* y grupos externos (*T. weyrauchi*; *T. fiebrigi*; *T. angustula*; *Frieseomelitta sp.*; *L. niitkib*; *M. bicolor*; *M. scutellaris*). Los números son los valores de bootstrap apoyados por 1000 réplicas.

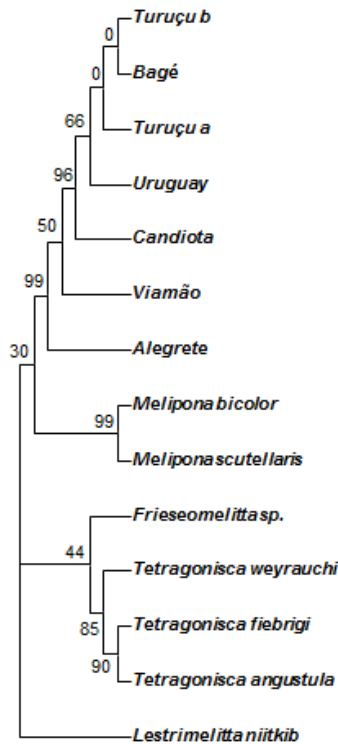


Figura 3. Árbol filogenético construido con el método Máxima Parsimonia (MP) de poblaciones de *M. caerulea* y grupos externos (*T. weyrauchi*; *T. fiebrigi*; *T. angustula*; *Frieseomelitta* sp.; *L. niitkib*; *M. bicolor*; *M. scutellaris*). Los números son los valores de bootstrap apoyados por 1000 réplicas.

Clave para los géneros neotropicales de la Tribu Meliponini, extraído de Michener (2007).

Key to the Neotropical Genera of the Meliponini

- 1. Base of marginal cell broad, basal angle (between stigmal margin and vein r, within marginal cell) slightly acute (not under 68) to right-angular (Fig. 118-1f); marginal cell, at apex of stigma, broader than submarginal cell area; forewing less, usually much less, than 4 mm long *Trigonisca*
- . Base of marginal cell of usual shape, basal angle strongly acute (not over 50) (Fig. 118-1a-e) (except about 80% in *Nogueirapis*); marginal cell, at apex of stigma, little if any broader than submarginal cell area; forewing usually over 4 mm long..... 2
- 2(1). Inner surface of hind tibia with strongly depressed, shining, upper marginal zone, which at least apically is usually about as broad as longitudinal median keirotrichiate ridge, and midway of tibial length is at least half as wide as keirotrichiate ridge (Fig. 118-10a)..... 3
- . Inner surface of hind tibia with depressed upper marginal zone more narrow (much less than half as wide as area with keirotrichia) or absent, keirotrichia extending to or close to margin (Fig. 118-10b) 6
- 3(2). Eyes hairy; rastellum reduced to tapering hairs (Brazil) *Trichotrigona*
- . Eyes bare; rastellum strongly developed 4
- 4(3). Face short and broad, minimum distance between eyes much greater than length of eye; clypeus less than twice as broad as long; malar space almost twice as long as flagellar

diameter; keirotrichiate zone on inner surface of worker hind tibia nearly twice as wide as depressed upper marginal zone at midlength of tibia *Oxytrigona*

— Face of ordinary shape, minimum distance between eyes little more than to less than length of eye; clypeus usually more than twice as broad as long; malar space little over 1.5 times as long as flagellar diameter or usually much less; keirotrichiate zone on inner surface of worker hind tibia usually narrower (Fig. 118-10a), rarely over 1.5 times as wide as depressed upper marginal zone at mid length of tibia 5

5(4). Preoccipital carina strong and shining across full width behind vertex; lower face and genal area shining and coarsely punctate in contrast to dull, densely, minutely punctate upper face, genal area and scutum..... *Cephalotrigona*

— Preoccipital carina absent; lower face and genal area finely sculptured like upper part of head and scutum *Trigona*

6(2). First flagellar segment of worker nearly as long as second plus third taken together, of male nearly as long as second; outer surface of hind tibia convex, without corbicula, lower margin convex like upper margin; penicillum absent; rastellum consisting of tapering hairs *Lestrimelitta*

— First flagellar segment of worker shorter than second plus third taken together, of male much shorter than second; outer surface of hind tibia of worker (and some males) flat or concave at least distally, forming corbicula, lower margin gently convex to concave, unlike largely or wholly convex upper margin (Fig. 118-11); penicillum present (Fig. 118-11); rastellum variable 7

7(6). Hamuli 9-14 (rarely 8); wings extending little if any beyond apex of metasoma; stigma with margin within marginal cell straight or weakly concave (Fig. 118-1a) (body apiform; basal propodeal area dull, hairy)..... *Melipona*

— Hamuli 5-7, rarely up to 9 or even 10; wings long, extending well beyond apex of metasoma; stigma with margin within marginal cell slightly convex (Fig. 118-1b-f) 8

8(7). Anterior part of scutellum with shining, longitudinal V- or U-shaped median depression opening anteriorly into scutoscutellar fossa (Fig. 118-10d); preoccipital carina present, extending far down on each side of head 9

— Anterior part of scutellum without such a shining, median depression (Fig. 118-10c); preoccipital carina absent or with transverse part only, behind vertex and weakly indicated 10

9(8). Head and thorax, or at least scutellum, with extremely coarse, cribriform punctation; posterior margin of scutellum notched or emarginate medially as seen from above; anterior margin of pronotal lobe with strong, transverse carina..... *Nannotrigona*

— Head and thorax with fine punctation; posterior margin of scutellum entire; anterior margin of pronotal lobe rounded *Scaptotrigona*

10(8). Mandible of worker with four apical teeth (lower two sometimes united by translucent septum but teeth still recognizable); scutellum, as seen in lateral view projecting posteriorly as thin shelf over median part of metanotum..... *Paratrigona*

— Mandible of worker with (rarely without) one or two denticles at upper end of apical margin, otherwise without teeth; scutellum, as seen in lateral view, rather thick and rounded, not projecting as thin shelf over metanotum 11

11(10). Hind tibia of worker greatly broadened, spoonshaped (Fig. 118-11b), about three times as wide as femur, outer surface largely occupied by corbicula, lower margin of tibia with distal one-half convex; basal area of propodeum densely hairy *Partamona*

—. Hind tibia of worker not greatly broadened, less than three times as wide as femur (Fig. 10-11), corbicula extending but little if at all basad of middle of tibia, lower margin of tibia convex only in distal one-fourth or less; basal area of propodeum usually hairless 12

12(11). Malar space about one-fifth as long as eye; upper margin of hind basitarsus strongly convex medially; yellow markings absent *Meliwillea*

—. Malar space much less than one-fifth as long as eye; upper margin of hind basitarsus gently convex (Fig. 118- 10b); yellow markings almost always present, at least on face..... 13

13(12). Upper margin of inner surface of hind tibia strongly depressed, shiny, in sharp contrast to keirotrichiate area [except not depressed in apical third of tibia of *Plebeia* (*Scaura*) *timida* (*Silvestri*)]; concave surface of corbicula usually not occupying whole distal half of hind tibia *Plebeia*

—. Upper margin of inner surface of hind tibia not depressed, although shiny and in contrast to keirotrichiate area; concave surface of corbicula occupying full width of distal half of hind tibia *Nogueirapis*