



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

KAREN MAYUMI SUZUKI

**ABORDAGENS GENÉTICAS VOLTADAS PARA O
CONHECIMENTO DE DIFERENTES ASPECTOS DA
BIOLOGIA DE ABELHAS EUGLOSSINI**

Londrina
2013



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agrônomo do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

KAREN MAYUMI SUZUKI

**ABORDAGENS GENÉTICAS VOLTADAS PARA O
CONHECIMENTO DE DIFERENTES ASPECTOS DA
BIOLOGIA DE ABELHAS EUGLOSSINI**

KAREN MAYUMI SUZUKI

**ABORDAGENS GENÉTICAS VOLTADAS PARA O
CONHECIMENTO DE DIFERENTES ASPECTOS DA
BIOLOGIA DE ABELHAS EUGLOSSINI**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Sofia

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação -na-Publicação (CIP)

S968a Suzuki, Karen Mayumi.

Abordagens genéticas voltadas para o conhecimento de diferentes aspectos da biologia de abelhas Euglossini / Karen Mayumi Suzuki– Londrina, 2013. 150 f. : il.

Orientador: Silvia Helena Sofia.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Abelha – Genética – Teses. 2. Abelha – Filogenia – Teses. 3. Sequência de nucleotídeos – Teses. 4. Genética molecular – Teses. I. Sofia, Silvia Helena. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 595.799

KAREN MAYUMI SUZUKI

**ABORDAGENS GENÉTICAS VOLTADAS PARA O CONHECIMENTO
DE DIFERENTES ASPECTOS DA BIOLOGIA DE ABELHAS
EUGLOSSINI**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Sofia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Solange Cristina Augusto
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Arias
Universidade de Sao Paulo – USP

Prof^a. Dr^a. Claudete de Fátima Ruas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 19 de abril de 2013.

A Deus
Ao Jeovane
Aos meus pais Lulica e Shigeyuki
E aos meus amigos dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular e ao Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina.

À minha orientadora, Silvia Helena Sofia, por ter aberto as portas do seu laboratório em 2001, no meu segundo ano de graduação, desde então, agradeço por todos esses anos de convívio, pela paciência, confiança, por ser um exemplo de amor e dedicação nos estudos de abelhas (e mesmo tendo um apreço especial por ecologia deu a oportunidade para que eu fizesse a minha escolha pela área da genética). O meu muito obrigado por ser responsável por grande parte da minha formação profissional e ainda mais por ser um exemplo de luta, mesmo diante das dificuldades, contratempos da vida, sempre se dedicou às pessoas à sua volta, aos seus alunos de graduação e pós-graduação e claro, aos seus pupilos do LAGEA1 e 2.

À querida Fernanda Simões de Almeida, por toda a amizade, por todos os ensinamentos sobre genética, por toda a ajuda em diversos momentos, seja em urgências e dúvidas no laboratório, mas também em momentos que foram necessários incentivo e torcida para que o trabalho desse certo. Um exemplo de profissional, que não desiste dos objetivos mesmo tendo que persistir muitas vezes para que as realizações aconteçam. Um exemplo de mãe, que ama, educa, corrige, encoraja e acolhe. Por ter um coração enorme e um bom humor que contagia.

À professora Leda, por todos os ensinamentos desde a graduação, pelos conselhos, mesmo não estando mais no laboratório no dia a dia, continuou sempre a olhar por nós, torcendo pelos resultados dos trabalhos, mas principalmente torcendo para que sempre fôssemos cada vez melhores como pessoas.

Aos membros da banca examinadora, Dr^a. Solange Cristina Augusto, Dr^a. Maria Cristina Arias, Dr^a. Claudete de Fátima Ruas e Dr. Rogério Fernandes de Souza, pelas valiosas contribuições para este trabalho e por todo o incentivo para que este trabalho fosse o melhor possível.

Aos professores Laurival A. Vilas Boas e Daniele Sartori pelas orientações e correções para a melhoria deste trabalho.

À professora Ana Lucia Dias, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, por toda a paciência, compreensão e atenção dispensada.

À secretária Sueli, pela atenção de sempre e por todos os auxílios prestados.

Aos técnicos do interlaboratório, Dário e Melyssa por toda a disponibilidade.

Aos pesquisadores que tornaram este trabalho possível através da doação de exemplares do gênero *Euglossa*: Solange Cristina Augusto, Celso Feitosa Martins, Gabriel Augusto Rodrigues de Melo, André Nemésio, Isabel Alves-dos-Santos, Aline Mackert dos Santos,

Willian Moura de Aguiar, Guilherme do Carmo Silveira, Rafael Elias da Silva Penha, Samuel Boff, Guaraci Duran Cordeiro e Douglas Caldeira Giangarelli.

À Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro.

Ao amigo Wilson Frantine da Silva, pela ajuda em todos os trabalhos, com formatação de planilhas, gráficos, pela ajuda nos programas computacionais, pelas horas a fio até tarde no lab e pela paciência nas explicações.

Ao pessoal do Laboratório de Genética e Ecologia de Abelhas (LAGEA1) - UEL: Dhiego, Camila, Thiago (Faustinho), Lenice... pela companhia nos almoços (Camila), por toda ajuda nos experimentos (Dhiego e Lenice)... obrigada a todos pela companhia, pelas discussões sobre genética e evolução, pelos conhecimentos compartilhados, pelas risadas...

Ao pessoal do LAGEA2: Douglas, Maria Cecília e Henrique, por toda a ajuda na identificação das Euglossini, nas fotos dos exemplares, em emprestar muitas vezes o material da coleção para a identificação de espécies.

As pessoas que já passaram pelo LAGEA1: Rafael (Caconde), Alessandra, Gabriele (Gabi), Yuldi, por toda a amizade, companheirismo em tantas horas, até na véspera de Natal (Caconde)...

Ao pessoal do Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas – UEL: em especial a Kátia, Luana e Eduardo que sempre estiveram dispostos a ajudar, a colocar as placas no sequenciador, pela ajuda, pela preocupação para que os sequenciamentos sempre dessem certo.

Ao pessoal do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – IAPAR, pelos ensinamentos sobre sequenciamento, pela disponibilidade de sempre e ao professor Felipe por disponibilizar o laboratório e o uso do sequenciador.

Aos amigos da UENP - Cornélio Procópio: Bruno, Viviane e Lindalva, por todo o incentivo, compreensão, ajuda, tanto para minha vida profissional, mas principalmente pela amizade...

Ao meu noivo Jeovane, por toda a paciência (e como foi exigido nisto!!!), por toda compreensão, por todo o carinho, por aguentar o mau humor, por abdicar de muitos passeios, viagens, finais de semana e noites de sono devido aos sequenciamentos e PCRs. Pelas fotos de Euglossini. Pela ajuda em coletas e na formatação e impressão do trabalho. Por tudo o que você representa pra mim, por me fazer uma pessoa melhor, mais feliz, por um amor que ultrapassa até as dificuldades de um doutorado, veja só!!! Por estar disposto a construir uma família comigo (mesmo depois do doutorado)... meu muito obrigado... te amo muito.

Aos meus pais Lulica e Shigueyuki, por todo o incentivo, amor, compreensão, formação pessoal, exemplo de caráter e honestidade, exemplos de perseverança...

As famílias Amorim e Bolotaro que me acolheram profundamente, por todo o carinho, apoio, torcida... Obrigada Sebastião, Aparecida, Mariane, Josi, Paulo e o meu querido Luiz Fernando.

Aos amigos do grupo Frutos da Paz, pela amizade, oração, incentivo, formação...

A Deus, por tudo...

SUZUKI, Karen Mayumi. **Abordagens genéticas voltadas para o conhecimento de diferentes aspectos da biologia de abelhas Euglossini**. 2013. 150 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, 2013.

RESUMO

Euglossa constitui o gênero mais diverso em número de espécies da tribo Euglossini, com mais de 110 espécies reconhecidas. Porém, algumas questões têm sido levantadas em relação às espécies de *Euglossa*. O presente trabalho fez uso de diferentes técnicas moleculares para tentar responder algumas questões genéticas envolvendo as abelhas Euglossini, em destaque: questões taxonômicas e filogenéticas, especialmente as relacionadas a várias espécies de *Euglossa* com ocorrência reconhecida para a Mata Atlântica; e, aspectos ligados à origem de indivíduos ginandromorfos e intersexos. O presente trabalho utilizou o sequenciamento de parte das regiões COI, CytB e 16S rDNA do DNA mitocondrial e região 28S rDNA do DNA nuclear a fim de tentar elucidar o real *status* taxonômico de *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roubiki*. Foi realizada a análise de distância genética segundo o modelo K2P, para a região *barcode* de *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roubiki* bem como análises filogenéticas (máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (ML) e análise bayesiana). Os dados da região *barcode*, do gene CytB e dos genes concatenados foram utilizados para a construção de redes de haplótipos. Os dados concatenados de todos os genes resultaram em 3125 caracteres utilizados nas análises. Os valores baixos (<0,3%) de distância genética (modelo K2P) encontrados entre os indivíduos de *E. iopoecila* e *E. roubiki* e as análises de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e bayesiana, bem como as redes de haplótipos indicam ser estas uma mesma espécie. Igualmente, foi utilizado o sequenciamento de parte das regiões COI, 16S e 28S, para delinear a filogenia de espécies do gênero *Euglossa* da Mata Atlântica e, realizar as análises filogenéticas (MP, ML e análise bayesiana). Os dados concatenados de todos os genes resultaram em 2311 caracteres utilizados nas análises. As árvores filogenéticas encontradas no presente trabalho sustentam os resultados de outros que apontam *Euglossella* como grupo irmão dos outros subgêneros de *Euglossa*; ainda, alguns ramos se mostraram parafiléticos corroborando os resultados de outros trabalhos, que apontam um agrupamento entre *Glossura*, *Glossurella* e *Glossuropoda*. Os resultados obtidos reforçam a necessidade de uma revisão dos subgêneros de *Euglossa*. Para o estudo de um indivíduo ginandromorfo de *Euglossa melanotricha* foram utilizados nove marcadores microssatélites, que indicaram ser este um organismo haploide ou homocigoto para os locos analisados. Em relação ao indivíduo de *E. melanotricha*, os resultados indicam se tratar de um organismo intersexo, pois este possui partes femininas e masculinas (tecidos) e é geneticamente uniforme.

Palavras-chave: Abelhas das orquídeas. *Euglossa*. Sequenciamento. Microssatélite. Filogenia. Ginandromorfismo.

SUZUKI, Karen Mayumi. **Genetic approaches designed to understand different aspects of the biology of Euglossini bees**. 2013. 150 f. Thesis (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, 2013.

ABSTRACT

Euglossa is the most diverse genus in number of species of the tribe Euglossini, with more than 110 species described. However, some questions have been raised regarding *Euglossa* species. Therefore, this study describes different molecular techniques addressed to answer some genetic questions about Euglossini bees, including: taxonomic and phylogenetic aspects involving different *Euglossa* species with recognized occurrence to Atlantic Forest domain; and, aspects potentially related to the genetic of gynandromorph and intersex individuals. We used sequencing of regions of COI and 16S rDNA CytB mitochondrial DNA and 28S rDNA regions of nuclear DNA to elucidate the taxonomic status of *Euglossa iopoecila* and *Euglossa. roubiki*. We performed the analysis of genetic distance according to K2P model for the ‘barcode’ region of *E. iopoecila* and *E. roubiki* and phylogenetic analyzes (maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and Bayesian analysis). Data from the ‘barcode’, CytB gene and genes concatenated were used to construct haplotype networks. The concatenated data of all genes resulted in 3,125 characters used in the analysis. Low values (<0.3%) of genetic distance were identified between individuals of *E. iopoecila* and *E. roubiki* while MP, ML, Bayesian analyses and haplotype networks suggest that they belong to the same species. Also, we used the sequencing of the regions COI, 16S and 28S to perform phylogenetic analysis (MP, ML and Bayesian analysis) of *Euglossa*, including several species from Atlantic Forest biome. The concatenated data of all genes resulted in 2,311 characters used in the analysis. The phylogenetic analyses support the results of other studies that consider *Euglossella* as sister group of the other subgenera of *Euglossa*; also the identification of some paraphyletic branches corroborate the results of other studies, which indicate a group between *Glossura*, *Glossurella* and *Glossuropoda*. The results suggest the need for a more detailed revision of the subgenera of *Euglossa*. Nine microsatellites were used to analyze an anomalous individual of *E. melanotricha*, which revealed to be a homozygous or a hemizygous for all loci analyzed. Our findings indicate that the organism of *E. melanotricha* analyzed is an intersex, since both female and male body parts (tissue) of this individual were genetically uniform.

Keywords: Orchid bees. *Euglossa*. Sequencing. Microsatellite. Phylogeny. Gynandromorphy.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1** - Machos de abelhas Euglossini (Apidae): exemplares de cinco espécies representantes de cinco gêneros. (a) *Aglae caerulea* (Modificado de Ramírez et al. (2010)); (b) *Eulaema cingulata*; (c) *Exaerete smaragdina*; (d) *Eufriesea violacea*; (e) *Euglossa roderici* (Amorim, J.A.) 23
- Figura 2** - Área de distribuição das espécies de *Euglossa* (Apidae, Euglossini) (em verde)..... 24
- Figura 3** - Cladograma bayesiano da tribo Euglossini publicado por Ramírez et al. (2010). Os valores de suporte abaixo dos ramos correspondem aos *bootstraps* gerados via máxima parsimônia; os valores acima dos ramos correspondem às probabilidades posteriores bayesianas..... 31
- Figura 4** - Modelo de determinação sexual de abelhas baseado no sistema CSD (*Complementary sex determination*). Baseado em Beye et al., 2003 34

Capítulo 2

- Figura 1.** Macho de *Euglossa iopoecila* (1) e macho de *Euglossa roubiki* (2). a: visão lateral; b: vista frontal da cabeça; c: mesotibia com área aveludada e coxins basal e distal; d: metatibia com presença de fenda (Fotos: Ferronato, M.C.F.)..... 43
- Figura 2.** Localização dos pontos de coleta de *E. iopoecila* e *E. roubiki* nos estados do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia, Espírito Santo e Alagoas. Os valores entre parênteses indicam o número de indivíduos estudados de cada localidade. [iop - *Euglossa iopoecila*; rou - *Euglossa roubiki*; CN – Cananéia (SP); IB – Ilha Bela (SP); IC – Ilha do Cardoso (SP); SM – Reserva Natural Salto Morato (PR); SU – Ilha de Superagui (PR)]. Em verde estão representados os remanescentes de Mata Atlântica segundo SOS Mata Atlântica: <http://www.sosma.org.br>..... 45
- Figura 3.** Relação entre as taxas de transições (s) e transversões (v) em relação à distância genética (K2P) para o conjunto de dados concatenados (COI, CytB, 16S e 28S) das amostras de *E. iopoecila* e *E. roubiki*..... 51
- Figura 4.** Relação entre as taxas de transições (s) e transversões (v) em relação à distância genética (K2P) nas amostras de *E. iopoecila* e *E. roubiki* para as regiões dos genes: COI (região *barcode*); COI (região posterior ao *barcode*); CytB; subunidade ribossomal 16S; subunidade ribossomal 28S..... 52
- Figura 5.** Árvore gerada por Neighbor-Joining com base nos parâmetros de distância genética K2P (Kimura-2-Parameter) a partir das 665 caracteres da sequência *barcode* do gene COI de 65 amostras de *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roubiki* de diferentes localidades. Os valores de *bootstrap* foram calculados no programa computacional MEGA5.1 com 1000 permutações. [iop - *Euglossa iopoecila*; rou - *Euglossa roubiki*; CN – Cananéia (SP); IB – Ilha Bela (SP); IC – Ilha do Cardoso (SP); SM – Reserva Natural Salto Morato (PR); SU – Ilha de Superagui (PR)]. Sete amostras representando as espécies *Euglossa ignita*, *Euglossa imperialis*, *Euglossa annectans*, *Euglossa pleosticta*, *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem aos valores de *bootstrap*. Foram excluídos valores de *bootstrap* abaixo de 50%..... 58

- Figura 6.** Árvore de máxima parcimônia (MP) de 65 amostras de *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roubiki* de diferentes localidades considerando 3125 caracteres dos genes COI, CytB, 16S e 28S. Os valores de *bootstrap* foram calculados no programa computacional MEGA5.1 com 1000 permutações. [iop - *Euglossa iopoecila*; rou - *Euglossa roubiki*; CN – Cananéia (SP); IB – Ilha Bela (SP); IC – Ilha do Cardoso (SP); SM – Reserva Natural Salto Morato (PR); SS – São Sebastião (SP); SU – Ilha de Superagui (PR); UB – Ubatuba (SP)]. Sete amostras representando as espécies *Euglossa ignita*, *Euglossa imperialis*, *Euglossa annectans*, *Euglossa pleosticta*, *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem aos valores de *bootstrap*. Foram excluídos valores de *bootstrap* abaixo de 50%..... 59
- Figura 7.** Árvore de máxima verossimilhança (ML) de 65 amostras de *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roubiki* de diferentes localidades considerando 3125 caracteres dos genes COI, CytB, 16S e 28S. Os valores de *bootstrap* foram calculados no programa computacional MEGA5.1 com 1000 permutações. [iop - *Euglossa iopoecila*; rou - *Euglossa roubiki*; CN – Cananéia (SP); IB – Ilha Bela (SP); IC – Ilha do Cardoso (SP); SM – Reserva Natural Salto Morato (PR); SS – São Sebastião (SP); SU – Ilha de Superagui (PR); UB – Ubatuba (SP)]. Sete amostras representando as espécies *Euglossa ignita*, *Euglossa imperialis*, *Euglossa annectans*, *Euglossa pleosticta*, *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem aos valores de *bootstrap*. Foram excluídos valores de *bootstrap* abaixo de 50%..... 60
- Figura 8.** Árvore filogenética criada a partir dos dados da análise bayesiana gerados a partir de 3125 caracteres dos genes COI, CytB, 16S e 28S de 65 amostras de *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roubiki* de diferentes localidades usando o programa MrBayes 3.1.2. [iop - *Euglossa iopoecila*; rou - *Euglossa roubiki*; CN – Cananéia (SP); IB – Ilha Bela (SP); IC – Ilha do Cardoso (SP); SM – Reserva Natural Salto Morato (PR); SS – São Sebastião (SP); SU – Ilha de Superagui (PR); UB – Ubatuba (SP)]. Sete amostras representando as espécies *Euglossa ignita*, *Euglossa imperialis*, *Euglossa annectans*, *Euglossa pleosticta*, *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem às probabilidades posteriores, sendo excluídos valores abaixo de 50%..... 61
- Figura 9.** Rede de relacionamento entre os 10 haplótipos gerados pela análise de 665 caracteres da sequência *barcode* do gene COI de 65 amostras de *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roubiki* de 11 localidades. As cores referem-se às localidades. O tamanho dos círculos refere-se à frequência de cada haplótipo. Linhas entre haplótipos indicam apenas um passo mutacional. [iop - *Euglossa iopoecila*; rou - *Euglossa roubiki*; CN – Cananéia (SP); IB – Ilha Bela (SP); IC – Ilha do Cardoso (SP); SM – Reserva Natural Salto Morato (PR); SS – São Sebastião (SP); SU – Ilha de Superagui (PR); UB – Ubatuba (SP)]..... 63

Figura 10.	Rede de relacionamento entre os 22 haplótipos gerados pela análise de 754 caracteres da sequência do gene CytB de 65 amostras de <i>Euglossa iopoecila</i> e <i>Euglossa roubiki</i> de 11 localidades. As cores referem-se às localidades. O tamanho dos círculos refere-se à frequência de cada haplótipo. Linhas entre haplótipos indicam apenas um passo mutacional. Números em vermelho indicam o número de passos mutacionais quando esses são maiores do que um. [iop - <i>Euglossa iopoecila</i> ; rou - <i>Euglossa roubiki</i> ; CN – Cananéia (SP); IB – Ilha Bela (SP); IC – Ilha do Cardoso (SP); SM – Reserva Natural Salto Morato (PR); SS – São Sebastião (SP); SU – Ilha de Superagui (PR); UB – Ubatuba (SP)].....	64
Figura 11.	Rede de relacionamento entre os 49 haplótipos gerados pela análise de 3125 caracteres da sequência dos genes COI, CytB, 16S e 28S de 65 amostras de <i>Euglossa iopoecila</i> e <i>Euglossa roubiki</i> de 11 localidades. As cores referem-se às localidades. O tamanho dos círculos refere-se à frequência de cada haplótipo. Linhas entre haplótipos indicam apenas um passo mutacional. Números em vermelho indicam o número de passos mutacionais quando esses são maiores do que um. [iop - <i>Euglossa iopoecila</i> ; rou - <i>Euglossa roubiki</i> ; CN – Cananéia (SP); IB – Ilha Bela (SP); IC – Ilha do Cardoso (SP); SM – Reserva Natural Salto Morato (PR); SS – São Sebastião (SP); SU – Ilha de Superagui (PR); UB – Ubatuba(SP)].....	65
Capítulo 3		
Figura 1.	Relação entre as taxas de transições (s) e transversões (v) em relação à distância genética para o conjunto de dados concatenados (<i>barcode</i> , COI, 16S e 28S) das amostras de <i>Euglossa</i> analisadas	89
Figura 2.	Relação entre as taxas de transições (s) e transversões (v) em relação à distância genética (K2P) nas amostras de espécies de <i>Euglossa</i> para as regiões dos genes: COI (região <i>barcode</i>); COI (região posterior ao <i>barcode</i>); subunidade ribossomal 16S; subunidade ribossomal 28S.....	89
Figura 3.	Árvore filogenética criada a partir dos dados da análise bayesiana gerados a partir de 665 caracteres da região <i>barcode</i> do gene COI de 108 amostras de 28 espécies de <i>Euglossa</i> usando o programa MrBayes 3.1.2. Três amostras representando as espécies <i>Eulaema cingulata</i> , <i>Eufriesea violacea</i> e <i>Apis mellifera</i> foram usadas como grupo externo. Os números correspondem às probabilidades posteriores, sendo excluídos valores abaixo de 50%.....	91
Figura 4.	Árvores de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML) de 108 amostras de 28 espécies de <i>Euglossa</i> . Análise realizada a partir de 665 caracteres da região <i>barcode</i> do gene COI. Os valores de <i>bootstrap</i> foram calculados no programa computacional MEGA5.1 com 1000 permutações. Três amostras representando as espécies <i>Eulaema cingulata</i> , <i>Eufriesea violacea</i> e <i>Apis mellifera</i> foram usadas como grupo externo. Os números correspondem aos valores de <i>bootstrap</i> . Foram excluídos valores de <i>bootstrap</i> abaixo de 50%	92

Figura 5.	Árvore filogenética criada a partir dos dados da análise bayesiana gerados a partir de 562 caracteres da região posterior ao <i>barcode</i> do gene COI de 108 amostras de 28 espécies de <i>Euglossa</i> usando o programa MrBayes 3.1.2. Três amostras representando as espécies <i>Eulaema cingulata</i> , <i>Eufriesea violacea</i> e <i>Apis mellifera</i> foram usadas como grupo externo. Os números correspondem às probabilidades posteriores, sendo excluídos valores abaixo de 50%.....	93
Figura 6.	Árvores de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML) de 108 amostras de 28 espécies de <i>Euglossa</i> . Análise realizada a partir de 562 caracteres da região posterior ao <i>barcode</i> do gene COI. Os valores de <i>bootstrap</i> foram calculados no programa computacional MEGA5.1 com 1000 permutações. Três amostras representando as espécies <i>Eulaema cingulata</i> , <i>Eufriesea violacea</i> e <i>Apis mellifera</i> foram usadas como grupo externo. Os números correspondem aos valores de <i>bootstrap</i> . Foram excluídos valores de <i>bootstrap</i> abaixo de 50%.....	94
Figura 7.	Árvore filogenética criada a partir dos dados da análise bayesiana gerados a partir de 360 caracteres do gene 16S de 99 amostras de 25 espécies de <i>Euglossa</i> usando o programa MrBayes 3.1.2. Três amostras representando as espécies <i>Eulaema cingulata</i> , <i>Eufriesea violacea</i> e <i>Apis mellifera</i> foram usadas como grupo externo. Os números correspondem às probabilidades posteriores, sendo excluídos valores abaixo de 50%.....	95
Figura 8.	Árvores de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML) de 99 amostras de 25 espécies de <i>Euglossa</i> . Análise realizada a partir de 360 caracteres do gene 16S. Os valores de <i>bootstrap</i> foram calculados no programa computacional MEGA5.1 com 1000 permutações. Três amostras representando as espécies <i>Eulaema cingulata</i> , <i>Eufriesea violacea</i> e <i>Apis mellifera</i> foram usadas como grupo externo. Os números correspondem aos valores de <i>bootstrap</i> . Foram excluídos valores de <i>bootstrap</i> abaixo de 50%.....	96
Figura 9.	Árvore filogenética criada a partir dos dados da análise bayesiana gerados a partir de 817 caracteres do gene 28S de 108 amostras de 28 espécies de <i>Euglossa</i> usando o programa MrBayes 3.1.2. Três amostras representando as espécies <i>Eulaema cingulata</i> , <i>Eufriesea violacea</i> e <i>Apis mellifera</i> foram usadas como grupo externo. Os números correspondem às probabilidades posteriores, sendo excluídos valores abaixo de 50%.....	97
Figura 10 -	Árvores de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML) de 108 amostras de 28 espécies de <i>Euglossa</i> . Análise realizada a partir de 817 caracteres do gene 28S. Os valores de <i>bootstrap</i> foram calculados no programa computacional MEGA5.1 com 1000 permutações. Três amostras representando as espécies <i>Eulaema cingulata</i> , <i>Eufriesea violacea</i> e <i>Apis mellifera</i> foram usadas como grupo externo. Os números correspondem aos valores de <i>bootstrap</i> . Foram excluídos valores de <i>bootstrap</i> abaixo de 50%	98
Figura 11.	Árvore filogenética criada a partir dos dados da análise bayesiana gerados a partir de 2311 caracteres dos genes COI, 16S e 28S de 108 amostras de 28 espécies de <i>Euglossa</i> usando o programa MrBayes 3.1.2. Três amostras representando as espécies <i>Eulaema cingulata</i> , <i>Eufriesea violacea</i> e <i>Apis mellifera</i> foram usadas como grupo externo. Os números correspondem às probabilidades posteriores, sendo excluídos valores abaixo de 50%.....	100

Figura 12.	Árvore de máxima parcimônia (MP) de 108 amostras de 28 espécies de <i>Euglossa</i> . Análise realizada a partir de 2311 caracteres dos genes COI, 16S e 28S. Os valores de <i>bootstrap</i> foram calculados no programa computacional MEGA5.1 com 1000 permutações. Três amostras representando as espécies <i>Eulaema cingulata</i> , <i>Eufriesea violacea</i> e <i>Apis mellifera</i> foram usadas como grupo externo. Os números correspondem aos valores de <i>bootstrap</i> . Foram excluídos valores de <i>bootstrap</i> abaixo de 50%.....	101
Figura 13.	Árvore de máxima verossimilhança (ML) de 108 amostras de 28 espécies de <i>Euglossa</i> . Análise realizada a partir de 2311 caracteres dos genes COI, 16S e 28S. Os valores de <i>bootstrap</i> foram calculados no programa computacional MEGA5.1 com 1000 permutações. Três amostras representando as espécies <i>Eulaema cingulata</i> , <i>Eufriesea violacea</i> e <i>Apis mellifera</i> foram usadas como grupo externo. Os números correspondem aos valores de <i>bootstrap</i> . Foram excluídos valores de <i>bootstrap</i> abaixo de 50%.....	102

Capítulo 4

Figure 1.	Individual of <i>Euglossa melanotricha</i> with male and female phenotypic characteristics. a: side view (right), b: side view (left), c: front view of the head; d: scutellum with a scutellar tuft (as observed in the female of this species), e: view of the abdomen showing the sting; f: ventral view of the sting; g: dorsal view, h: metatibia (left) with the presence of slit, i: metatibia (right) with Corbicula; j: mesotibia (left) with velvety area and basal and distal cushions; k: mesotibia (right side)	121
------------------	--	-----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela I.	Número de machos de <i>Euglossa iopoecila</i> e <i>Euglossa roubiki</i> amostrados por localidade	44
Tabela II.	Tamanho dos fragmentos amplificados por PCR e número de caracteres analisados após alinhamento e correção das sequências das regiões dos genes COI, CytB, 16S e 28S das amostras de <i>E. iopoecila</i> e <i>E. roubiki</i>	51
Tabela III.	Média de distância genética K2P entre espécies, de acordo com 3125 caracteres dos genes COI, CytB, 16S e 28S. Diagonal inferior: médias; diagonal superior: desvio padrão (s)	53
Tabela IV.	Média de distância genética K2P entre espécies analisando 665 caracteres do gene COI região <i>barcode</i> . Diagonal inferior: médias; diagonal superior: desvio padrão (s).....	54
Tabela V.	Média de distância genética K2P entre espécies analisando 562 caracteres do gene COI região posterior ao <i>barcode</i> . Diagonal inferior: médias; diagonal superior: desvio padrão (s).....	55
Tabela VI.	Média de distância genética K2P entre espécies analisando 754 caracteres do gene CytB. Diagonal inferior: médias; diagonal superior: desvio padrão (s)	55
Tabela VII.	Média de distância genética K2P entre espécies analisando 360 caracteres do gene 16S. Diagonal inferior: médias; diagonal superior: desvio padrão (s).....	56
Tabela VIII.	Média de distância genética K2P entre espécies analisando 817 caracteres do gene 28S. Diagonal inferior: médias; diagonal superior: desvio padrão (s).....	57

Capítulo 3

Tabela I.	Amostras de 28 espécies de <i>Euglossa</i> com indicação dos subgêneros, grupos e locais de coleta.....	83
Tabela II.	Tamanho dos fragmentos amplificados por PCR e número de caracteres analisados após alinhamento e correção das sequências de parte das regiões dos genes COI, CytB, 16S e 28S das amostras das espécies de <i>Euglossa</i>	88

Capítulo 4

Table I.	Alleles found at the nine loci of analyzed microsatellites for leg samples (left/male and right/female) of the anomalous individual of <i>Euglossa melanotricha</i> , showing the phenotypes of both sexes, and for the samples (legs) of the two males (M1 and M2) and two females (F1 and F2) of this species exhibiting normal phenotypes, which were used in comparative analyses	122
-----------------	---	-----

SUMÁRIO

Capítulo 1	17
INTRODUÇÃO	17
QUESTÕES TAXONÔMICAS E FILOGENÉTICAS ENVOLVENDO AS ABELHAS EUGLOSSINI	22
ANÁLISES GENÉTICAS X INDIVÍDUOS GINANDROMORFOS DE EUGLOSSINI	32
OBJETIVOS	36
OBJETIVO GERAL	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
Capítulo 2	37
Análise molecular aplicada à investigação do status taxonômico de <i>Euglossa iopoecila</i> e <i>Euglossa roubiki</i> (Hymenoptera, Apidae, Euglossini)	37
Resumo	38
INTRODUÇÃO	39
MATERIAIS E MÉTODOS	42
RESULTADOS	50
DISCUSSÃO	66
REFERÊNCIAS	72
Capítulo 3	77
Filogenia de espécies de <i>Euglossa</i> (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) pertencentes à Mata Atlântica	77
Resumo	78
INTRODUÇÃO	79
MATERIAIS E MÉTODOS	81
RESULTADOS	87
DISCUSSÃO	103
REFERÊNCIAS	109
Capítulo 4	113
An orchid bee showing both female and male morphological features: a gynandromorph or intersex individual?	113
Abstract	114

INTRODUCTION	115
MATERIAL AND METHODS	118
RESULTS	120
DISCUSSION/CONCLUSION	123
REFERENCES	128
CONCLUSÕES	132
REFERÊNCIAS	133
APÊNDICES	146

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A ordem Hymenoptera, que compreende as abelhas, vespas e formigas (BROTHERS, 1999; RABELING; KRONAUER, 2013) é a quarta maior, dentro da classe de insetos, em número de espécies descritas (125.000 espécies), após Coleoptera, Lepidoptera e Diptera (GRIMALDI; ENGEL, 2005; FLOYD et al., 2009).

Em relação às abelhas, estas são importantes componentes dos ecossistemas terrestres, principalmente em relação ao seu papel de polinizadores (GRIMALDI; ENGEL, 2005; ZAYED, 2009).

Apesar do papel fundamental das abelhas para o desenvolvimento e manutenção de ecossistemas, bem como na importância destes polinizadores para a agricultura, vários autores têm relatado a ocorrência de um declínio nas populações de abelhas (KREMEN; RICKETS, 2000; BYRNE; FITZPATRICK, 2009; ZAYED, 2009). Alguns fatores têm sido propostos para explicar este declínio, como perda e fragmentação de habitats, uso excessivo de pesticidas, espécies invasoras as quais competem com espécies nativas e ainda mudanças climáticas locais (KREMEN; RICKETS, 2000; ZAYED, 2009). Estes fatores prejudicariam não só a preservação das populações de abelhas, bem como das espécies vegetais relacionadas a elas o que reforça a necessidade de medidas de conservação destes importantes polinizadores.

Porém, o sucesso nos esforços em ecologia e conservação depende do conhecimento do *status* taxonômico das espécies a serem preservadas (FRANKHAM et al., 2002; WHEELER, 2009), o fato das espécies não serem conhecidas ou não serem corretamente identificadas (como por exemplo populações de espécies crípticas) dificulta a

compreensão e a conservação destes organismos (FRANKHAM et al., 2002; WHEELER, 2009; ZAYED, 2009).

Cerca de 20.000 espécies de abelhas já foram descritas (GRIMALDI; ENGEL, 2005; ZAYED, 2009), porém é provável que existam muitas espécies a serem descobertas e catalogadas (MICHENER, 2000).

As abelhas das orquídeas, pertencente à família Apidae, subfamília Apinae, tribo Euglossini, formam um grupo com pouco mais de 200 espécies, (MICHENER, 2007). Embora o *status* de tribo para o grupo seja adotado por Michener (2007) e Moure et al. (2012), este tem sido amplamente tratado como uma subtribo (Euglossina) de Apidae (SILVEIRA et al., 2002; NEMÉSIO, 2009).

A tribo Euglossini apresenta uma ampla distribuição geográfica no continente americano tropical, sendo encontrada desde o sul do Texas, nos Estados Unidos, e norte do México até a região central da Argentina e domínios do Paraguai (MICHENER, 1974; DRESSLER, 1982a; ROUBIK; HANSON, 2004). Assim, embora tenha uma distribuição primariamente Neotropical, existem espécies com ocorrência reconhecida para o sul dos Estados Unidos (MINCKEY; REYES, 1996; SKOV; WILEY, 2005).

Esta tribo se originou, provavelmente, por volta de 42 a 38 milhões de anos, na América do Sul, onde ocorre o maior número de espécies (REBÊLO, 2001). Com base em dados moleculares estimou-se que a sua diversificação teria se dado em época geológica relativamente recente, aparentemente nos últimos 20 a 15 milhões de anos (DICK et al., 2004; RAMÍREZ et al., 2010).

As abelhas Euglossini são conhecidas popularmente como “abelhas das orquídeas”, denominação decorrente do hábito dos machos visitarem com frequência, mas não de forma exclusiva, flores da família Orchidaceae na procura de essências aromáticas (DRESSLER, 1982a; ACKERMAN, 1983; ROUBIK; HANSON, 2004). Embora este

comportamento de coleta de essências não se encontra ainda totalmente elucidado, a hipótese mais provável é que o mesmo esteja relacionado com a comunicação e acasalamento nestas abelhas (DODSON et al., 1969; DRESSLER, 1982a; ELTZ et al., 1999; CAMERON, 2004; ELTZ et al., 2007). As fragrâncias armazenadas por machos mais velhos consistem em misturas complexas de terpenóides e compostos aromáticos (ELTZ et al., 1999), misturas estas espécie-específicas e adquiridas após várias visitas a diversos recursos (ELTZ et al., 2005).

A coleta e dispersão de compostos aromáticos pelos machos euglossíneos estão associadas com a presença de modificações morfológicas exclusivas. Por exemplo, determinadas modificações morfológicas presentes nas pernas dos machos Euglossini estão claramente envolvidas com a coleta de perfumes (DRESSLER, 1968; DRESSLER, 1982a; KIMSEY, 1987). Dentre estas modificações destaca-se o aumento em tamanho e espessura da tíbia do terceiro par de pernas, correspondente à glândula tibial, com função no armazenamento de perfumes (DRESSLER, 1982a). Ainda de acordo com este autor, tufo de pêlos presentes nos tarsos do primeiro par de pernas têm também função relacionada com a coleta de fragrâncias.

A tribo Euglossini reúne abelhas de língua longa, algumas vezes ultrapassando em extensão o tamanho do corpo destes insetos (DRESSLER, 1982a; MICHENER, 2007; BORRELL, 2005). Várias espécies apresentam colorido metálico, enquanto outras, especialmente do gênero *Eulaema* apresentam coloração escura não metálica, com ornamentações na forma de faixas no abdômen e de tamanho relativamente grande (DRESSLER, 1982a; ROUBIK; HANSON, 2004).

As abelhas Euglossini têm sido consideradas por diversos autores como um grupo de abelhas solitárias ou exibindo uma organização social incipiente, a exemplo da organização comunal (RAMÍREZ et al., 2002; CAMERON, 2004), onde várias fêmeas

compartilham um mesmo local de ninho, mas não trabalham de forma cooperativa dividindo tarefas (MICHENER, 1974).

Por outro lado, Garófalo (1985) sugere que níveis mais avançados de organização social são observados para algumas espécies, a exemplo de *Euglossa cordata* L., espécie que apresenta organização primitivamente eussocial. Outros estudos têm sido realizados e confirmam que níveis mais elaborados de organização social ocorrem em outras espécies de *Euglossa* (AUGUSTO; GARÓFALO, 2004, 2007, 2010).

Assim, tendo em vista que a tribo Euglossini é a única tribo de abelhas corbiculadas (Apini, Bombini, Meliponini & Euglossini, *sensu* MICHENER, 2007) que apresenta níveis variados de organização social (ZUCCHI et al., 1969; DRESSLER, 1982a; CAMERON; RAMÍREZ, 2001; RAMÍREZ *et al.*, 2002; AUGUSTO; GARÓFALO, 2004, 2007, 2010; CARDINAL; DANFORTH, 2011), esta têm sido objeto de interesse de estudos relacionados à evolução e organização de tal comportamento em Apidae (SOUCY et al., 2003; AUGUSTO; GARÓFALO, 2004, 2007; COCOM PECH et al., 2008; CARDINAL; DANFORTH, 2011).

Os Euglossini representam um componente importante de florestas tropicais no continente americano, onde podem em alguns casos constituir até 25% da fauna de abelhas local (ROUBIK; HANSON, 2004). Na região Neotropical, existe um número estimado de 600 a 700 espécies de Orchidaceae, grande parte pertencentes à subfamília Catasetinae, exclusivamente dependentes das visitas de machos euglossíneos para obterem sucesso na polinização cruzada (ACKERMAN, 1983, ROUBIK; HANSON, 2004). Além disso, mais de 40 famílias de plantas são polinizadas tanto por machos quanto por fêmeas de Euglossini (ZUCCHI et al., 1969; DRESSLER, 1982a; RAMÍREZ et al., 2002; ROUBIK; HANSON, 2004; ROCHA-FILHO et al., 2012).

Apesar do importante papel ecológico desempenhado por tais abelhas e pelo próprio interesse que o grupo desperta por sua beleza e peculiaridade, o fato de possuir abelhas muito ariscas, de voo rápido e difíceis de serem observadas, esta tribo começou a ser mais estudada e conhecida a partir da década de 1960, com a descoberta de que os machos podiam ser atraídos por essências aromáticas artificiais (WILLIAMS; DODSON, 1972; DRESSLER, 1982a; REBÊLO, 2001; CAMERON, 2004). A partir de então, o uso de iscas aromáticas permitiu um amplo conhecimento, nas últimas quatro ou cinco décadas, da riqueza do grupo (DRESSLER, 1982a; ANJOS-DA-SILVA; REBÊLO, 2006; OLIVEIRA, 2006; RAMÍREZ, 2006; RASMUSSEN; SKOV, 2006; NEMÉSIO, 2009; FARIA; MELO, 2011; HINOJOSA-DÍAZ; ENGEL, 2011; NEMÉSIO, 2013).

Em relação aos estudos genéticos envolvendo essas abelhas, estes ainda são escassos, especialmente quando se considera a diversidade e a importância ecológica do grupo. Nas últimas décadas, o avanço no conhecimento e domínio de diferentes técnicas moleculares têm permitido a realização de estudos genéticos voltados a um maior conhecimento da tribo Euglossini.

Estas técnicas moleculares têm sido aplicadas, gerando informações importantes para estudos tais como: estudos taxonômicos (LÓPEZ-URIBE; DEL LAMA, 2007; RAMÍREZ et al., 2010), filogenéticos (MICHEL-SALZAT et al., 2004), populacionais (CERÂNTOLA et al., 2010; SUZUKI et al., 2010; ZIMMERMANN et al., 2011; FREIRIA et al., 2012; NEMÉSIO et al., 2012), para determinação de machos diploides (ROUBIK et al., 1996; TAKAHASHI et al., 2001; ZAYED et al., 2004; LÓPEZ-URIBE et al., 2007; SOUZA et al., 2010), que estimam a frequência de acasalamento de fêmeas e estrutura sociogenética de algumas espécies (SOUZA et al., 2007; ZIMMERMANN et al., 2011), além da construção de novas ferramentas para abordagens genéticas como *primers* de microssatélites (SOUZA et al., 2007; PAXTON et al., 2009; LÓPEZ-URIBE et al., 2011). Mas, como destacado, ainda

existem várias questões a serem respondidas, de modo que a utilização de ferramentas genéticas podem auxiliar nestas resoluções. Algumas destas questões são tratadas separadamente a seguir.

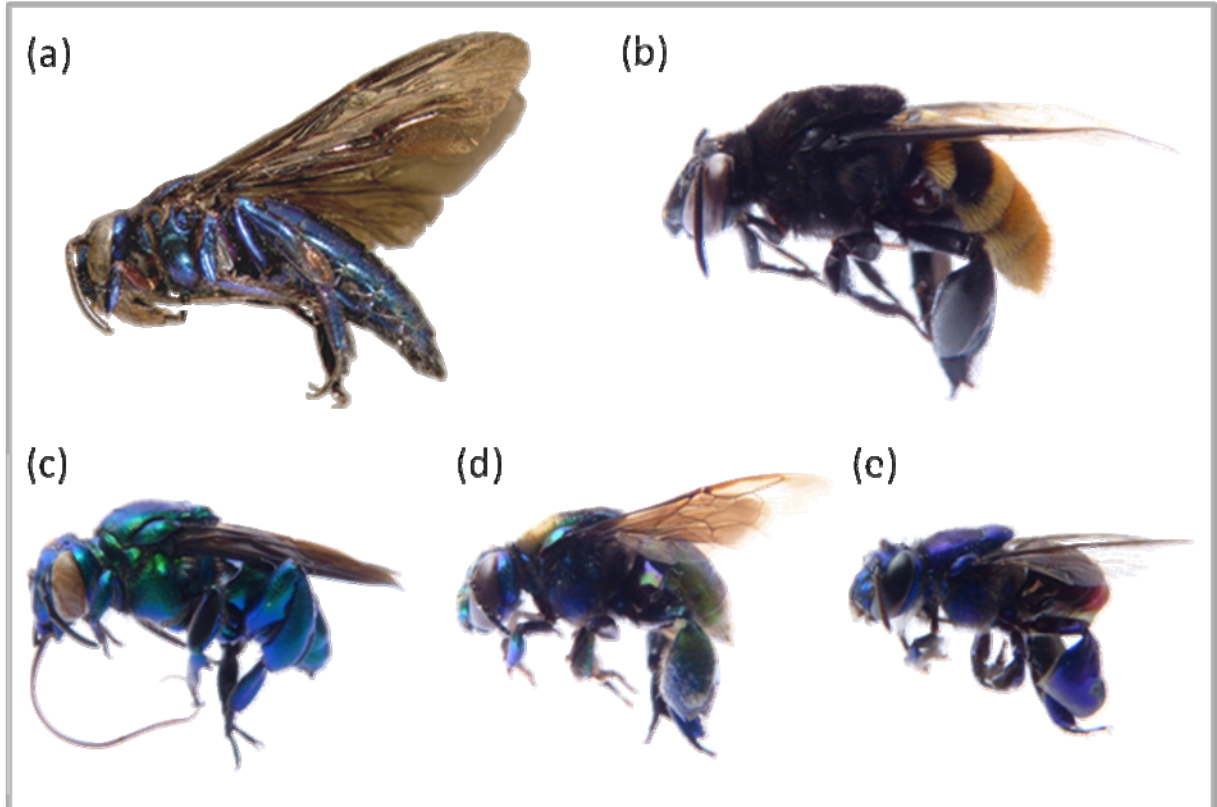
QUESTÕES TAXONÔMICAS E FILOGENÉTICAS ENVOLVENDO AS ABELHAS EUGLOSSINI

Neste caso, merece destaque o fato que diversas espécies da tribo Euglossini, especialmente do gênero *Euglossa*, se encontram em situação duvidosa quanto ao real *status* taxonômico, sendo alvo de discussão na literatura (FARIA JR; MELO, 2007; NEMÉSIO, 2009). Tais dúvidas relacionam-se, por exemplo, a validade no uso da coloração do tegumento para a descrição e identificação de espécies (ver NEMÉSIO, 2009).

Dos cinco gêneros de Euglossini (*Euglossa*, *Eulaema*, *Eufriesea*, *Exaerete* e *Aglae*) (Figura 1), *Euglossa* é o mais rico em número de espécies, com mais de 110 espécies reconhecidas (RAMÍREZ et al., 2010), distribuídas em seis subgêneros (*Glossuropoda*, *Glossura*, *Glossurella*, *Dasystilbe*, *Euglossella* e *Euglossa s.s.*) e 12 grupos de espécies (DRESSLER, 1978; DRESSLER, 1982b,c,d; CAMERON, 2004).

As abelhas deste gênero possuem coloração metálica brilhante, que varia do verde ao dourado ou acobreado, ou ainda do verde para o azul e o violeta (CAMERON, 2004; ROUBIK; HANSON, 2004). Em relação ao tamanho do corpo, são menores do que as pertencentes aos outros gêneros de Euglossini (MICHENER, 2007; CAMERON, 2004), variando de 9-19 mm (MICHENER, 2007).

Figura 1 – Machos de abelhas Euglossini (Apidae): exemplares de cinco espécies representantes de cinco gêneros. (a) *Aglae caerulea* (Modificado de Ramírez et al. (2010)); (b) *Eulaema cingulata*; (c) *Exaerete smaragdina*; (d) *Eufriesea violacea*; (e) *Euglossa roderici* (Amorim, J.A.).



As espécies de *Euglossa* se encontram distribuídas predominantemente do México até a Argentina (Figura 2) (NEMÉSIO, 2009), embora a distribuição de *Euglossa viridissima* Friese alcance o sul dos Estados Unidos (SKOV; WILEY, 2005; PEMBERTON; WHEELER, 2006). Aproximadamente 35 destas espécies estão presentes na região da Mata Atlântica (NEMÉSIO, 2009), além disto, novas espécies têm sido descritas, de modo que a riqueza destas abelhas ainda é subestimada (FARIA JR; MELO, 2012).

Figura 2 – Área de distribuição das espécies de *Euglossa* (Apidae, Euglossini) (em verde).



Inicialmente Cockerel (1917) sugere a criação do subgênero *Glossura* para incluir espécies com aparelhos bucais alongados e escutelo bigiboso, de modo que as demais espécies formariam o subgênero *Euglossa* s.str. Moure (1967) para agrupar as espécies que possuíam machos com mandíbulas tridentadas acrescentou o terceiro subgênero *Euglossella*. Dressler (1978) cria o quarto subgênero *Dasystilbe* para incluir espécies que compartilhavam características de *Glossura* e *Euglossella*, além de fazer uma abordagem dos quatro

subgêneros existentes até então. Neste mesmo trabalho, Dressler separou as espécies descritas de *Euglossa* em 12 grupos (HINOJOSA-DÍAZ, 2010)..

Posteriormente, Dressler (1982c) e Moure (1989) sugeriram o agrupamento de mais dois subgêneros: *Glossurella* e *Glossuropoda*, respectivamente (ROUBIK; HANSON, 2004). Cada um dos grupos de *Euglossa* possui uma espécie representativa, assim, os grupos foram distribuídos nos subgêneros: *Glossuropoda* (dois grupos: *intersecta* e *rugilabris*), *Glossura* (dois grupos: *piliventris* e *stellfeldi*), *Glossurella* (grupo *bursigera*), *Dasystilbe* (grupo *villosa*), *Euglossella* (grupo *viridis*) e *Euglossa* (cinco grupos: *analis*, *viridissima*, *cybelia*, *purpurea* e *cordata*) (CAMERON, 2004).

Até meados de 2004 esta classificação em subgêneros e grupos se manteve, com a maioria dos trabalhos de taxonomia baseados em análises morfológicas e, ainda, sem a contribuição de trabalhos que analisassem a filogenia do grupo (CAMERON, 2004). Porém, mesmo alguns trabalhos que usavam dados morfológicos passaram a contestar algumas posições de subgêneros e grupos de *Euglossa* (BEMBÉ, 2004; FARIA JR; MELO, 2007; HINOJOSA-DÍAZ, 2010).

Bembé (2004) fez uma revisão do grupo *cordata*, um dos 12 grupos propostos para *Euglossa*. Neste seu estudo, com base em caracteres morfológicos, o autor reconhece cinco subgêneros para o gênero *Euglossa* e não seis como anteriormente proposto por Dressler (1978, 1982,b,c,d), mostrando o aparecimento de possíveis discordâncias entre os diferentes estudos, à medida que novas revisões são realizadas.

Faria Jr e Melo (2007) sugerem a transferência de *Euglossa stellfeldi*, antes pertencente ao subgênero *Glossura*, para *Glossurella*, de modo que *Glossura* se tornaria um grupo mais homogêneo. Neste mesmo trabalho, os autores sugerem a hipótese de “variação de coloração latitudinal” de algumas espécies de Euglossini presentes na Mata Atlântica, afirmando que a variação na coloração das espécies seria uma característica intraespecífica

causada possivelmente por influências fisiológicas e/ou relacionadas à umidade do ambiente. Um exemplo importante é a espécie *Euglossa iopoecila* Dressler, distribuída ao longo da Mata Atlântica e que possui coloração variada, sendo predominantemente verde ao norte de sua distribuição (Espírito Santo e Bahia) e azul a violeta ao sul de sua distribuição (Paraná e Santa Catarina) (FARIA JR; MELO, 2007).

Esta hipótese de “variação de coloração latitudinal” foi contestada por Nemésio (2009), que propôs a hipótese denominada de “fenômeno vermelho/azul” na qual afirma a possível ocorrência de uma seleção de indivíduos com coloração predominantemente vermelha a verde em baixas latitudes e indivíduos predominantemente azuis em altas latitudes, surgindo, portanto, novas espécies. Este mesmo autor reconhece *Euglossa roubiki* Nemésio como uma nova espécie, com base na coloração verde que apresenta, separando esta de *Euglossa iopoecila*, de coloração azul/violeta. Além destas duas espécies, discordâncias também têm surgido quanto à classificação e *status* de outras espécies de *Euglossa*, a exemplo de *Euglossa anodorhynchi* Nemésio e *Euglossa townsendi* Cockerell, que também apresentam, respectivamente, coloração azul mais ao sul do Brasil e verde em porções mais ao norte de sua distribuição (FARIA JR; MELO, 2007). Para Nemésio (2009), estas são espécies distintas. E, mais recentemente vem sendo reconhecidas como tal (MOURE et al., 2012). *Euglossa stellfeldi* Moure e *E. annectans* Dressler representam outras duas espécies que têm gerado discussões sobre serem ou não uma única espécie (FARIA JR; MELO, 2007; NEMÉSIO, 2009), embora tal discussão não envolva diferenças na cor do tegumento.

Outras discussões sobre os questões taxonômicas envolvem ainda as espécies: *Euglossa solangeae* Nemésio e *Euglossa stellfeldi* Moure (NEMÉSIO, 2007), sendo a primeira espécie reconhecida mais recentemente como sinonímia da segunda (MOURE et al., 2012); *Euglossa (Euglossella) jacquelynae* Nemésio e *Euglossa viridis* Perty, consideradas espécies distintas por Nemésio (2007; 2009) e reconhecidas como uma única espécie no

catálogo Moure (MOURE et al., 2012). Neste caso, *E. jacquelynae* é tratada como sinonímia de *E. viridis*. Estes são apenas alguns exemplos de várias discussões taxonômicas envolvendo espécies de *Euglossa*. Outras discussões incluem também espécies de *Eulaema* (NEMÉSIO, 2009).

Ainda, trabalhos com base em dados morfológicos como de Hinojosa-Díaz e Engel (2011) que revisaram o subgênero *Euglossella*, propuseram a divisão deste em dois grupos, adicionando *decorata* ao grupo *viridis* já existente em classificações anteriores, Hinojosa-Díaz (2010) propõe uma reformulação em *Glossura*, *Glossuropoda* e *Glossurella*, os quais formaram alguns ramos parafiléticos na filogenia a partir de dados de caracteres da genitália dos machos. A fim de elucidar algumas divergências de trabalhos que envolviam análises morfológicas e de contribuir para uma melhor compreensão das relações filogenéticas de Euglossini (em relação às tribos de corbiculados, aos gêneros do grupo ou ainda às relações de espécies dentro dos diferentes gêneros) trabalhos começaram a ser desenvolvidos com a utilização de dados moleculares (CAMERON, 1993; ASCHER et al., 2001; RAMÍREZ et al., 2010) ou moleculares agregados a dados morfológicos (CAMERON; MARDULYN, 2001; MICHEL-SALZAT et al., 2004).

Nas últimas décadas, o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas moleculares têm contribuído significativamente para o estudo das relações filogenéticas e identificação de espécies de vários grupos de abelhas (FRANCISCO et al., 2001; BRITO; ARIAS, 2005; KEKECOGLU et al., 2009; ZAYED, 2009). Contudo, sem dúvida alguma, a técnica de sequenciamento de determinadas regiões dos genomas mitocondrial e nuclear está entre as mais amplamente utilizadas em análises filogenéticas. Particularmente em estudos com abelhas, esta técnica vem sendo empregada por diferentes autores, incluindo estudos com abelhas corbiculadas, como abelhas da tribo Meliponini (COSTA et al., 2003; ARIAS et al., 2006; RASMUSSEN; CAMERON, 2007), diferentes subespécies de *Apis* (tribo Apini)

(ARIAS; SHEPPARD, 1996), *Bombus* (tribo Bombini) (CAMERON; WILLIAMS, 2003), abelhas da tribo Euglossini (MICHEL-SALZAT et al., 2004; RAMÍREZ et al., 2010), além de abelhas de outras famílias como Halictidae (DANFORTH, 1998; DANFORTH et al., 1999; DANFORTH et al., 2003) e Megachilidae (PRAZ et al., 2008).

Vários genes mitocondriais e nucleares têm sido utilizados em análises filogenéticas envolvendo abelhas, com destaque para os genes CO1, 16S rDNA, CytB e ND2 (ARIAS; SHEPPARD, 1996; COSTA et al., 2003; ARIAS et al., 2006; RASMUSSEN; CAMERON, 2007). Entre os genes nucleares que têm sido investigados em estudos filogenéticos com estes insetos destacam-se os genes da proteína rodopsina (RASMUSSEN; CAMERON, 2007), espaçadores transcritos internos (ITS) 1 e 2 do gene de RNA ribossômico (KUHLMANN et al., 2007) e o EF-1 α ou fator de alongamento alfa-1 (KUHLMANN et al., 2007; RASMUSSEN; CAMERON, 2007).

O DNA mitocondrial tem como características importantes a ausência de recombinação, herança materna (na maioria das espécies) e altas taxas de mutação, em comparação com o genoma nuclear, podendo, portanto, ser usado para detectar efeitos evolutivos mais recentes (FRANKHAM et al., 2008). O genoma mitocondrial de animais (incluindo o DNAm de abelhas) possui tamanho em torno de 15 a 20Kb e 37 genes, 13 dos quais codificam subunidades de enzimas que participam da fosforilação oxidativa e da cadeia de transporte de elétrons: citocromo B (CytB, subunidades I-III do citocromo c oxidase (COI (ou CO1), COII e COIII), subunidades 6 e 8 do complexo ATP sintetase (ATPase6 e ATPase8), 7 subunidades da NADH desidrogenase (ND1-6 e ND4L); 2 genes que codificam os rRNAs 12S e 16S que formam as subunidades do ribossomo mitocondrial e 22 genes que codificam os tRNAs necessários durante o processo da tradução do DNAm (WOLSTENHOLME, 1992; BOORE, 1999; CHA et al., 2007). Em abelhas corbiculadas, o tamanho do genoma mitocondrial encontrado por sequenciamento foi de 16.343pb em *Apis*

mellifera L. (CROZIER; CROZIER, 1993) e 16.434pb em *Bombus ignitus* Smith (CHA et al., 2007).

Outro segmento do DNAm^t que tem se mostrado útil em análises taxonômicas e filogenéticas corresponde à região denominada de *barcode* (código de barras), a qual faz parte do gene da subunidade 1 da citocromo oxidase (CO1). O segmento *barcode* tem sido empregado para a criação de um sistema universal de inventário de espécies com base no padrão molecular deste fragmento (FRÉZAL; LEBLOIS, 2008). Vários trabalhos têm demonstrado a eficiência do DNA *barcode* para a identificação de possíveis espécies crípticas (HERBERT et al., 2004; SHEFFIELD et al., 2009), o que o torna importante nos estudos que visem a detecção de espécies com problemas taxonômicos.

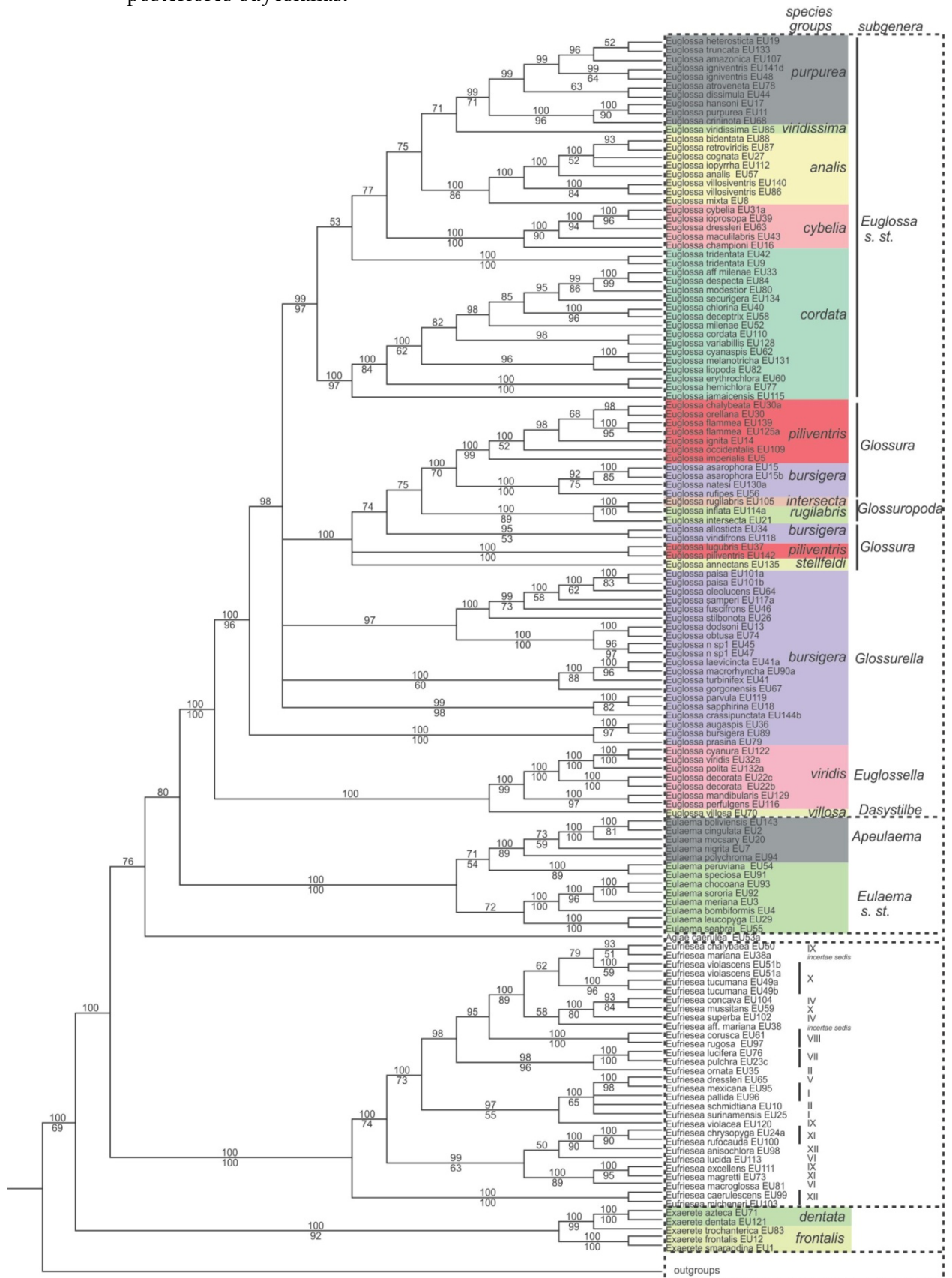
Os genes nucleares, em relação aos genes mitocondriais, evoluem de forma lenta, por isto são uma fonte valiosa de dados para a resolução de filogenias a nível familiar de abelhas (DANFORTH et al., 2006). Em 2006 o chamado “*The Honeybee Genome Sequencing Consortium*” publicou o genoma completo de *Apis mellifera*, gerando informações úteis para estudos relacionados com a evolução do comportamento social, bem como proporcionando uma fonte importante de dados para usos posteriores em filogenia (THE HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006).

López-Uribe e Del Lama (2007) analisaram os segmentos dos genes mitocondriais 16S e CytB de três espécies de *Euglossa* com base nas técnicas de sequenciamento e PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismos no Comprimento de Fragmentos de Restrição), e observaram que, enquanto o segmento do gene 16S se mostrou mais informativo na discriminação de espécies, o segmento do CytB mostrou-se mais eficiente para as análises comparativas de grupos de espécies.

Um estudo com Euglossini, publicado por Ramírez et al. (2010), com base em locos mitocondriais e nucleares, estabeleceu as relações filogenéticas entre os cinco gêneros

da tribo e também entre os subgêneros e grupos de *Euglossa*. As relações entre alguns subgêneros (ex. *Glossura* e *Glossurella*), como em Hinojosa-Díaz (2010), apresentaram ramos que misturavam espécies dos dois subgêneros e ainda grupos de espécies que precisam de novos estudos para ser melhor elucidados. Embora o estudo de Ramírez et al. (2010) tenha sido um trabalho extenso e importante para o entendimento das relações filogenéticas de *Euglossa* (Figura 3) e da tribo como um todo, algumas espécies de *Euglossa* com ocorrência endêmica à Mata Atlântica, ou ainda com ocorrência não exclusiva a este bioma, mas frequentemente presentes nos diferentes ecossistemas da Mata Atlântica, não foram analisados. Várias destas espécies estão entre aquelas que têm sido alvo de discussão sobre seu *status* taxonômico e continuam carecendo de análises genéticas que possam embasar melhor a sua condição taxonômica (NEMÉSIO, 2009).

Figura 3 – Cladograma bayesiano da tribo Euglossini publicado por Ramírez et al. (2010). Os valores de suporte abaixo dos ramos correspondem aos *bootstraps* gerados via máxima parsimônia; os valores acima dos ramos correspondem às probabilidades posteriores bayesianas.



ANÁLISES GENÉTICAS X INDIVÍDUOS GINANDROMORFOS DE EUGLOSSINI

Outra questão envolvendo o estudo de abelhas das orquídeas, bem como de outros grupos de abelhas, relaciona-se a ocorrência de indivíduos ginandromorfos na natureza. Diversos estudos têm relatado a ocorrência de organismos ginandromorfos ou intersexos entre os insetos da ordem Hymenoptera (MICHEZ et al., 2009; NARITA et al., 2010). Em termos morfológicos, ginandromorfos e intersexos podem ser definidos como organismos que apresentam simultaneamente características de macho e fêmea em um mesmo indivíduo (NARITA et al., 2010; NEGRI; PELLECCCHIA, 2012; TULGETSKE; STOUTHAMER, 2012). Os organismos ginandromorfos possuem tecidos geneticamente e fenotipicamente quiméricos (masculinos e femininos) e os organismos intersexos são geneticamente uniformes, mas com todas ou algumas partes dos seus tecidos com fenótipo sexual diferente do seu sexo genético (NARITA et al., 2010; NEGRI; PELLECCCHIA, 2012).

Os estudos sobre estes organismos podem ser úteis para a compreensão do mecanismo de determinação sexual de diversos grupos de artrópodes (NARITA et al., 2010) e do desenvolvimento embrionário dos organismos estudados (YOSHIZAWA et al., 2009).

Nos últimos anos, quatro casos de ginandromorfismo em abelhas Euglossini foram publicados por diferentes autores (URBAN; MOURE, 2002; GIANGARELLI; SOFIA, 2011; HINOJOSA-DÍAZ et al., 2012; SILVEIRA et al., 2012).

Por se tratarem de organismos com sistema genético haplodiploide, as abelhas, assim como outros himenópteros, tornam-se organismos especialmente interessantes para o estudo genético voltado à elucidação dos mecanismos relacionados à origem e desenvolvimento do ginandromorfismo.

Embora na literatura atual haja vários registros de ginandromorfismo em abelhas e de descrições quanto às variações nas características fenotípicas encontradas pelos diferentes autores (GONZÁLEZ, 2004; ENGEL, 2007; LUCIA et al., 2009; MICHEZ et al.,

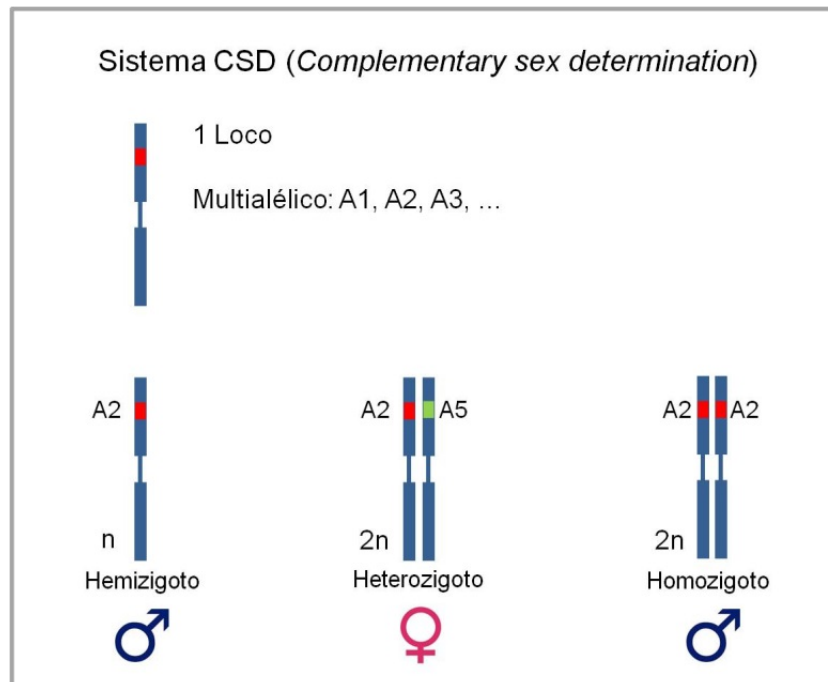
2009; SAMPSON et al., 2010; GIANGARELLI; SOFIA, 2011), até o momento os mecanismos genéticos envolvidos no surgimento de tais organismos ainda é pouco compreendido.

Como mencionado anteriormente, as abelhas, assim como os demais Hymenoptera, possuem um sistema haplodiploide de determinação sexual, no qual as fêmeas se desenvolvem a partir de ovos fecundados (diploides) e os machos se desenvolvem a partir de ovos não fecundados (haploides), por um tipo de partenogênese denominada arrenotoquia (CRUZ-LANDIM, 1984; MICHENER, 2007; BEYE et al., 2003).

O mecanismo de determinação sexual mais aceito na atualidade para abelhas é o chamado sistema *sl-CSD* (*Complementary sex determination*), composto de um loco multialélico. Este sistema foi inicialmente proposto a partir de um estudo de endocruzamento com machos diploides de vespas da espécie *Bracon hebetor*, na época conhecida como *Habrobracon juglandi* (WHITING, 1943). Posteriormente verificou-se a ocorrência do mesmo sistema para diversas espécies de Hymenoptera, incluindo as abelhas (VAN WILGENBURG et al., 2006).

De acordo com esse modelo, a ploidia do organismo, combinada com a expressão dos alelos da região genômica *csd* (*complementary sex determiner*) determina o fenótipo sexual da abelha. Em organismos haploides originados por partenogênese o loco CSD está em hemizigose, o que determinaria o fenótipo de macho. Já em organismos diploides, se o loco CSD está em heterozigose acarreta a ocorrência do fenótipo fêmea e em homozigose ocorre a formação de um macho diploide (COOK, 1993; VAN WILGENBURG et al., 2006; SÁNCHEZ, 2008; ZAYED, 2009) (Figura 4).

Figura 4 – Modelo de determinação sexual de abelhas baseado no sistema CSD (*Complementary sex determination*). Baseado em Beye et al., 2003.



Hasselmann et al. (2008) sugerem que o gene *csd* evoluiu a partir da duplicação do gene *fem* (*feminizer*). A ocorrência de alelos em heterozigose para o loco CSD promove a expressão de um fator responsável pelo *splicing* do RNAm do gene *fem* (descrito em abelhas Apidae) envolvido no desenvolvimento de fêmeas. Quando o loco está em homozigose ou hemizigose não ocorre a formação do produto adequado e, sem o *splicing*, não há a tradução completa do *fem* (HASSELMAN et al., 2008; RABELING; KRONAUER, 2013).

Dobata et al. (2012), foi um dos trabalhos sobre ginandromorfos que se destacou por fazer uso de técnicas genéticas conjuntamente às análises morfológicas. Neste trabalho foram utilizados marcadores microssatélites para a análise de um indivíduo ginandromorfo da formiga *Diacamma* sp. A partir de uma análise envolvendo quatro locos de microssatélites estes autores puderam inferir que os tecidos do ginandromorfo com características femininas possuíam alelos consistentes com sua herança biparental (diploide),

enquanto que a maioria dos tecidos com características masculinas possuíam alelos indicando a possível ocorrência de androgênese (origem paterna dos tecidos) (haploide). Tais resultados mostraram, portanto, que o indivíduo analisado de *Diacamma* sp. mostrou tratar-se de fato de um indivíduo ginandromorfo, pelo fato do mesmo apresentar uma combinação quimérica de genótipos haploides e diploides nos tecidos analisados.

Paxton et al. (2009) argumenta que a natureza codominante dos marcadores microssatélites pode ser uma importante ferramenta na investigação sobre a ploidia de espécies abelhas. De fato, tais marcadores têm sido empregados e se mostrado eficientes na determinação do parentesco entre indivíduos de uma mesma colônia (COWAN; STAHLHUT, 2004). Além disto, têm auxiliado no estudo de casos de machos diploides em abelhas das orquídeas (SOUZA et al., 2010). Contudo, até o momento, a literatura atual carece de mais estudos usando os marcadores microssatélites na elucidação de aspectos genéticos envolvendo o ginandromorfismo em abelhas. Mesmo a questão dos machos diploides continua à espera de maiores análises.

Com base no exposto acima, o presente trabalho fez uso de diferentes técnicas moleculares para tentar responder algumas questões genéticas envolvendo as abelhas Euglossini, em destaque: questões taxonômicas e filogenéticas, bem como a questão ginandromorfo *versus* intersexo.

O trabalho será apresentado em forma de capítulos, sendo cada capítulo composto de um artigo completo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar, com base em análises moleculares, as relações taxonômicas envolvendo algumas espécies de *Euglossa* com *status* taxonômico duvidoso, bem como as relações filogenéticas entre diferentes espécies deste gênero. Caracterizar geneticamente um indivíduo de uma espécie de *Euglossa* com morfologia ginandromorfa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analisar indivíduos das espécies *E. iopoecila* e *E. roubiki*, por meio de sequenciamento de fragmentos dos genes COI, 16S e CytB do DNA mitocondrial e 28S rDNA, para contribuir com informações sobre o *status* taxonômico destas espécies e ainda inferir se elas compõem populações de uma mesma espécie.
- 2) Analisar representantes do gênero *Euglossa*, amostrando espécies de ocorrência na Mata Atlântica, por meio de sequenciamento de fragmentos das regiões dos genes COI, 16S do DNA mitocondrial e 28S rDNA, a fim de obter dados sobre as relações filogenéticas deste grupo, bem como dos subgêneros aos quais estas pertencem.
- 3) Descrever morfologicamente um indivíduo da espécie *E. melanotricha* Moure, 1967, que apresenta características morfológicas de macho e fêmea e, com base em marcadores microssatélites, obter informações sobre o genótipo nas diferentes partes do seu corpo. Inferir, a partir dos dados de morfologia e moleculares, se o indivíduo da espécie *E. melanotricha*, se constitui em um organismo ginandromorfo ou intersexo.

Capítulo 2**Análise molecular aplicada à investigação do status taxonômico de *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roubiki* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini)**

Karen M. Suzuki¹, Wilson F. da Silva¹ e Silvia H. Sofia^{1,*}

¹Laboratório de Genética e Ecologia Animal, Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, 86051-980, Londrina, PR, Brasil. e-mail: suzukibio@yahoo.com.br

Título resumido: Análise molecular de *Euglossa iopoecila* e *E. roubiki*

Manuscrito a ser submetido à revista Apidologie

Resumo

O gênero *Euglossa* possui mais de 110 espécies descritas, das quais algumas ainda carecem de estudos taxonômicos mais detalhados. Alguns estudos tem mostrado que *Euglossa iopoecila*, distribuída ao longo da Mata Atlântica na costa leste brasileira, possui coloração variada, sendo predominantemente verde nos limites mais ao norte e de cor azul a violeta nos limites mais ao sul de sua distribuição. A cor verde do corpo foi usada para atribuir status de espécie a *Euglossa roubiki* diferenciando-a de *Euglossa iopoecila*, de coloração azul/violeta. O presente trabalho utilizou o sequenciamento de parte das regiões COI, CytB e 16S rDNA do DNA mitocondrial e região 28S rDNA do DNA nuclear a fim de tentar elucidar o real status taxonômico de tais abelhas. Foi realizada a análise de distância genética segundo o modelo K2P (Kimura-2-Parameter distance model), para a região *barcode* bem como análises filogenéticas (máxima parcimônia, máxima verossimilhança e análise bayesiana) para a análise dos fragmentos mitocondriais e nuclear. Os dados da região *barcode*, do gene CytB e dos genes concatenados foram utilizados para a construção de redes de haplótipos. Foram amplificados por PCR fragmentos com tamanhos de 562pb (*barcode*), 665pb (região COI posterior ao *barcode*), 754pb (CytB), 360pb (16S) e 817pb (28S). Os dados concatenados resultaram em 3125 caracteres. Os valores baixos (<0,3%) de distância genética (modelo K2P) entre os indivíduos de *E. iopoecila* e *E. roubiki* e as análises de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e bayesiana, bem como as redes de haplótipos indicam ser estas uma mesma espécie. Porém, não se descarta a possibilidade de que existam diferenças genéticas relacionadas às diferenças de coloração apresentada por tais abelhas.

abelhas das orquídeas/ taxonomia/ *barcode*/ mtDNA/ coloração do tegumento

INTRODUÇÃO

As abelhas da tribo Euglossini, popularmente conhecidas como abelhas das orquídeas, representam um componente importante de florestas tropicais no continente americano, onde podem constituir até 25% da fauna local de abelhas (Roubik e Hanson 2004). O grupo reúne cerca de 250 espécies, pertencentes a cinco gêneros: *Euglossa*, *Eulaema*, *Eufriesea*, *Exaerete* e *Aglae* (Nemésio & Rasmussen 2011). Destes, *Euglossa* é o mais rico em número de espécies, com mais de 100 espécies reconhecidas (Bembé 2004; Cameron 2004; Nemésio 2009), distribuídas em seis subgêneros (*Glossuropoda*, *Glossura*, *Glossurella*, *Dasystilbe*, *Euglossella* e *Euglossa s.s.*) (Cockerell 1917; Moure 1968; Dressler 1978; Dressler 1982b,c,d; Cameron 2004; Ramírez et al. 2010).

Particularmente dentro do gênero *Euglossa*, várias discordâncias têm surgido quanto à classificação e status de diferentes espécies em razão de incertezas da validade de alguns caracteres morfológicos usados na caracterização taxonômica. Um dos aspectos discutidos relaciona-se a variações na coloração de diferentes populações e/ou espécies de *Euglossa*, a exemplo do que acontece com a espécie *Euglossa iopoecila* Dressler (Dressler 1982b), cuja taxonomia tem sido debatida em trabalhos recentes (Faria Jr e Melo 2007; Nemésio 2009).

Euglossa iopoecila foi descrita inicialmente como uma subespécie de *Euglossa chalybeata* Friese (*Euglossa chalybeata iopoecila* Dressler) (Dressler 1982b), considerando principalmente a coloração azul-violeta dos espécimes encontrados nos estados de São Paulo e Paraná (porção sul da região de Mata Atlântica), incluindo o holótipo: Alexandra, Paraná, Brasil, que difere da coloração predominantemente verde dos espécimes de *E. chalybeata* encontrados na Amazônia e na porção norte da Mata Atlântica (Dressler 1982b).

Roubik (2004) demonstrou que a interpretação de Dressler (1982b) sobre a identidade de *Euglossa chalybeata* estava equivocada e a posição de Roubik (2004) foi seguida por todos os autores subsequentes. O estudo de Roubik (2004) sobre a identidade de *Euglossa*

chalybeata resultou em dois atos nomenclaturais: a descrição de *Euglossa orellana* Roubik, que corresponde à espécie que Dressler (1982b) havia interpretado como sendo *E. chalybeata*, e a elevação de *Euglossa iopoecila* ao status de espécie. Tanto *E. orellana* quanto *E. iopoecila* são membros do subgênero *Glossura*, que possui como uma das suas características marcantes a presença de uma glossa bastante longa que pode ultrapassar a extremidade distal do corpo da abelha (Dressler 1982b).

Faria Jr e Melo (2007) reconhecem *E. iopoecila* como uma espécie que apresenta variação na coloração do tegumento ao longo de sua amplitude de distribuição entre os estados de Santa Catarina e Bahia, na Mata Atlântica brasileira. Segundo estes autores, as populações de *E. iopoecila* possuem uma coloração predominantemente verde no limite mais ao norte (Espírito Santo e Bahia) e azul a violeta nos limites mais ao sul (desde São Paulo até Santa Catarina). No mesmo estudo, estes autores propõem uma hipótese de “gradiente de variação latitudinal” da coloração para algumas espécies de Euglossini presentes na Mata Atlântica, sugerindo que a variação na coloração seria uma característica intra-específica causada possivelmente por influências fisiológicas e/ou relacionadas à umidade do ambiente.

Em contraposição, Nemésio (2009) discute a variação de coloração das espécies de *Euglossa* como um “fenômeno vermelho/azul” e sugere que a variação da coloração do tegumento é determinada geneticamente. Em seu estudo monográfico, este autor propõe que a ação da seleção natural sobre as diferentes populações resulta na maior ocorrência de indivíduos com coloração que variam predominantemente, de vermelha a verde em baixas latitudes e com coloração mais azul em altas latitudes. A partir disto, Nemésio (2009) reconhece como *E. iopoecila* apenas aquelas populações de coloração azul/violeta, com ocorrência na porção mais ao sul da Mata Atlântica (estados do Paraná e Santa Catarina) na costa leste do Brasil e propõe que as populações de coloração verde distribuídas na porção

mais ao norte (nos estados do Rio de Janeiro a Pernambuco), sejam tratadas como uma espécie distinta, *Euglossa roubiki* Nemésio.

Diante das divergências que persistem até o momento quanto à classificação taxonômica mais adequada para *E. iopoecila* e outras espécies de Euglossini, as análises moleculares baseadas do genoma surgem como uma alternativa promissora para a resolução de tais impasses.

Nas últimas décadas, vários genes mitocondriais e nucleares têm sido utilizados em análises filogenéticas envolvendo abelhas, com destaque para os genes COI, 16S rDNA, CytB e ND2 (Arias e Sheppard 1996; Costa et al. 2003; Arias et al. 2006; Rasmussen e Cameron 2007; Ramírez et al. 2010).

Também o DNA *barcode* (código de barras), uma região em especial do gene da subunidade 1 da citocromo oxidase, tem sido utilizado para a criação de um sistema universal de inventário de espécies com base no padrão molecular deste fragmento (Frézal e Leblois 2008). Vários trabalhos têm demonstrado a eficiência do DNA *barcode* para a identificação de possíveis espécies crípticas (Hebert et al. 2004; Sheffield et al. 2009), o que torna esse fragmento importante para estudos que visem a detecção de espécies com problemas taxonômicos.

Entre os genes nucleares destacam-se os da proteína rodopsina (Rasmussen e Cameron, 2007), espaçadores transcritos internos (ITS) 1 e 2 do gene de RNA ribossômico (Kuhlmann et al. 2007), EF-1 ou fator de alongamento alfa-1 (Kuhlmann et al. 2007; Rasmussen e Cameron, 2007; Ramírez et al. 2010) e 28S rDNA (Hines et al. 2007; Rasmussen e Cameron 2010).

Em estudos envolvendo as abelhas da tribo Euglossini, López-Uribe e Del Lama (2007) analisaram os segmentos dos genes mitocondriais 16S e CytB de três espécies de *Euglossa* com base nas técnicas de sequenciamento e PCR-RFLP (Reação em Cadeia da

Polimerase – Polimorfismos no Comprimento de Fragmentos de Restrição) e observaram que, enquanto o segmento do gene 16S se mostrou mais informativo na discriminação de espécies, o segmento do CytB mostrou-se mais eficiente para as análises comparativas de grupos de espécies.

Ainda, um estudo publicado por Ramírez et al. (2010), com base no sequenciamento de locos mitocondriais e nucleares, estabelece as relações filogenéticas entre os cinco gêneros de Euglossini e também entre os seis subgêneros e doze grupos de *Euglossa*. Contudo, neste estudo, várias espécies com ocorrência endêmica à Mata Atlântica, a exemplo de *E. iopoecila* e *E. roubiki*, não foram incluídas nas análises, continuando à espera de maiores estudos moleculares.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar indivíduos das espécies *E. iopoecila* e *E. roubiki*, por meio de sequenciamento de fragmentos das regiões dos genes COI, 16S e CytB do DNA mitocondrial e 28S rDNA, visando obter informações sobre o *status* taxonômico destas espécies.

MATERIAIS E MÉTODOS

As coletas dos indivíduos identificados morfológicamente como *Euglossa iopoecila* (Figura 1: 1a-1d) e *Euglossa roubiki* (Figura 1: 2a-2d) foram realizadas em 11 localidades pertencentes a seis estados brasileiros (Tabela I; Figura 2), na tentativa de amostrar uma grande área de distribuição destas espécies. Para as análises foi utilizado um total de 65 machos, representando *E. iopoecila* e *E. roubiki*; assim como sete amostras [*Apis mellifera* (GenBank), *Euglossa ignita* (Manaus, AM), *Euglossa imperialis* (Piumhi, MG), *Euglossa annectans* (Guaraqueçaba, PR), *Euglossa pleosticta* (Casimiro de Abreu, RJ), *Eulaema cingulata* (São José de Ubá, RJ) e *Eufriesea violacea* (Londrina, PR)] usadas como grupo externo.

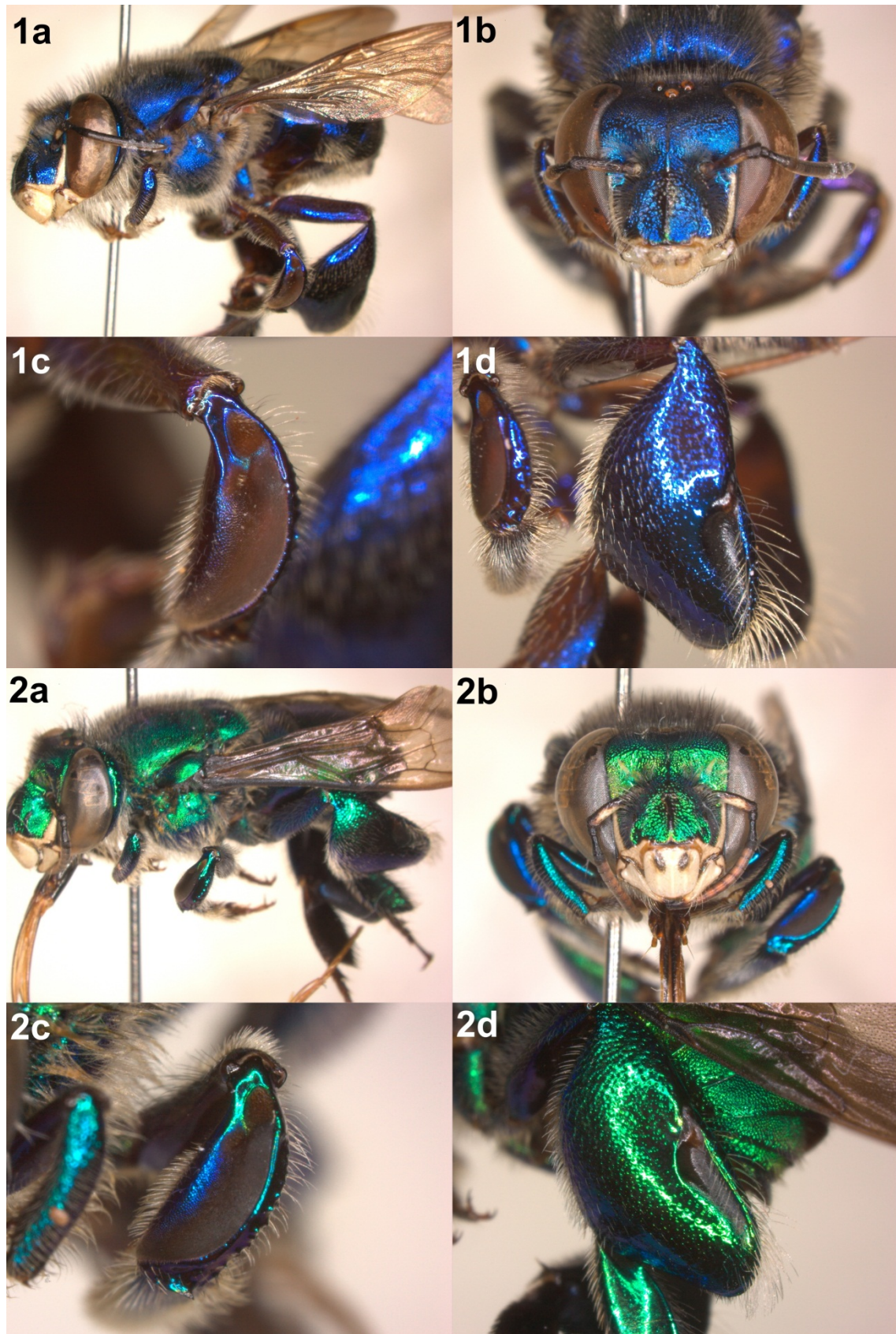


Figura 1. Macho de *Euglossa iopoecila* (1) e macho de *Euglossa roubiki* (2). a: visão lateral; b: vista frontal da cabeça; c: mesotibia com área aveludada e coxins basal e distal; d: metatibia com presença de fenda (Fotos: Ferronato, M.C.F.)

Tabela I. Número de machos de *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roubiki* amostrados por localidade.

Espécie	Subgênero	Nº de indivíduos	Localidade	Cidade/Estado	Coordenadas
<i>Euglossa roubiki</i> Nemésio	<i>Glossura</i>	4	Estação Ecológica de Murici	Murici/AL	09°13'S; 35°52'W
<i>Euglossa roubiki</i> Nemésio	<i>Glossura</i>	3	Reserva Natural Vale	Linhares/ES	19°10'S; 40°02'W
<i>Euglossa roubiki</i> Nemésio	<i>Glossura</i>	3	Reserva Ecológica Michelin	Igrapiúna/BA	13°50'S; 39°15'W
<i>Euglossa roubiki</i> Nemésio	<i>Glossura</i>	10	Reserva Biológica União	Casimiro de Abreu/RJ	22°26'S; 42°01'W
Subtotal <i>E. roubiki</i>		20			
<i>Euglossa iopoecila</i> Dressler	<i>Glossura</i>	8	Parque Estadual Serra do Mar	Ubatuba/SP	23°21'S; 44°49'W
<i>Euglossa iopoecila</i> Dressler	<i>Glossura</i>	6	Parque Estadual de Ilhabela	Ilhabela/SP	23°50'S; 45°21'W
<i>Euglossa iopoecila</i> Dressler	<i>Glossura</i>	7	Parque Estadual Serra do Mar	São Sebastião/SP	23°46'S; 45°36'W
<i>Euglossa iopoecila</i> Dressler	<i>Glossura</i>	4	Cananéia	Cananéia/SP	25°01'S; 47°55'W
<i>Euglossa iopoecila</i> Dressler	<i>Glossura</i>	7	Ilha do Cardoso	Cananéia/SP	25°05'S; 47°59'W
<i>Euglossa iopoecila</i> Dressler	<i>Glossura</i>	5	Parque Nacional do Superagui	Guaraqueçaba/PR	25°23'08"S; 48°13'34"W
<i>Euglossa iopoecila</i> Dressler	<i>Glossura</i>	8	Reserva Natural Salto Morato	Guaraqueçaba/PR	25°10'58"S; 48°18'21"W
Subtotal <i>E. iopoecila</i>		45			
Total		65			

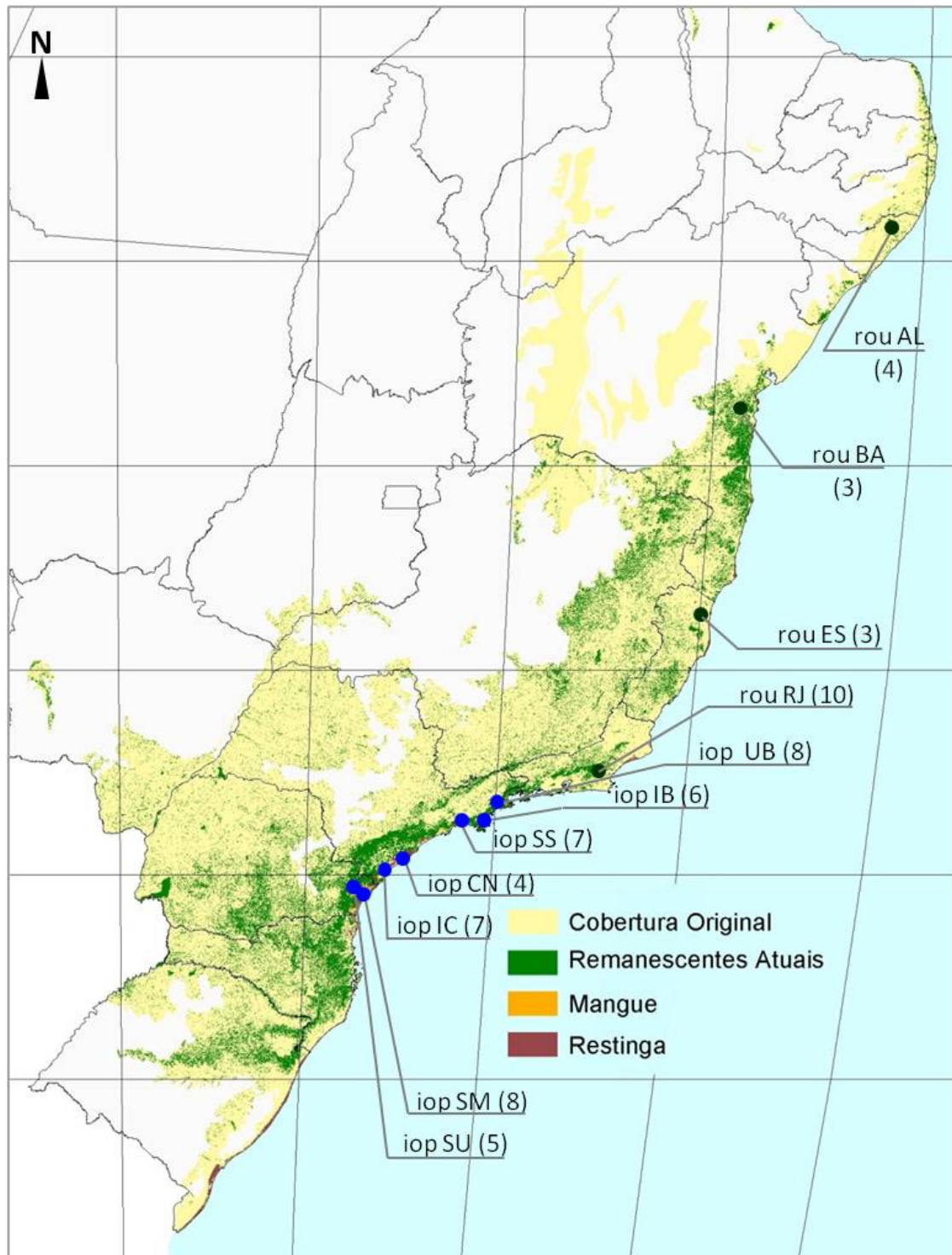


Figura 2. Localização dos pontos de coleta de *E. iopoecila* e *E. roubiki* nos estados do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia, Espírito Santo e Alagoas. Os valores entre parênteses indicam o número de indivíduos estudados de cada localidade. [iop - *Euglossa iopoecila*; rou - *Euglossa roubiki*; CN – Cananéia (SP); IB – Ilha Bela (SP); IC – Ilha do Cardoso (SP); SM – Reserva Natural Salto Morato (PR); SU – Ilha de Superagui (PR)]. Em verde estão representados os remanescentes de Mata Atlântica segundo SOS Mata Atlântica: <http://www.sosma.org.br>.

A metodologia de coleta para a obtenção das amostras envolveu a utilização de iscas-odores para atração dos machos euglossíneos, segundo metodologia descrita em Sofia e Suzuki (2004) e Aguiar e Gaglianone (2008). Foram utilizadas iscas-odores para atração dos machos de *E. iopoecila*, *E. roubiki* e das espécies utilizadas como grupo externo. Os machos, atraídos pelas iscas-odores, foram capturados com o auxílio de rede entomológica (Sofia e Suzuki 2004) ou capturados em armadilhas de garrafas pet (Aguiar e Gaglianone 2008). O material coletado foi identificado sob estereomicroscópio, com base em uma coleção de referência.

A metodologia de extração do DNA total das abelhas foi baseada em Suzuki *et al.* (2010), com modificações. Para a obtenção do DNA foi utilizada a perna posterior direita de cada indivíduo analisado. O material foi “picotado” com auxílio de uma tesoura, lisado com tampão SDS, seguido de extrações sucessivas com fenol, clorofórmio e álcool-isoamílico. O DNA foi precipitado com etanol, ressuspendido em 30 L de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e estocado a -20°C.

A quantificação do DNA das amostras foi realizada em fluorímetro DyNA Quant 200 (Hofer) e o valor obtido foi utilizado nos cálculos das diluições para a concentração de 5 ng/L de DNA (utilizada nas reações de amplificação).

Para a análise dos segmentos de DNA das diversas espécies do gênero *Euglossa* foi realizada a amplificação via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de uma porção da região dos genes COI (subunidade 1 da citocromo oxidase) a partir de dois fragmentos, um correspondente à região *barcode* (*primers* LepF1 e LepR1; Herbert *et al.* 2004) e outro correspondente à porção seguinte ao *barcode* (*primers* CO1-F e CO1-R; Dick *et al.* 2004), CytB (citocromo B) (*primers* CB-J-10612 e CB-N-11367; Simon *et al.* 1994) e 16S (subunidade ribossomal 16S) (*primers* desenhados no laboratório com base em sequências de abelhas Euglossini depositadas no GenBank 16S-F 5'-CGAGGTCGCAAACATCT e 16S-R

5'-TAGCTGCAGTATATTGACT) do DNA mitocondrial. Foi também utilizada parte da região 28S (subunidade ribossomal 28S) (*primers* For28SVesp e Rev28SVesp; Hines et al. 2007) do DNA nuclear.

As reações de PCR foram produzidas em um volume total de 15 L, contendo 1,5 L de tampão de reação 10x, 200 M de cada dNTP, 3,0 mM de MgCl₂, 0,5 M de cada *primer*, 2 L de DNA, 1 U de Taq polimerase (Invitrogen) e água ultrapura para completar o volume. As amplificações foram realizadas em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.) e o protocolo foi otimizado de acordo com o par de *primers* utilizado. As amplificações de PCR foram iniciadas com uma desnaturação de 4 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos (*primers* da região COI: 94°C por 30s, 55°C por 30s e 72°C por 45s; CytB: 94°C por 45s, 48°C por 1min20s e 72°C a 1min40s; 16S: 94°C por 30s, 55°C por 40s e 72°C por 1min; 28S: 94°C por 1min, 55°C por 1min e 72°C por 1min10s), terminando com uma extensão final de 10 minutos a 72C.

Para a comprovação da amplificação, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0%. Após corrida eletroforética os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados em transiluminador sob luz UV, usando-se o sistema da fotodocumentação digital Kodak EDAS 290.

Os produtos das PCRs foram purificados por digestão com 0,5 L de IlustraTM ExoStar (GE Healthcare) e as temperaturas e os tempos de digestão e inativação foram ajustados conforme recomendação do fabricante.

Para cada produto de PCR foram realizadas duas reações de sequenciamento, uma reação com o primer forward e outra reação com o primer reverse. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit “BigDye Terminator v.3.1” (Applied Biosystems). Estas reações foram produzidas em um volume total de 10 L, contendo 2 L do mix de BigDye, 1 L de tampão de sequenciamento 5x, 0,5 M do respectivo primer (forward

ou reverse), de 100-200 ng de amostra purificada (produto da PCR) e água ultrapura para completar o volume. As amplificações foram realizadas em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.): desnaturação inicial de 3 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos: 95°C por 15s, 48°C (para os *primers* da região CytB) ou 55°C (para os demais *primers*) por 15s e 60°C por 2min. Posteriormente, foi realizada a precipitação das amostras provenientes das reações de sequenciamento conforme recomendação do fabricante do kit (Applied Biosystems). Os produtos da PCR foram submetidos à leitura em sequenciador ABI PRISM® 3500xl (Applied Biosystems).

A qualidade dos eletroferogramas foi avaliada com o aplicativo Phred-Phrap e as sequências consenso foram geradas pelo aplicativo CAP3 do pacote computacional “Electropherogram Quality Analysis” (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>). As sequências foram comparadas com aquelas depositadas no GenBank (NCBI), com o auxílio da ferramenta “BLAST Search”.

Para o alinhamento das sequências foi utilizado o algoritmo Clustal W, dentro do programa BioEdit v.7.0.5.3 (Hall 1999), sendo o alinhamento produzido checado manualmente.

A qualidade dos dados moleculares usados nos estudos filogenéticos foi testada por meio da análise de saturação dos dados, via correlação entre a distância genética e as taxas de transições (s) e transversões (v), com o programa DAMBE (Xia 2000). Para tanto, foi utilizado o modelo de distância K2P (Kimura-2-Parameter distance model) (Schneider, 2007). As taxas de transição e transversão devem ser diretamente proporcionais às distâncias genéticas, de modo que não haja a intersecção entre as retas que representam a distribuição dos dados. Neste caso verifica-se a não saturação dos dados (Schneider 2007), portanto estes podem ser utilizados nas análises filogenéticas.

Na análise de distância genética das amostras para as sequências da região COI correspondente ao *barcode*, foi utilizado o programa computacional MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011), segundo o modelo K2P, empregando-se o método Neighbor-Joining (NJ) com *bootstrap* com 1000 permutações. O Modelo K2P (1980) leva em consideração as taxas de substituição de transição e transversão, assumindo que as frequências de nucleotídeos são as mesmas e que as taxas de substituição não variam entre os sítios (Tamura *et al.* 2007).

Com o mesmo software e modelo de distância K2P foi calculada a média percentual de substituições de bases por loco das sequências entre os grupos de *E. iopoecila* e *E. roubiki* e a distância entre as sequências destes grupos e das sequências das outras espécies do grupo externo. Esta análise foi realizada tanto para as sequências de cada uma das regiões de genes amplificados (COI região *barcode* e posterior ao *barcode*, CytB, 16S e 28S), quanto para os dados de todos os genes concatenados.

Todas as sequências obtidas foram concatenadas em uma matriz única na tentativa de construir árvores para a análise filogenética com o maior número de dados possível. O programa MEGA 5.1 (Tamura *et al.* 2011) foi utilizado para as análises de máxima parcimônia (MP) e a robustez dos dados foi testada por *bootstrap* com 1000 permutações. O mesmo programa foi utilizado para as análises de máxima verossimilhança (ML) e para selecionar o modelo de substituição nucleotídica. Nas análises de máxima verossimilhança, a matriz de dados foi analisada sob o modelo TRG+G, por meio dos critérios de informação bayesiana (BIC) e Akaike (AIC). Os dados foram gerados após o teste de *bootstrap* com 1000 permutações.

A análise bayesiana foi realizada pelo programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). As buscas pelo método Monte Carlo via cadeias de Markov (MCMC) foram feitas por 4.000.000 de gerações, amostrando uma árvore a cada 100 gerações, as primeiras 4000 árvores obtidas nas primeiras gerações foram excluídas, totalizando 36000

árvores. Para a visualização dos dados gerados pela análise bayesiana foi utilizado o aplicativo Tracer v1.4 (Rambaut e Drummond 2007), em seguida foi utilizado o aplicativo TreeAnnotator 1.4.8 do pacote de programas BEAST (Rambaut e Drummond 2007), para realizar o processo de descarte das árvores iniciais e para gerar as árvores de consenso.

O programa DNASP 5.10.01 (Librado & Rozas 2009) foi utilizado para gerar os dados necessários para a construção de uma rede de relações haplotípicas por meio do programa NETWORK 4.6.10 (www.fluxus-engineering.com). Foram construídas redes de haplótipos para as regiões *barcode* e CytB, além de uma rede de haplótipos para todos os genes concatenados através do método “median-joining” (Bandelt *et al.* 1999).

RESULTADOS

Os tamanhos dos fragmentos obtidos por PCR das regiões dos genes mitocondriais e nuclear para as amostras de *E. iopoecila* e *E. roubiki* e demais amostras de espécies de Euglossini foram, aproximadamente: COI - região amplificada pelos *primers* do *barcode* = 665 pb e, região seguinte ao *barcode*, amplificada pelos *primers* COI = 562 pb; CytB = 754 pb, 16S: 360 pb e 28S = 817 pb (Tabela II).

Após o alinhamento e a correção manual das sequências obteve-se uma matriz com os seguintes valores de caracteres: 665 para a região correspondente ao *barcode*, 562 para a região de COI seguinte ao *barcode*, 721 para CytB, 360 para 16S e 817 para 28S. Todos os genes em conjunto totalizaram uma matriz com 3125 caracteres utilizados para as análises filogenéticas (Tabela II).

Tabela II. Tamanho dos fragmentos amplificados por PCR e número de caracteres analisados após alinhamento e correção das sequências das regiões dos genes COI, CytB, 16S e 28S das amostras de *E. iopoecila* e *E. roubiki*.

Região	Tamanho do fragmento amplificado	Número de caracteres após correção
COI (barcode)	665 pb	665 caracteres
COI (posterior ao barcode)	562 pb	562 caracteres
CytB	754 pb	721 caracteres
16S	360 pb	360 caracteres
28S	817 pb	817 caracteres
Total		3125 caracteres

Os resultados obtidos pelo teste de saturação de substituição para os dados de todos os genes agrupados indicam que a taxa de transição/transversão em relação à distância genética aumenta de forma linear $R^2(s) = 0,9638$ e $R^2(v) = 0,9904$ (Figura 3) e a análise gráfica indica que os dados não estão saturados.

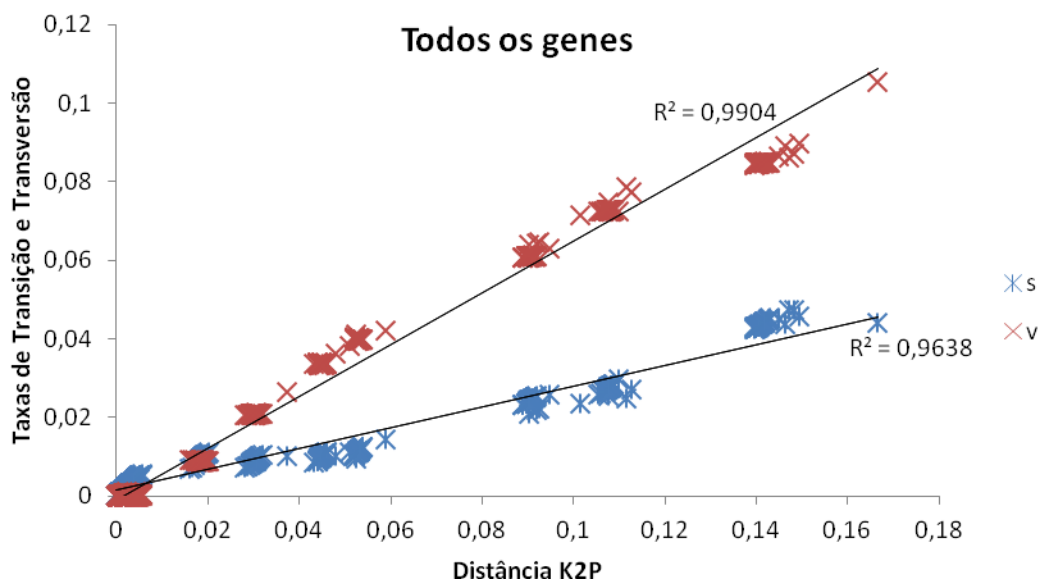


Figura 3. Relação entre as taxas de transições (s) e transversões (v) em relação à distância genética (K2P) para o conjunto de dados concatenados (COI, CytB, 16S e 28S) das amostras de *E. iopoecila* e *E. roubiki*.

Os testes de saturação de substituição para os dados de todos os genes analisados separadamente também indicam que a taxa de transição/transversão em relação à distância genética aumenta de forma linear (Figura 4), indicando que os dados de cada uma das regiões analisadas não estão saturados.

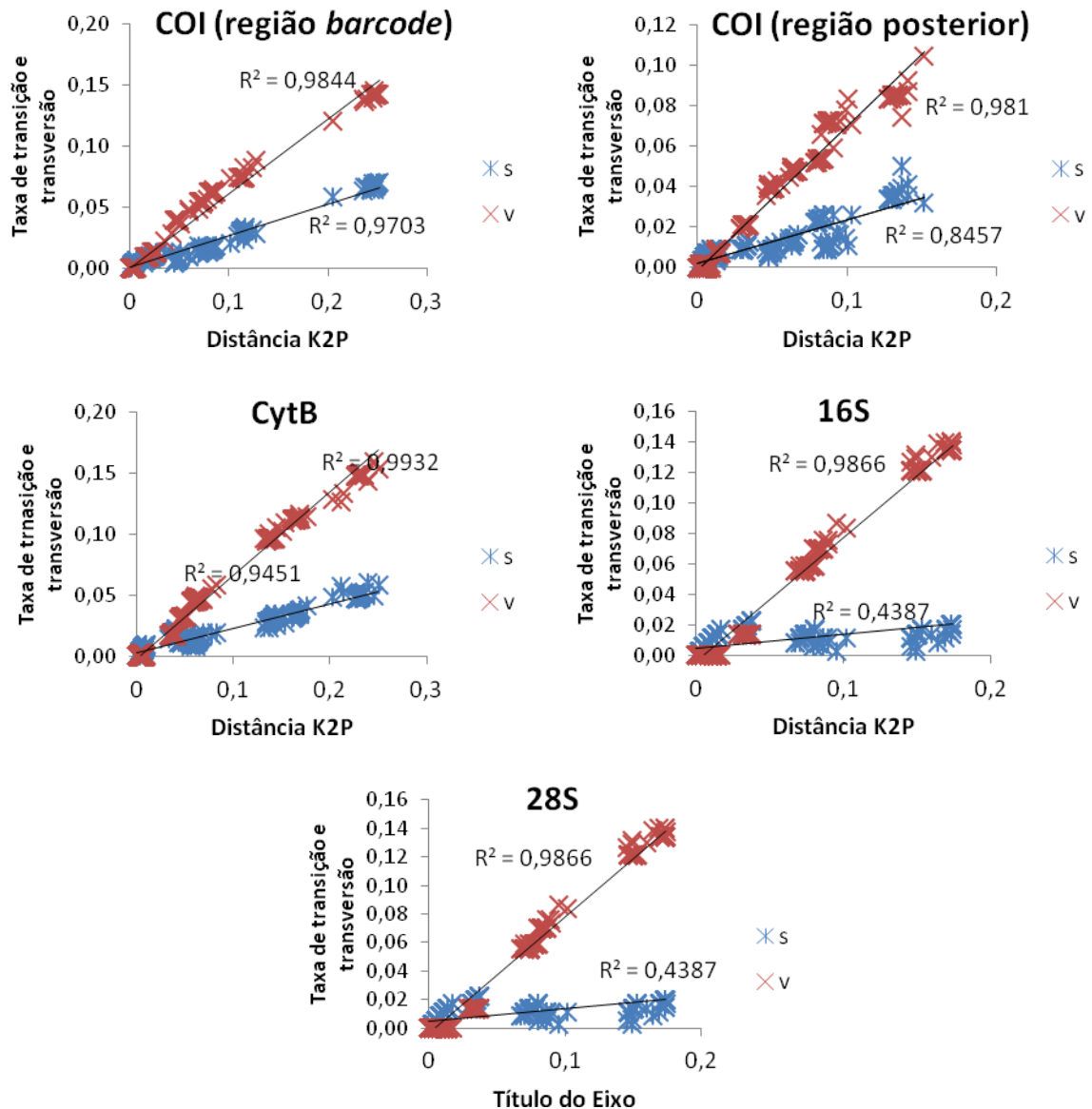


Figura 4. Relação entre as taxas de transições (s) e transversões (v) em relação à distância genética (K2P) nas amostras de *E. iopoecila* e *E. roubiki* para as regiões dos genes: COI (região *barcode*); COI (região posterior ao *barcode*); CytB; subunidade ribossomal 16S; subunidade ribossomal 28S.

As médias de distâncias genéticas (substituições de bases por loco) K2P entre espécies, de acordo com 3125 posições nos genes COI, CytB, 16S e 28S, variaram de 0,3% a 16,7% (Tabela III). Para todas as sequências concatenadas, os valores médios de distância genética encontrados foram: a) 0,3%, entre *E. iopoecila* e *E. roubiki*; b) de 1,8% a 5,9%, entre as demais espécies de *Euglossa*, ressaltando, neste caso, que os menores valores de distância envolvendo *E. iopoecila* e *E. roubiki* e as demais espécies do subgênero *Glossura* foram observados para *E. ignita*; c) de 9% a 11,3% entre os gêneros de Euglossini e, d) acima de 14% para as espécies de Euglossini em relação a *Apis mellifera* (Tabela III).

Tabela III. Média de distância genética K2P entre espécies, de acordo com 3125 caracteres dos genes COI, CytB, 16S e 28S. Diagonal inferior: médias; diagonal superior: desvio padrão (s).

Espécies	<i>A. mel</i>	<i>El. nig</i>	<i>Ef. vio</i>	<i>E. ann</i>	<i>E. ple</i>	<i>E. imp</i>	<i>E. ign</i>	<i>E. iop</i>	<i>E. rou</i>
<i>Apis mellifera</i>	-	0,80%	0,60%	0,80%	0,70%	0,70%	0,70%	0,70%	0,70%
<i>Eulaema nigrita</i>	16,70%	-	0,60%	0,60%	0,60%	0,60%	0,70%	0,70%	0,70%
<i>Eufriesea violacea</i>	14,60%	10,20%	-	0,60%	0,60%	0,60%	0,60%	0,60%	0,60%
<i>E. pleosticta</i>	15,00%	11,30%	9,10%	-	0,40%	0,40%	0,50%	0,40%	0,40%
<i>E. annectans</i>	14,80%	11,20%	9,20%	4,80%	-	0,40%	0,50%	0,40%	0,40%
<i>E. imperialis</i>	14,50%	10,80%	9,20%	5,30%	4,50%	-	0,40%	0,30%	0,30%
<i>E. ignita</i>	14,70%	11,00%	9,50%	5,90%	5,10%	3,70%	-	0,20%	0,20%
<i>E. iopoecila</i>	14,00%	10,80%	9,00%	5,30%	4,50%	3,00%	1,80%	-	0,10%
<i>E. roubiki</i>	14,10%	10,80%	9,10%	5,30%	4,50%	3,00%	1,90%	0,30%	-

A análise de distância genética K2P a partir dos 665 caracteres obtidos para a região correspondente ao *barcode* (porção 5' do gene da citocromo oxidase I) resultou em um valor médio de distância genética entre *E. iopoecila* e *E. roubiki* de 0,23% (Tabela IV). As médias percentuais de substituições de base por loco, dos pares de sequências entre os grupos (considerando as sequências das 72 amostras analisadas e todas as posições dos códons), são apresentadas na Tabela IV.

Tabela IV. Média de distância genética K2P entre espécies analisando 665 caracteres do gene COI região *barcode*. Diagonal inferior: médias; diagonal superior: desvio padrão (s).

Espécies	<i>A. mel</i>	<i>El. nig</i>	<i>Ef. vio</i>	<i>E. ple</i>	<i>E. ann</i>	<i>E. imp</i>	<i>E. ign</i>	<i>E. iop</i>	<i>E. rou</i>
<i>Apis mellifera</i> (<i>A. mel</i>)	-	2,26%	2,23%	2,15%	2,17%	2,17%	2,15%	2,19%	2,18%
<i>Eulaema nigrita</i> (<i>El. nig</i>)	23,61%	-	1,46%	1,49%	1,51%	1,35%	1,40%	1,38%	1,36%
<i>Eufriesea violacea</i> (<i>Ef. vio</i>)	20,48%	10,09%	-	1,18%	1,18%	1,30%	1,33%	1,29%	1,28%
<i>E pleosticta</i> (<i>E. ple</i>)	24,72%	12,36%	7,33%	-	0,85%	0,94%	1,03%	1,07%	1,06%
<i>E annectans</i> (<i>E. ann</i>)	23,67%	12,74%	7,75%	5,13%	-	0,78%	0,94%	0,84%	0,81%
<i>E. imperialis</i> (<i>E. imp</i>)	23,88%	11,44%	8,39%	5,95%	4,17%	-	0,71%	0,59%	0,57%
<i>E. ignita</i> (<i>E. ign</i>)	24,50%	11,61%	8,38%	6,93%	5,95%	3,54%	-	0,51%	0,48%
<i>E. iopoecila</i> (<i>E. iop</i>)	24,95%	11,43%	8,41%	7,28%	4,83%	2,59%	1,82%	-	0,14%
<i>E. roubiki</i> (<i>E. rou</i>)	24,76%	11,26%	8,19%	7,12%	4,67%	2,45%	1,68%	0,23%	-

A distância entre as demais espécies de *Euglossa* variou de 1,68% (entre *E. roubiki* e *E. ignita*) a 7,28% (entre *E. iopoecila* e *E. pleosticta*). Vale destacar também que a distância entre *E. iopoecila* e *E. ignita* foi de apenas 1,82%. Ao se comparar as três espécies do subgênero *Glossura* (*E. ignita*, *E. imperialis* e *E. annectans*), *E. annectans* foi a que se apresentou mais distante geneticamente de *E. roubiki* e *E. iopoecila* (respectivamente, 4,67% e 4,83%). Os valores entre os gêneros de Euglossini variaram de 7,33% a 12,74% e as médias de distância entre as espécies de Euglossini e o controle *Apis mellifera* foram todos acima de 20% (Tabela IV).

Em relação à região do gene COI posterior ao *barcode*, a análise de distância genética K2P a partir dos 562 caracteres obtidos resultou em um valor médio de distância genética entre *E. iopoecila* e *E. roubiki* de 0,47% (Tabela V). Na Tabela V estão apresentadas as médias percentuais de substituições de base por loco, dos pares de sequências entre os grupos.

Tabela V. Média de distância genética K2P entre espécies analisando 562 caracteres do gene COI região posterior ao *barcode*. Diagonal inferior: médias; diagonal superior: desvio padrão (s).

Espécies	<i>A. mel</i>	<i>El. nig</i>	<i>Ef. vio</i>	<i>E. ple</i>	<i>E. ann</i>	<i>E. imp</i>	<i>E. ign</i>	<i>E. iop</i>	<i>E. rou</i>
<i>Apis mellifera</i> (<i>A. mel</i>)	-	1,80%	1,69%	1,63%	1,71%	1,67%	1,68%	1,66%	1,64%
<i>Eulaema nigrita</i> (<i>El. nig</i>)	15,15%	-	1,41%	1,38%	1,43%	1,37%	1,27%	1,32%	1,30%
<i>Eufriesea violacea</i> (<i>Ef. vio</i>)	13,63%	9,30%	-	1,41%	1,29%	1,30%	1,30%	1,25%	1,24%
<i>E pleosticta</i> (<i>E. ple</i>)	14,05%	9,90%	10,35%	-	1,00%	1,07%	1,06%	1,09%	1,08%
<i>E annectans</i> (<i>E. ann</i>)	14,05%	10,12%	8,45%	5,54%	-	1,02%	0,92%	0,96%	0,94%
<i>E. imperialis</i> (<i>E. imp</i>)	13,41%	9,49%	9,08%	6,51%	5,35%	-	0,76%	0,72%	0,71%
<i>E. ignita</i> (<i>E. ign</i>)	13,20%	8,29%	8,24%	6,12%	4,59%	3,46%	-	0,51%	0,48%
<i>E. iopoecila</i> (<i>E. iop</i>)	13,16%	8,88%	8,21%	6,50%	4,96%	3,09%	1,43%	-	0,21%
<i>E. roubiki</i> (<i>E. rou</i>)	13,17%	8,82%	8,17%	6,41%	4,88%	3,19%	1,38%	0,47%	-

Na Tabela VI estão apresentadas as médias percentuais de substituições de base por loco, dos pares de sequências entre os grupos geradas por meio da análise de distância genética K2P a partir de 754 caracteres obtidos para o gene CytB. A análise resultou em um valor médio de distância genética entre *E. iopoecila* e *E. roubiki* de 0,49% (Tabela VI).

Tabela VI. Média de distância genética K2P entre espécies analisando 754 caracteres do gene CytB. Diagonal inferior: médias; diagonal superior: desvio padrão (s).

Espécies	<i>A. mel</i>	<i>El. nig</i>	<i>Ef. vio</i>	<i>E. ple</i>	<i>E. ann</i>	<i>E. imp</i>	<i>E. ign</i>	<i>E. iop</i>	<i>E. rou</i>
<i>Apis mellifera</i> (<i>A. mel</i>)	-	2,07%	2,08%	1,84%	1,88%	1,91%	2,09%	2,01%	2,02%
<i>Eulaema nigrita</i> (<i>El. nig</i>)	24,73%	-	1,71%	1,71%	1,62%	1,62%	1,71%	1,70%	1,71%
<i>Eufriesea violacea</i> (<i>Ef. vio</i>)	23,88%	17,10%	-	1,38%	1,46%	1,44%	1,55%	1,48%	1,50%
<i>E pleosticta</i> (<i>E. ple</i>)	20,34%	16,75%	13,28%	-	0,98%	0,97%	1,13%	0,94%	0,96%
<i>E annectans</i> (<i>E. ann</i>)	21,02%	16,95%	14,36%	6,55%	-	0,99%	1,05%	0,92%	0,93%
<i>E. imperialis</i> (<i>E. imp</i>)	21,34%	15,43%	13,64%	6,26%	6,41%	-	1,00%	0,79%	0,82%
<i>E. ignita</i> (<i>E. ign</i>)	24,94%	17,71%	15,06%	8,35%	7,70%	6,89%	-	0,72%	0,74%
<i>E. iopoecila</i> (<i>E. iop</i>)	22,83%	16,44%	13,72%	6,01%	6,16%	4,61%	3,54%	-	0,18%
<i>E. roubiki</i> (<i>E. rou</i>)	23,10%	16,69%	14,05%	6,19%	6,45%	4,94%	3,81%	0,49%	-

A análise de distância genética K2P a partir de 360 caracteres obtidos para o gene 16S resultou em um valor médio de distância genética entre *E. iopoecila* e *E. roubiki* de 0,86% o que pode ser observado na Tabela VII. Na mesma tabela estão representadas as médias percentuais de substituições de base por loco, dos pares de sequências entre os grupos. No caso das médias de distância genética encontrados entre as amostras de *Euglossa* em relação à amostra de *Apis mellifera* encontra-se uma incongruência, visto que as distâncias são menores do que as encontradas para as amostras de *Euglossa* em relação a *E. nigrita* e *E. violacea*, ambas amostras de Euglossini.

Tabela VII. Média de distância genética K2P entre espécies analisando 360 caracteres do gene 16S. Diagonal inferior: médias; diagonal superior: desvio padrão (s).

Espécies	<i>A. mel</i>	<i>El. nig</i>	<i>Ef. vio</i>	<i>E. ple</i>	<i>E. ann</i>	<i>E. imp</i>	<i>E. ign</i>	<i>E. iop</i>	<i>E. rou</i>
<i>Apis mellifera</i> (<i>A. mel</i>)	-	2,51%	2,28%	1,56%	1,51%	1,47%	0,97%	0,06%	0,43%
<i>Eulaema nigrita</i> (<i>El. nig</i>)	17,45%	-	2,48%	2,42%	2,19%	2,44%	2,48%	2,50%	2,50%
<i>Eufriesea violacea</i> (<i>Ef. vio</i>)	15,07%	17,53%	-	2,22%	2,43%	2,22%	2,40%	2,27%	2,28%
<i>E pleosticta</i> (<i>E. ple</i>)	8,31%	17,10%	15,07%	-	1,60%	1,65%	1,72%	1,55%	1,55%
<i>E annectans</i> (<i>E. ann</i>)	7,72%	15,07%	16,60%	8,67%	-	1,58%	1,63%	1,51%	1,50%
<i>E. imperialis</i> (<i>E. imp</i>)	7,36%	17,44%	14,74%	9,59%	8,98%	-	1,45%	1,45%	1,45%
<i>E. ignita</i> (<i>E. ign</i>)	3,44%	17,50%	16,13%	10,23%	8,99%	7,06%	-	0,96%	0,97%
<i>E. iopoecila</i> (<i>E. iop</i>)	0,07%	17,37%	14,99%	8,30%	7,70%	7,29%	3,39%	-	0,39%
<i>E. roubiki</i> (<i>E. rou</i>)	0,09%	17,40%	15,18%	8,47%	7,87%	7,19%	3,52%	0,86%	-

A partir dos 817 caracteres obtidos para o gene 28S foi realizada a análise de distância genética K2P que resultou em um valor médio de distância genética entre *E. iopoecila* e *E. roubiki* de 0,06% (Tabela VIII). Ainda, nesta tabela podem ser observadas as médias percentuais de substituições de base por loco, dos pares de sequências entre os grupos. As médias de distância genética para os grupos analisados a partir do gene 28S foram mais baixas em relação aos outros genes analisados.

Tabela VIII. Média de distância genética K2P entre espécies analisando 817 caracteres do gene 28S. Diagonal inferior: médias; diagonal superior: desvio padrão (s).

Espécies	<i>A. mel</i>	<i>El. nig</i>	<i>Ef. vio</i>	<i>E. ple</i>	<i>E. ann</i>	<i>E. imp</i>	<i>E. ign</i>	<i>E. iop</i>	<i>E. rou</i>
<i>Apis mellifera</i> (<i>A. mel</i>)	-	0,96%	0,76%	0,93%	0,88%	0,88%	0,87%	0,87%	0,87%
<i>Eulaema nigrita</i> (<i>El. nig</i>)	6,93%	-	0,66%	0,82%	0,82%	0,82%	0,81%	0,80%	0,81%
<i>Eufriesea violacea</i> (<i>Ef. vio</i>)	4,87%	2,93%	-	0,70%	0,71%	0,74%	0,72%	0,72%	0,72%
<i>E pleosticta</i> (<i>E. ple</i>)	7,17%	5,03%	3,69%	-	0,34%	0,40%	0,39%	0,37%	0,38%
<i>E annectans</i> (<i>E. ann</i>)	6,76%	4,86%	3,76%	1,01%	-	0,33%	0,35%	0,33%	0,34%
<i>E. imperialis</i> (<i>E. imp</i>)	6,22%	5,18%	4,09%	1,37%	0,89%	-	0,12%	0,13%	0,12%
<i>E. ignita</i> (<i>E. ign</i>)	6,09%	5,05%	3,96%	1,24%	1,01%	0,12%	-	0,06%	0,02%
<i>E. iopoecila</i> (<i>E. iop</i>)	6,16%	4,98%	3,89%	1,18%	0,95%	0,19%	0,06%	-	0,06%
<i>E. roubiki</i> (<i>E. rou</i>)	6,11%	5,02%	3,94%	1,22%	0,95%	0,15%	0,02%	0,06%	-

As distâncias K2P encontradas entre as sequências da região *barcode* de todas as amostras analisadas pode ser vista na Figura 5.

A partir dos dados das sequências de todas as regiões concatenadas foi possível a análise filogenética e a construção de três árvores com base em modelos de filogenia diferentes: máxima parcimônia (Figura 6), máxima verossimilhança (Figura 7) e análise bayesiana (Figura 8).

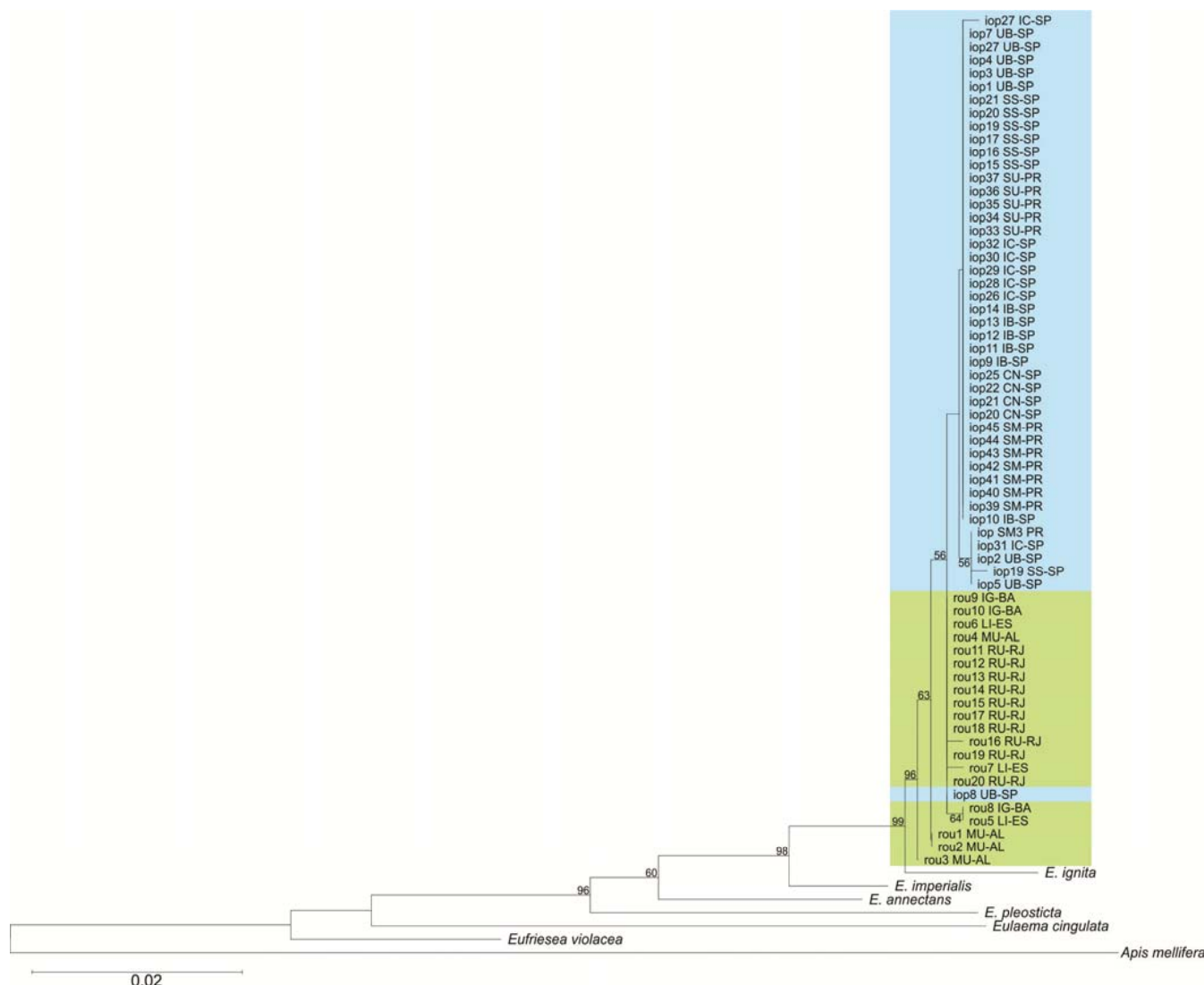


Figura 5. Árvore gerada por Neighbor-Joining com base nos parâmetros de distância genética K2P (Kimura-2-Parameter) a partir das 665 caracteres da sequência *barcode* do gene COI de 65 amostras de *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roubiki* de diferentes localidades. Os valores de *bootstrap* foram calculados no programa computacional MEGA5.1 com 1000 permutações. [iop - *Euglossa iopoecila*; rou - *Euglossa roubiki*; CN – Cananéia (SP); IB – Ilha Bela (SP); IC – Ilha do Cardoso (SP); SM – Reserva Natural Salto Morato (PR); SU – Ilha de Superagui (PR)]. Sete amostras representando as espécies *Euglossa ignita*, *Euglossa imperialis*, *Euglossa annectans*, *Euglossa pleosticta*, *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem aos valores de *bootstrap*. Foram excluídos valores de *bootstrap* abaixo de 50%.

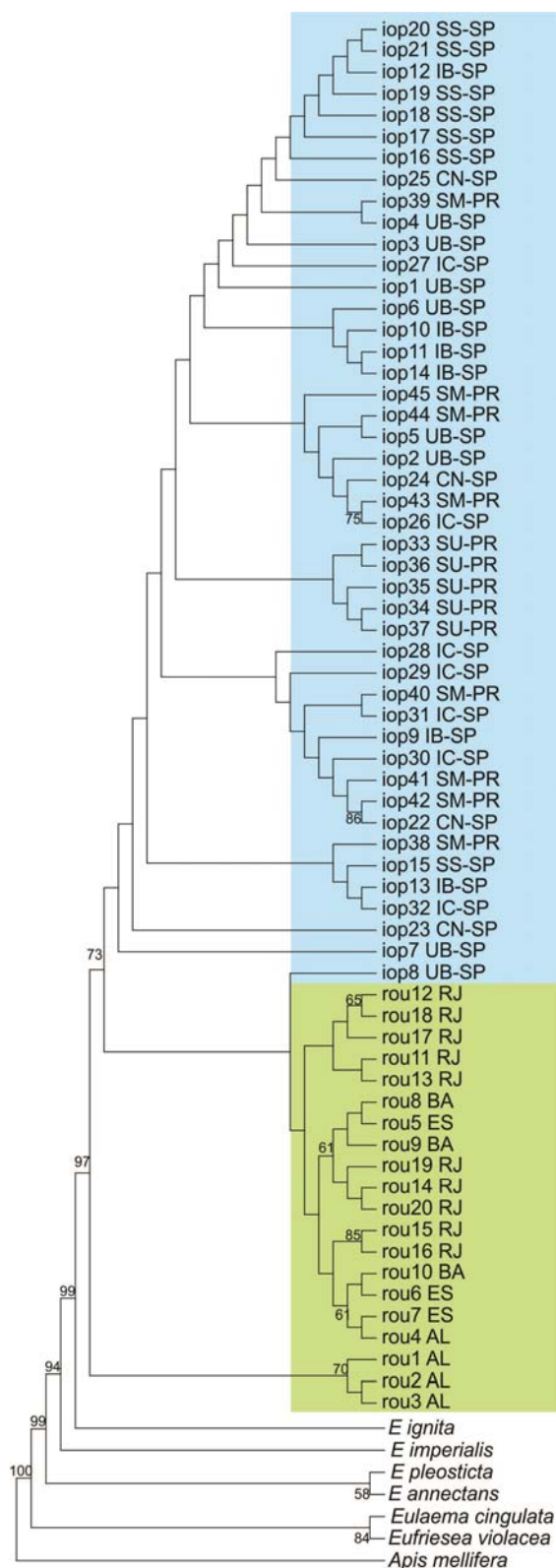


Figura 6. Árvore de máxima parcimônia (MP) de 65 amostras de *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roubiki* de diferentes localidades considerando 3125 caracteres dos genes COI, CytB, 16S e 28S. Os valores de *bootstrap* foram calculados no programa computacional MEGA5.1 com 1000 permutações. [iop - *Euglossa iopoecila*; rou - *Euglossa roubiki*; CN – Cananéia (SP); IB – Ilha Bela (SP); IC – Ilha do Cardoso (SP); SM – Reserva Natural Salto Morato (PR); SS – São Sebastião (SP); SU – Ilha de Superagui (PR); UB – Ubatuba (SP)]. Sete amostras representando as espécies *Euglossa ignita*, *Euglossa imperialis*, *Euglossa annectans*, *Euglossa pleosticta*, *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem aos valores de *bootstrap*. Foram excluídos valores de *bootstrap* abaixo de 50%.

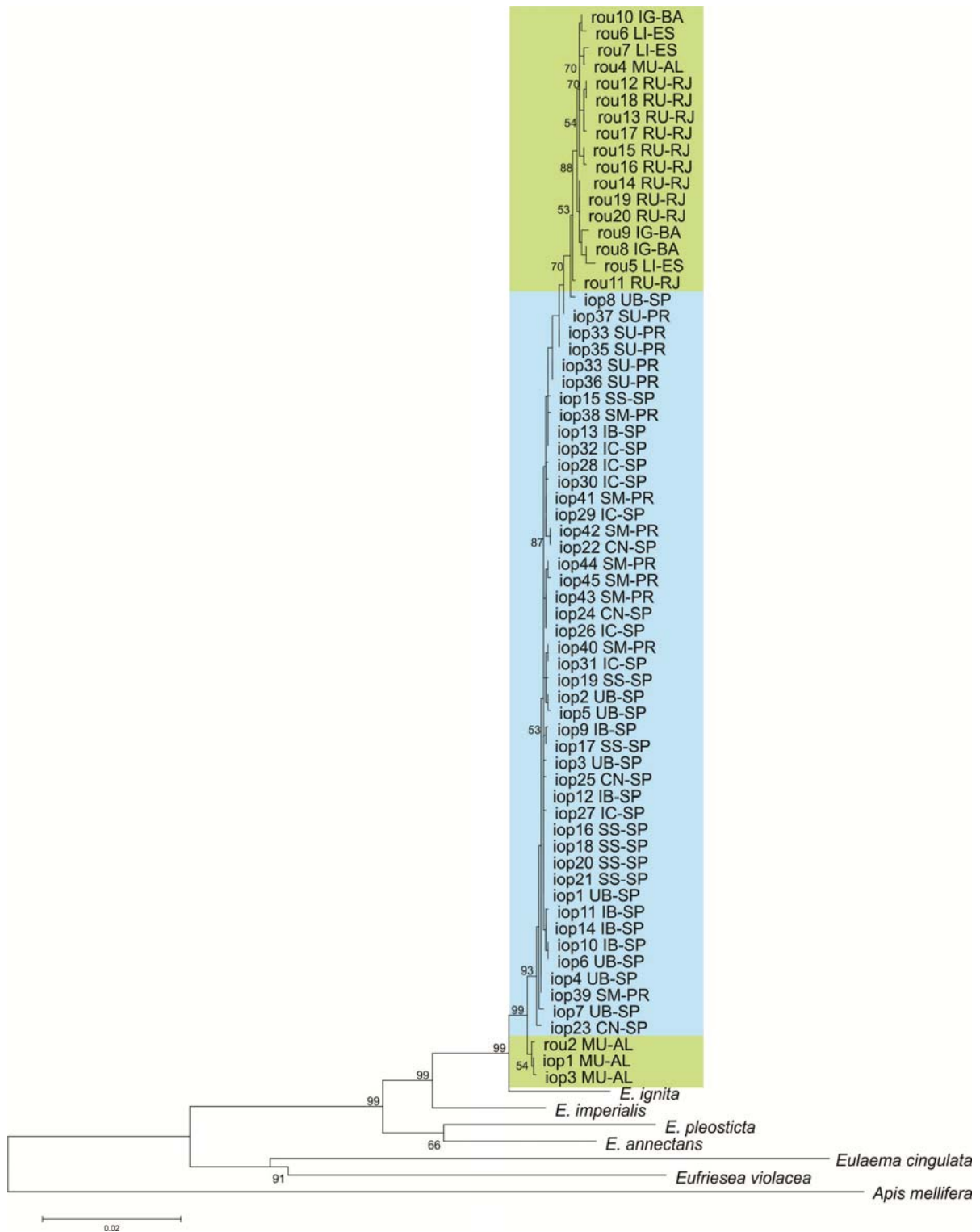


Figura 7. Árvore de máxima verossimilhança (ML) de 65 amostras de *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roubiki* de diferentes localidades considerando 3125 caracteres dos genes COI, CytB, 16S e 28S. Os valores de *bootstrap* foram calculados no programa computacional MEGA5.1 com 1000 permutações. [iop - *Euglossa iopoecila*; rou - *Euglossa roubiki*; CN – Cananéia (SP); IB – Ilha Bela (SP); IC – Ilha do Cardoso (SP); SM – Reserva Natural Salto Morato (PR); SS – São Sebastião (SP); SU – Ilha de Superagui (PR); UB – Ubatuba (SP)]. Sete amostras representando as espécies *Euglossa ignita*, *Euglossa imperialis*, *Euglossa annectans*, *Euglossa pleosticta*, *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem aos valores de *bootstrap*. Foram excluídos valores de *bootstrap* abaixo de 50%.

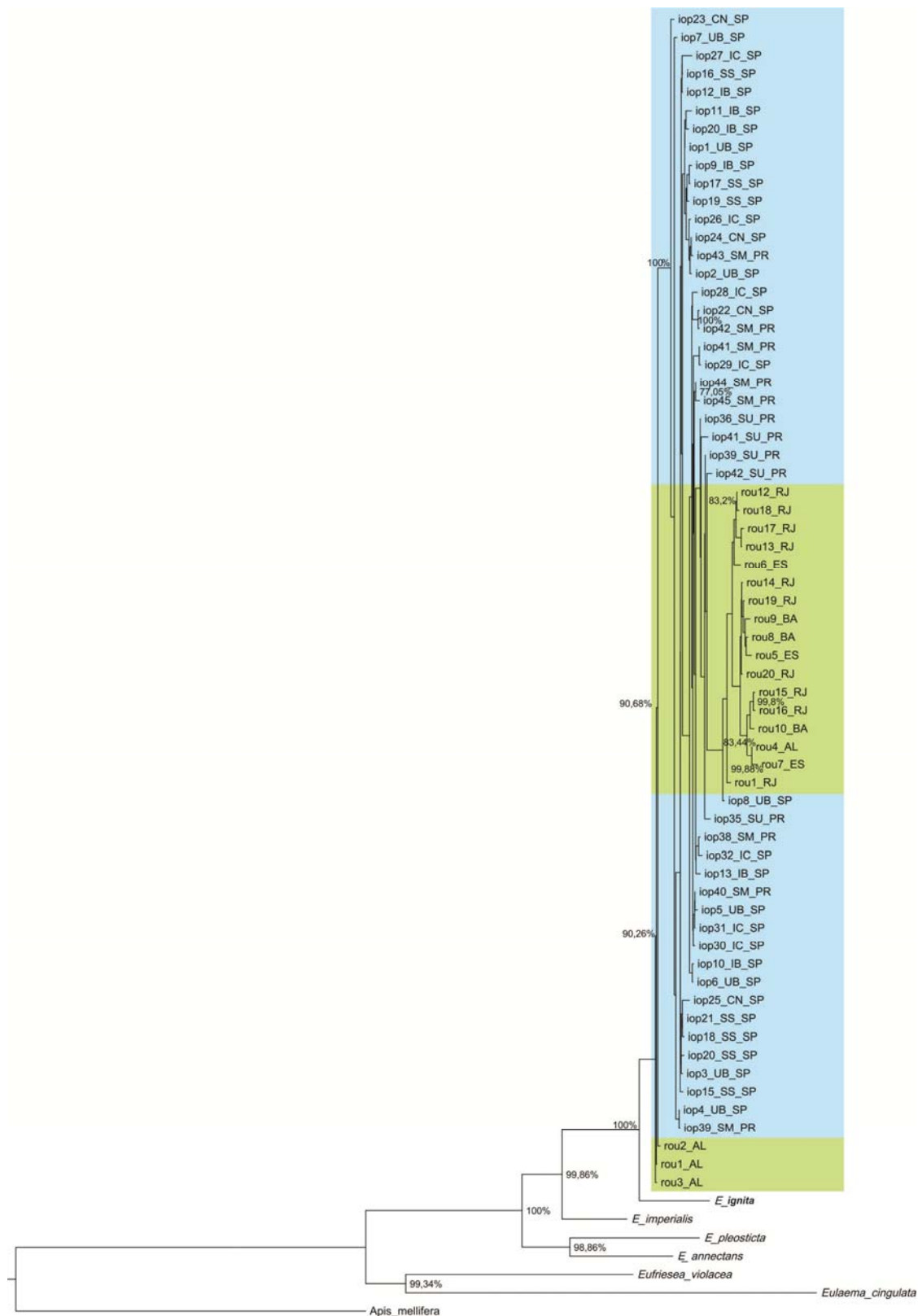


Figura 8. Árvore filogenética criada a partir dos dados da análise bayesiana gerados a partir de 3125 caracteres dos genes COI, CytB, 16S e 28S de 65 amostras de *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roubiki* de diferentes localidades usando o programa MrBayes 3.1.2. [iop - *Euglossa iopoecila*; rou - *Euglossa roubiki*; CN – Cananéia (SP); IB – Ilha Bela (SP); IC – Ilha do Cardoso (SP); SM – Reserva Natural Salto Morato (PR); SS – São Sebastião (SP); SU – Ilha de Superagui (PR); UB – Ubatuba (SP)]. Sete amostras representando as espécies *Euglossa ignita*, *Euglossa imperialis*, *Euglossa annectans*, *Euglossa pleosticta*, *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem às probabilidades posteriores, sendo excluídos valores abaixo de 50%.

Para as árvores de distância genética K2P (região *barcode*) e máxima parcimônia observa-se a formação de dois grupos principais: a) um grupo com todas as amostras das localidades de São Paulo e Paraná, não diferenciando grupos distintos entre as localidades amostradas, indicado pela baixa sustentação dos ramos e, b) um segundo grupo formado por todas as amostras do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia, uma amostra de Alagoas (rou4 AL) e uma amostra de São Paulo (iop8 UB-SP) (Figuras 4 e 5). As árvores de máxima verossimilhança e bayesiana (Figura 6 e 7) mostraram a formação do mesmo grupo de amostras de Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e da amostra de Alagoas, porém as amostras de São Paulo e Paraná não formaram um grupo distinto que agrupasse posteriormente com as amostras de *E. roubiki*.

Deve-se destacar que para as quatro árvores analisadas observa-se a formação de um grupo formado por três amostras de Alagoas (rou1 AL, rou2 AL e rou3 AL) que está em uma posição basal na árvore e se agrupa com as demais amostras/grupos de amostras (Figuras 4, 5, 6 e 7).

Observa-se também que os ramos para os grupos formados por amostras de coloração diferente possuem valores baixos de bootstrap (menos de 50%).

A partir da obtenção das médias de distância genética K2P, geradas a partir da análise dos diferentes genes (Tabelas IV-VIII), verificou-se que os genes COI (em especial a região *barcode*) e CytB foram os que apresentaram valores que diferenciaram os grupos de modo mais consistente. A partir disto, foi obtida uma rede de inter-relações haplotípicas para cada uma destas regiões de genes (Figuras 9 e 10), bem como para os dados de todos os genes combinados (Figura 11). Nestas redes é apresentada a distribuição dos haplótipos nas diferentes localidades.

A análise dos caracteres da sequência *barcode* do gene COI formou uma rede de relacionamento com 10 haplótipos, sendo que ocorreu uma separação entre as regiões de

Alagoas, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro em relação às demais localidades verificado pela diferença entre os haplótipos 1 e 4. Estes haplótipos só compartilham uma localidade (Ubatuba –SP).

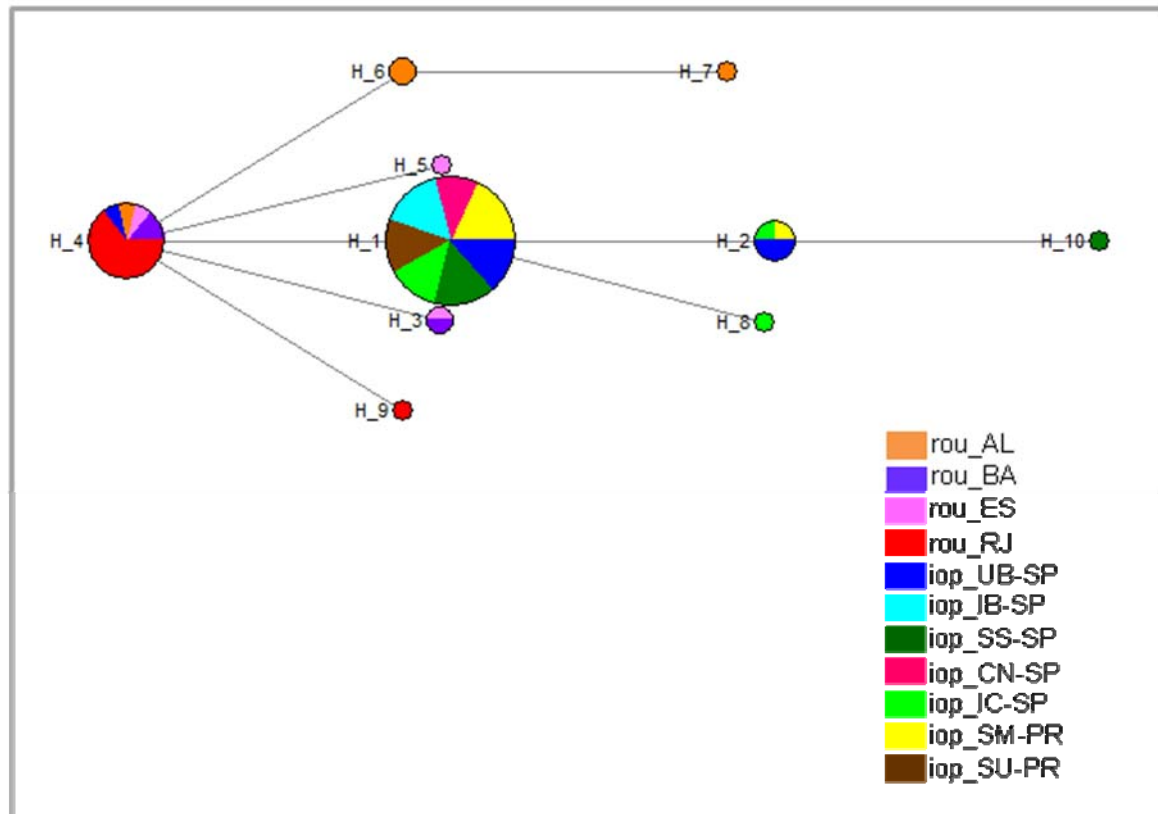


Figura 9. Rede de relacionamento entre os 10 haplótipos gerados pela análise de 665 caracteres da sequência *barcode* do gene COI de 65 amostras de *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roubiki* de 11 localidades. As cores referem-se às localidades. O tamanho dos círculos refere-se à frequência de cada haplótipo. Linhas entre haplótipos indicam apenas um passo mutacional. [iop - *Euglossa iopoecila*; rou - *Euglossa roubiki*; CN – Cananéia (SP); IB – Ilha Bela (SP); IC – Ilha do Cardoso (SP); SM – Reserva Natural Salto Morato (PR); SS – São Sebastião (SP); SU – Ilha de Superagui (PR); UB – Ubatuba (SP)].

A rede de relacionamento formada a partir dos caracteres do gene CytB se constitui de 22 haplótipos, e como na rede de haplótipos do *barcode* possui uma tendência a separação das localidades de Alagoas, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, formando um único grupo e compartilhando um haplótipo (22) presente em Ubatuba. Porém, para esta rede verifica-se o agrupamento de dois haplótipos (11 e 12) presentes em Alagoas, que estão relacionados com os haplótipos das localidades abaixo de Ubatuba-SP.

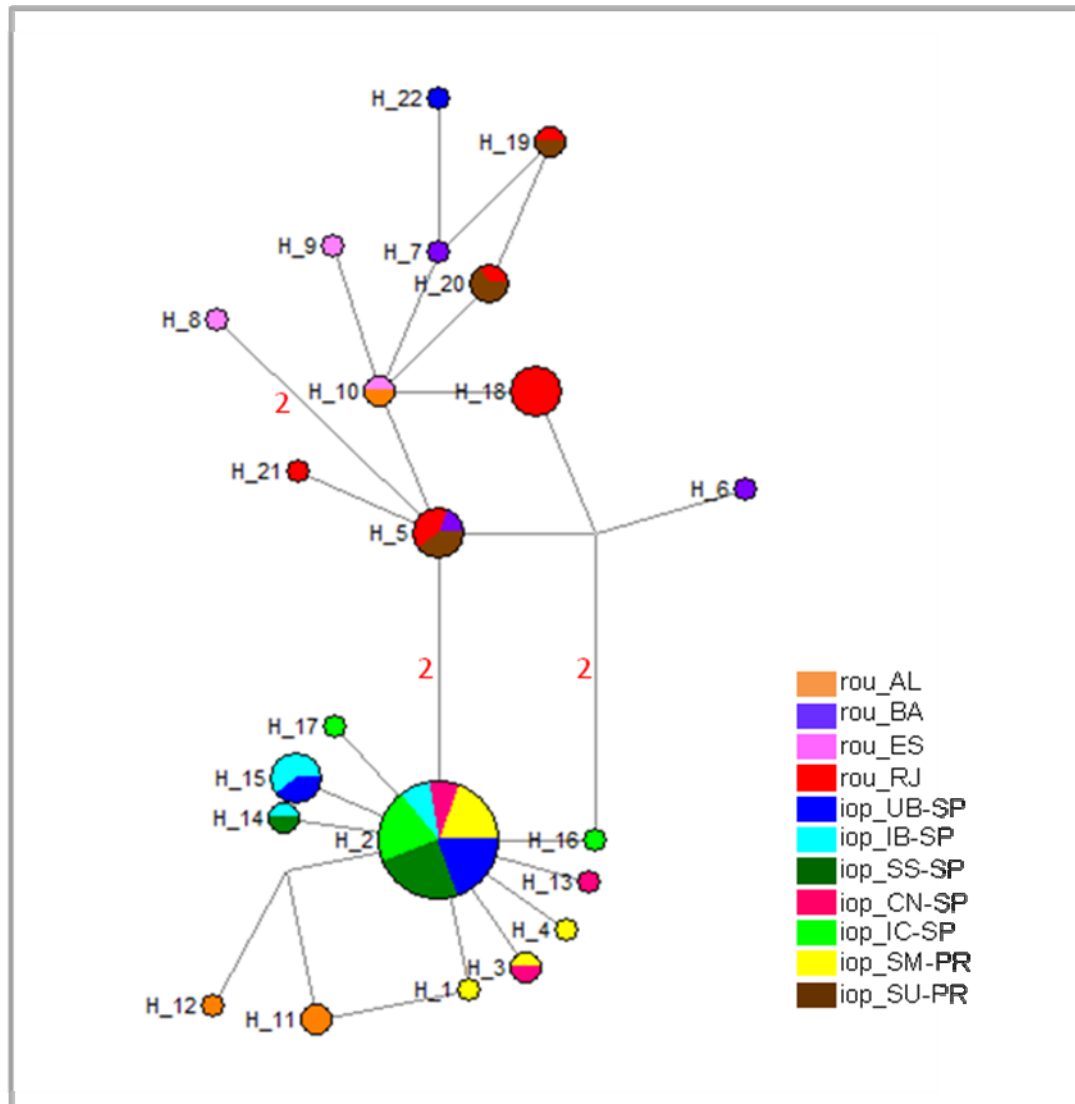


Figura 10. Rede de relacionamento entre os 22 haplótipos gerados pela análise de 754 caracteres da sequência do gene CytB de 65 amostras de *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roubiki* de 11 localidades. As cores referem-se às localidades. O tamanho dos círculos refere-se à frequência de cada haplótipo. Linhas entre haplótipos indicam apenas um passo mutacional. Números em vermelho indicam o número de passos mutacionais quando esses são maiores do que um. [iop - *Euglossa iopoecila*; rou - *Euglossa roubiki*; CN – Cananéia (SP); IB – Ilha Bela (SP); IC – Ilha do Cardoso (SP); SM – Reserva Natural Salto Morato (PR); SS – São Sebastião (SP); SU – Ilha de Superagui (PR); UB – Ubatuba (SP)].

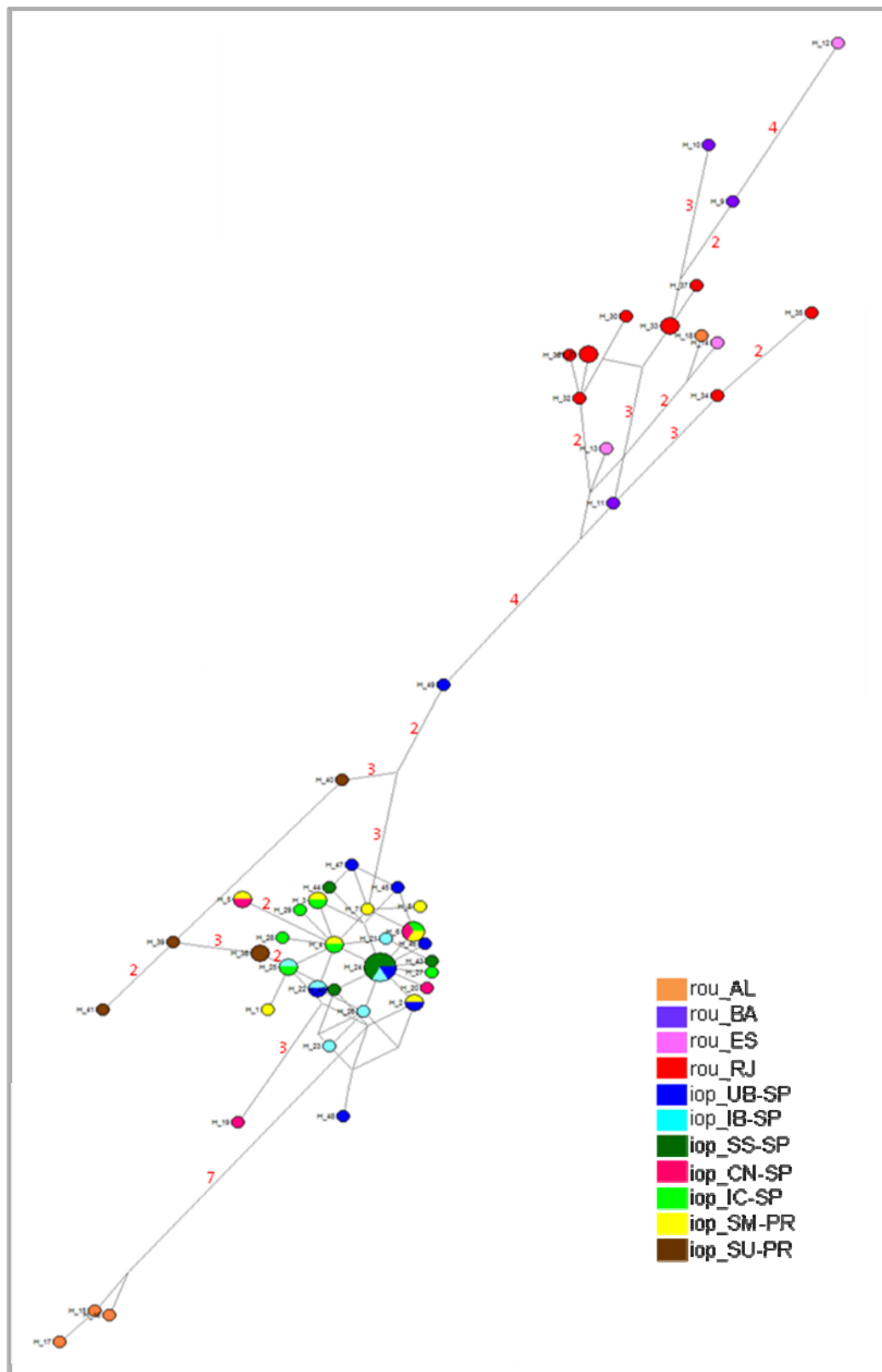


Figura 11. Rede de relacionamento entre os 49 haplótipos gerados pela análise de 3125 caracteres da sequência dos genes COI, CytB, 16S e 28S de 65 amostras de *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roubiki* de 11 localidades. As cores referem-se às localidades. O tamanho dos círculos refere-se à frequência de cada haplótipo. Linhas entre haplótipos indicam apenas um passo mutacional. Números em vermelho indicam o número de passos mutacionais quando esses são maiores do que um. [iop - *Euglossa iopoecila*; rou - *Euglossa roubiki*; CN – Cananéia (SP); IB – Ilha Bela (SP); IC – Ilha do Cardoso (SP); SM – Reserva Natural Salto Morato (PR); SS – São Sebastião (SP); SU – Ilha de Superagui (PR); UB – Ubatuba(SP)].

A análise dos caracteres de todos os genes combinados formou uma rede de relacionamento com 49 haplótipos (Figura 11), que, corroborando as árvores filogenéticas (Figuras 6-8), apresentou haplótipos próximos presentes nas localidades de São Paulo e Paraná e haplótipos das localidades do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia, também próximos entre si. Fazendo a conexão entre estes dois grupos distintos de haplótipos formados, encontra-se um haplótipo de Ubatuba-SP. Além disto, também se encontram haplótipos de Alagoas relacionados aos haplótipos do Paraná e de São Paulo.

DISCUSSÃO

Os valores reduzidos de distância genética (K2P) encontrados para *E. iopoecila* e *E. roubiki*, tanto para a região *barcode* (Tabela II) quanto para as sequências concatenadas de todos os genes (Tabela III), indicam que estas duas espécies, reconhecidas como espécies distintas por Nemésio (2009), constituem na verdade uma única espécie. Trabalhos na literatura que abordam a análise da região *barcode* reconhecem valores de distância K2P inferiores a 1% normalmente como indicativos de uma mesma espécie (Hebert et al. 2003; Waugh 2007). Por exemplo, em um estudo com abelhas do gênero *Ceratina* (Apidae: Xylocopinae), envolvendo análises morfológicas e sequenciamento da região *barcode*, Rehan e Sheffield (2011) encontraram valores de distância K2P entre espécies variando de 1,11% a 1,75% e um valor médio de distância genética igual a 1,38%. Já dentro de espécies, o valor médio obtido relatado por estes autores foi de 0,90%, com as distâncias variando de 0,47% a 1,43%. De modo similar, Li et al. (2010), analisando a região *barcode* de espécies do gênero *Sycophila* (Hymenoptera, Eurytomidae), encontraram valores de distância K2P que variaram de 0% a 1,1% para amostras intra-específicas, enquanto as distâncias inter-específicas variaram de 7,2% a 19,4%.

Além disto, Hebert et al. (2003), ao analisar as sequências da região *barcode* de diversas espécies de animais, incluindo hymenópteros, encontraram dois resultados interessantes: as divergências intraespecíficas encontradas raramente se mostraram superiores a 2%, sendo na maioria das vezes inferior a 1%; nos casos em que as divergências encontradas foram grandes, normalmente, estas estavam correlacionadas com isolamento geográfico passado. Os resultados obtidos com as análises de distância K2P para *E. roubiki* e *E. iopoecila* se mostraram de acordo com os valores de distância intraespecíficas encontrados por estes autores. O mesmo pode ser dito em relação aos resultados de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e bayesiana, que apresentaram valores baixos nos ramos entre os grupos de *E. iopoecila* e *E. roubiki*.

Em relação à tendência de formação de dois grupos distintos, um reunindo indivíduos identificados como *E. iopoecila* e outro, agrupando indivíduos de *E. roubiki*, não se pode descartar a possibilidade de que a ação de eventos climáticos antigos, tais como as flutuações climáticas do Quaternário tardio, teriam influenciado as formações vegetais abertas (Oliveira-Filho e Ratter 1995, 2000), e atuado indiretamente sobre populações de tais abelhas. De fato, há indícios de que mudanças climáticas ocorridas durante o Quaternário resultaram em áreas mais secas ao longo da costa da Mata Atlântica, com avanços de savanas e caatingas na costa leste mais ao sul do estado do Rio de Janeiro (Ab'Saber 2003), o que poderia ter ocasionado uma separação temporária de populações presentes acima e abaixo da região entre São Paulo e Espírito Santo. De acordo com a “Teoria dos Refúgios Florestais” (Ab'Saber 1992), devido à diversas variações climáticas no Pleistoceno terminal, com a presença de uma fase mais seca e fria, as florestas da América do Sul (incluindo a Mata Atlântica) foram reduzidas a pequenos refúgios nos quais ainda permaneciam áreas com umidade (Viadana e Cavalcante 2007). Estes pequenos refúgios estariam isolados pelas áreas mais secas, o que propiciaria condições para a diferenciação (Viadana e Cavalcante 2007).

Modelos como o de teoria de refúgios são utilizados na tentativa de formular hipóteses sobre a história das biotas, incluindo mudanças que ocorreram nestas áreas (Da Silva e Pinto-da-Rocha 2011). Além disto, a análise dos padrões distribucionais de diversos táxons (como áreas de endemismo) pertencentes à Mata Atlântica é uma das formas de se inferir sobre a história biogeográfica deste bioma (Da Silva e Pinto-da-Rocha 2011).

Da Silva e Pinto-da-Rocha (2011) analisando trabalhos que abrangem áreas de endemismo de diversos organismos, as quais seriam possivelmente se trataram de refúgios antigos, chegaram a quatro áreas principais pertencentes à Mata Atlântica: uma no centro de Pernambuco, uma no centro sul da Bahia, uma relacionada com a Serra do Mar e outra relacionada às Florestas de Araucária. Aguiar et al. (2005) também sugerem quatro áreas de endemismo, três delas corroborando os resultados de Da Silva e Pinto-da-Rocha (2011): Pernambuco, Bahia, Rio Doce (Espírito Santo) e Paulista (São Paulo e Paraná). Assim, os resultados de agrupamento entre os indivíduos de *E. iopoecila* e *E. roubiki* corroboram, pelo menos em parte, a divisão destas áreas, ressaltando que os representantes das das espécies incluídas neste trabalho foram encontrados em três grupos principais: um que reúne amostras do Paraná e São Paulo, outra que reúne indivíduos do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia e outro grupo com as amostras de Alagoas. A formação entre três áreas endêmicas: Serra do Mar, centro e costa da Bahia e Pernambuco foi também encontrada em estudos de aves endêmicas da Mata Atlântica (DaSilva et al. 2004) e para espécies de opiliões (Da Silva e Pinto-da-Rocha 2011).

Para que a hipótese de que *E. iopoecila* e *E. roubiki* constituem de fato uma única espécie nos fragmentos de Mata Atlântica, como sustentado por Faria Jr e Melo (2007), e não duas espécies como proposto por Nemésio (2009), seria necessário encontrar indivíduos morfologicamente e geneticamente intermediários, o que possivelmente indicaria a presença de um gradiente. Faria Jr. e Melo (2007) observaram a existência de indivíduos com

coloração intermediária entre o azul-violeta das populações do Paraná e Santa Catarina e o verde das populações de Espírito Santo e Bahia. Estes indivíduos estariam presentes em Ubatuba (SP) e no norte do estado do Rio de Janeiro (Faria Jr e Melo 2007). No presente trabalho, ao se analisar os agrupamentos formados pelos diferentes indivíduos de *E. iopoecila* e *E. roubiki* coletados desde o estado do Paraná até Alagoas, foi observado que um indivíduo de Ubatuba (iop1-7 UB-SP) se agrupou com aqueles do Paraná, enquanto que outro indivíduo (iop8 UB-SP) da amostra de Ubatuba formou um agrupamento com machos das amostras do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e um indivíduo de Alagoas.

Aguiar et al. (2005) além de destacar as áreas de endemismo principais da Mata Atlântica, apresenta os chamados corredores de biodiversidade, os quais são estabelecidos como áreas de prioridade para conservação, no caso da Mata Atlântica os autores identificam os Corredores Central (que reúne as regiões de endemismo da Bahia e Espírito Santo) e da Serra do Mar (Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro). Neste trabalho observou-se que estes corredores, os quais se constituem de diversos fragmentos, também possuem uma importância na preservação de *E. iopoecila* e *E. roubiki*, com destaque para a área de Ubatuba que aparentemente constitui uma zona híbrida e, portanto, tem uma importância na conservação da biodiversidade destes organismos.

Considerando os resultados do presente estudo, mesmo que os dados demonstrem que as populações que possuem coloração diferenciada provavelmente tiveram algum tipo de isolamento antigo, este não foi suficiente para diferenciar as populações em espécies distintas, já que os valores de distância genética encontrados foram muito pequenos. Além disto, as análises de filogenia também reforçam a ausência de diferenciação em espécies, pois mesmo formando três grupos principais, estes possuem baixos valores de sustentação nos ramos.

No que se refere à relação entre os indivíduos analisados como *E. roubiki* e *E. iopoecila* e demais espécies, uma consideração deve ser feita no caso de *E. ignita*, que

apresentou valores de distância abaixo de 2% em relação a essas. *E. ignita* pertence ao mesmo subgênero (*Glossura*) de *E. iopoecila*, é encontrada na América Central, na Bacia Amazônica e na Mata Atlântica (até o sul de Rio de Janeiro) (Faria Jr e Melo, 2007), diferentemente de *E. iopoecila* e *E. roubiki* descritos exclusivamente para a região de Mata Atlântica (Faria Jr e Melo, 2007; Nemésio, 2009). A similaridade elevada entre ambas encontra suporte na origem recente da tribo Euglossini, atribuída entre 27 e 42 milhões de anos a.p. Dick et al. 2004 e Ramírez et al. 2010 consideram Euglossini um grupo relativamente recente dentro da superfamília Apoidea, a qual tem sua origem presumida no Mesozóico, por volta de 120 milhões de anos atrás (Grimaldi e Engel 2005).

Assim, com base nestas informações, pode-se concluir que os espécimes analisados de *E. iopoecila* e *E. roubiki* constituem uma mesma espécie. Contudo, tais resultados não permitem descartar a hipótese de que *E. iopoecila* e *E. roubiki* poderiam pertencer a populações diferentes, ou ainda, que ao longo do tempo, possam ser consideradas duas subespécies. Neste contexto, a variação na coloração do tegumento proposta por Faria Jr e Melo (2007) para populações de *E. iopoecila* parece válida, embora outras questões, além de condições ambientais e fisiologia de *E. iopoecila* ao longo de seu gradiente latitudinal de distribuição, possam estar relacionada às diferenças de coloração exibidas pelos indivíduos desta espécie. Por outro lado, embora os resultados aqui apresentados sugiram fortemente que a similaridade genética entre as populações não suporte a distinção de *E. iopoecila* e *E. roubiki* em espécies distintas, como sugerido por Nemésio (2009), os mesmos resultados corroboram a sua hipótese de que existem diferenças genéticas relacionadas às diferenças de coloração apresentada por tais abelhas.

Por fim, vale destacar que, para estudos futuros que visem à conservação de populações de *E. iopoecila*, deve-se considerar uma faixa mais ampla de ocorrência desta abelha nas áreas de Mata Atlântica do que aquela proposta por Nemésio (2009). Os resultados

obtidos no presente estudo lançam luz para a elucidação de problemas taxonômicos envolvendo *E. iopoecila* e comprovam, uma vez mais, a aplicabilidade de análises genéticas moleculares na resolução de dúvidas taxonômicas.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro do projeto, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROCAD) pelo apoio financeiro e pela bolsa de K.M. Suzuki. A Rafael E.S. Penha, Douglas C. Giangarelli, Samuel Boff e Guaraci D. Cordeiro pelas amostras cedidas para este trabalho. A Maria Cecília F. Ferronato pelas fotos. Ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal – IAPAR e Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas - UEL.

REFERÊNCIAS

- Ab'Saber A.N. (1992) A teoria dos refúgios: Origem e significado. Rev. Inst. Flor., Edição especial, 4, 29-34.
- Ab'Saber A.N. (2003) Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas., São Paulo: Atelié Editorial.
- Aguiar A.P., Chiarello A.G., Mendes, S.L., Matos, E.N. Os Corredores Central e da Serra do Mar na Mata Atlântica brasileira. In: Galindo-Leal, C., Câmara, I.G. (Eds.) **Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas**. Belo Horizonte: Conservação Internacional. 2005. 472p.
- Aguiar W.M., Gaglianone M.C. (2008) Comunidade de abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em remanescentes de Mata Estacional Semidecidual sobre Tabuleiro no Estado do Rio de Janeiro. Neotrop. Entomol. 37, 118-125.
- Arias M.C., Sheppard W.S. (1996) Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence, Mol. Phylogenet. Evol. 5, 557-566.
- Arias M.C., Brito R.M., Francisco F.O., Moretto G., 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.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular biology and evolution, 16, 37-48.
- Bembé B. (2004) Revision der *Euglossa cordata*-gruppe und untersuchungen zur funktionsmorphologie und faunistik der Euglossini (Hymenoptera, Apidae). Tese de doutorado. LMU München: Faculty of Biology, Munique.
- Cameron S.A. (2004) Phylogeny and biology of Neotropical Orchid bees (Euglossini), Annu. Rev. Entomol. 49, p.377-404. 2004
- Costa M.A., Del Lama M.A., Melo G.A.R., Sheppard W.S. (2003) Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences, Apidologie 34, 73-84.

DaSilva MB, Pinto-da-Rocha R (2011) História Biogeográfica da Mata Atlântica: Opiliões (Arachnida) como Modelo para sua Inferência. In: Biogeografia da America do Sul Padrões & Processos (eds. Carvalho CJB, Almeida EAB), pp. 221–238. São Paulo.

DaSilva J.M.C., Souza M.C., Castelleti C.H.M. (2004) Areas of endemism for passerine birds in the Atlantic forest, South America, Global Ecol. Biogeogr. 13, 85-92.

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, p.3775-3785.

Dressler R.L. (1978) An infrageneric classification of *Euglossa*, with notes on some features of special taxonomic importance (Hymenoptera: Apidae), Rev. Biol. Trop., 26, 187-198.

Dressler, R.L. (1982a) Biology of orchid bees (Euglossini), Annu. Rev. Ecol. Syst. 13, 373-394.

Dressler R.L. (1982b) New species of *Euglossa* II. (Hymenoptera: Apidae), Rev. Biol. Trop. 30, p.121-129.

Dressler R.L. (1982c) New species of *Euglossa*. III. The *bursigera* species group (Hymenoptera: Apidae), Rev. Biol. Trop. 30, p.131–140.

Dressler R.L. (1982d) New species of *Euglossa*. IV. The *cordata* and *purpurea* species groups (Hymenoptera: Apidae), Rev. Biol. Trop. 30, 141–150.

Drummond A.J., Rambaut A. (2007) BEAST: bayesian evolutionary analysis by sampling trees, BMC Evol. Biol. 7, 214.

Faria Jr., L.R.R., Melo, G.A.R. (2007) Species of *Euglossa* (*Glossura*) in the Brazilian Atlantic forest, with taxonomic notes on *Euglossa stellfeldi* Moure (Hymenoptera, Apidae, Euglossina), Rev. Bras. Entomol. 51, 275-284.

Frézal L., Leblois R. (2008) Four years of DNA barcoding: current advances and prospects, Infect. Genet. Evol. 8, 727-736.

Grimaldi D., Engel M.S. (2005) Evolution of the insects, New York: Cambridge University Press.

- Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Nucl. Acids. Symp. Ser. 41, 95-98.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., de Waard J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes, Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 270, 313-321.
- Hebert P.D.N., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H., Hallwachs, W. (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 14812-14817.
- Hines H.M., Hunt J.H., O'Connor T.K., Gillespies J.J., Cameron S.A. (2007) Multigene phylogeny reveals eusociality evolved twice in vespid wasps, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 3295–3299.
- Kuhlmann M., Else G.R., Dawson A., Quicke D.L.J. (2007) Molecular, biogeographical and phenological evidence for the existence of three western European sibling species in the *Colletes succinctus* group (Hymenoptera: Apidae), Org. Divers. Evol. 7, 155-165. 2007.
- Li Y., Zhou X., Feng G., Hu H., Niu L., Hebert P.D.N., Huang D. (2010) COI and ITS2 sequences delimit species, reveal cryptic taxa and host specificity of fig-associated *Sycophila* (Hymenoptera, Eurytomidae), Mol. Ecol. Resour. 10, 31-40.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. 25, 1451–2.
- Lopez-Uribe M.M., Del Lama M.A. (2007) Molecular identification of species of the genus *Euglossa* Latreille (Hymenoptera: Apidae, Euglossini), Neotrop. Entomol. 36, 712-720.
- Michener C.D. The bees of the world. Baltimore, Maryland. John Hopkins University Press. 913 p. 2007.
- Nemésio A. (2009) Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of the Brazilian Atlantic Forest, Zootaxa 2041, 1-242.
- Oliveira-Filho A.T., Ratter J.A. (1995) A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns, Edinb. J. Bot. 52, 141-194.

Oliveira-Filho A.T., Ratter J.A. (2000) Padrões florísticos das matas ciliares da região dos cerrados e a evolução das paisagens do Brasil Central durante o Quaternário tardio. In: Rodrigues R.R., Leitão Filho H.F. (Org.). Matas Ciliares: Bases multidisciplinares para estudo, conservação e restauração. São Paulo: EDUSP, Editora da Universidade de São Paulo, p. 73-89.

Rambaut A., Drummond A.J. (2007) Tracer v1.4, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>

Ramírez S.R., Roubik D.W., Skov C., Pierce N.E. (2010) Phylogeny, diversification patterns and historical biogeography of euglossine orchid bees (Hymenoptera: Apidae), Biol. J. Linn. Soc. 100, 552-572.

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*, Syst. Entomol. 32, 26-39.

Rasmussen C., Cameron S.A. (2010) Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal, Biol. J. Linn. Soc. 99, 206–232.

Rehan S.M., Sheffield, C.S. (2011) Morphological and molecular delineation of a new species in the *Ceratina dupla* species-group (Hymenoptera: Apidae: Xylocopinae) of eastern North America, Zootaxa 2873, 35–50.

Ronquist F., Huelsenbeck J.P. (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models, Bioinformatics (Oxf.) 19, 1572-1574

Roubik D.W. (2004) Sibling Species of *Glossura* and *Glossuropoda* in the Amazon Region (Hymenoptera: Apidae: Euglossini), J. Kans. Entomol. Soc. 77, 235–253.

Roubik D.W., Hanson P.H. (2004) Orchid bees of Tropical America, Biology and field guide. Heredia, Costa Rica. INBio Press.

Schneider H. (2007) Métodos de análise filogenética: um guia prático. 2ª Ed. Ribeirão Preto: Holos Editora.

Sheffield C.R., Hebert P.D.N., Kevan P.G., Packer L. (2009) DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies, *Mol. Ecol. Resour.* 9, 196-207.

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, *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87, 651-701.

Sofia S.H., Suzuki K.M. (2004) Comunidades de machos de abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em fragmentos florestais no Sul do Brasil, *Neotrop. Entomol.* 33, 693-702.

Suzuki K.M., Arias M.C., Giangarelli D.C., Freiria G.A., Sofia, S.H. (2010) Mitochondrial DNA diversity of orchid bee *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera, Apidae) populations assessed by PCR-RFLP, *Biochem. Genet.* 48, 326-341.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution.*

Viadana A.G., Cavalcanti A.P.B. (2007) A teoria dos refúgios florestais aplicada ao Estado de São Paulo, *RCGS*, 8/9, 61-80, available at www.uvanet.br/rcgs.

Waugh J. (2007) DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls, *BioEssays* 29, 188–197.

Xia X. (2000) Data analysis in molecular biology and evolution. Kluwer Academic Publishers. Boston/Dordrecht/London.

Capítulo 3**Filogenia de espécies de *Euglossa* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) pertencentes à Mata Atlântica**

Karen M. Suzuki¹, Wilson Frantine da Silva¹, Fernanda S. de Almeida¹ e Silvia H. Sofia¹

¹Laboratório de Genética e Ecologia Animal, Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, km 380, 86051-980, Londrina, PR, Brasil. e-mail: suzukibio@yahoo.com.br

Manuscrito a ser submetido à Revista Biological Journal of the Linnean Society

Resumo

As espécies do gênero *Euglossa* têm sido alvo de diversos trabalhos envolvendo a taxonomia dos diversos grupos. O gênero possui seis subgêneros (*Glossuopoda*, *Glossura*, *Glossurella*, *Dasystilbe*, *Euglossella* e *Euglossa s.s.*) e 12 grupos de espécies. Alguns trabalhos têm indicado divergências quanto ao *status* taxonômico de algumas espécies do gênero. Outros discutem sobre a subdivisão em subgêneros diferentes, visto que análises filogenéticas com base em características morfológicas e moleculares têm apresentado parafilelismo em ramos de subgêneros diferentes. Várias espécies de *Euglossa* com distribuição endêmica à Mata Atlântica, ou ainda com ocorrência reconhecida, mas não exclusiva a este bioma, continuam à espera de maiores estudos que possam melhor embasar as relações filogenéticas destas dentro deste gênero de Euglossini. No presente trabalho foi realizado uma análise comparativa de sequências de parte das regiões COI e 16S rDNA do DNA mitocondrial e região 28S rDNA do DNA nuclear de diferentes espécies de *Euglossa* da Mata Atlântica brasileira. Foram realizadas análises tanto das sequências dos genes separadamente, como concatenadas. Verificou-se que as árvores filogenéticas geradas por cada um dos genes não foi suficiente para o arranjo confiável de todas as topologias, o que foi obtido com a análise de todos os genes combinados. As análises de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e bayesiana sustentam os resultados de outros trabalhos que apontam *Euglossella* como grupo irmão dos outros subgêneros de *Euglossa*. Porém, alguns ramos continuam se mostrando parafiléticos e apontam um agrupamento entre os subgêneros *Glossura*, *Glossurella* e *Glossuopoda*, o que reforça a necessidade de uma revisão dos subgêneros de *Euglossa*.

Palavras-Chave: Abelhas das orquídeas; sequenciamento; análises filogenéticas; subgêneros.

INTRODUÇÃO

As abelhas da tribo Euglossini conhecidas popularmente como abelhas das orquídeas (Dressler, 1982a; Ackerman, 1983; Roubik & Hanson, 2004) constituem importantes polinizadores da região Neotropical (Dressler, 1982a; Roubik & Hanson, 2004), sendo encontradas desde o México até a região central da Argentina e domínios do Paraguai (Michener, 1974; Dressler, 1982a; Roubik & Hanson, 2004), possuindo ainda duas espécies de Euglossini encontradas no sul dos Estados Unidos (Minckley & Reyes, 1996; Skov & Wiley, 2005).

A tribo Euglossini se originou por volta de 42 a 38 milhões de anos, provavelmente na América do Sul, onde ocorre o maior número de espécies do grupo (Rebêlo, 2001). Com base em dados moleculares a diversificação do mesmo teria se dado em época geológica relativamente recente, aparentemente nos últimos 20 a 15 milhões de anos (Dick *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2010).

Esta tribo de abelhas pertence à família Apidae e forma juntamente com outras três tribos (Apini, Meliponini e Bombini) desta família o clado das abelhas corbiculadas.

A tribo Euglossini possui cinco gêneros (*Euglossa*, *Eulaema*, *Eufriesea*, *Exaerete* e *Aglae*), sendo o gênero *Euglossa* o mais rico em número de espécies, com mais de 110 espécies reconhecidas (Ramírez *et al.*, 2010), distribuídas em seis subgêneros (*Glossuropoda*, *Glossura*, *Glossurella*, *Dasystilbe*, *Euglossella* e *Euglossa s.s.*) e 12 grupos de espécies (Dressler, 1978; Dressler, 1982b,c,d; Cameron, 2004). As abelhas deste gênero possuem coloração metálica brilhante, que varia de verde ao dourado ou acobreado, ou ainda de verde para azul a violeta (Cameron, 2004; Roubik & Hanson, 2004).

Cada um dos grupos de *Euglossa* possui uma espécie representativa, assim, os grupos foram distribuídos nos subgêneros: *Glossuropoda* (dois grupos: *intersecta* e *rugilabris*),

Glossura (dois grupos: *piliventris* e *stellfeldi*), *Glossurella* (grupo *bursigera*), *Dasystilbe* (grupo *villosa*), *Euglossella* (grupo *viridis*) e *Euglossa* (cinco grupos: *analís*, *viridíssima*, *cybelia*, *purpurea* e *cordata*) (Cameron, 2004).

Das 110 espécies conhecidas, cerca de 35 destas estão presentes na região da Mata Atlântica (Nemésio, 2009), e ainda, tanto para a região da Mata Atlântica como para outros biomas novas espécies têm sido descritas (Hinojosa-Díaz & Engel, 2011; Nemésio, 2011), de modo que a riqueza destas abelhas ainda é subestimada (Faria & Melo, 2012).

Em relação à taxonomia das espécies do gênero, a literatura têm apontado espécies que se encontram em situação duvidosa quanto ao real *status* taxonômico, sendo alvo de discussão na literatura, muitos destes casos se devem à controvérsias em relação a coloração dos indivíduos das diferentes populações ou ainda na utilização de fêmeas como holótipo das espécies (Faria Jr & Melo, 2007; Nemésio, 2009).

A classificação quanto aos subgêneros e grupos também tem sido recentemente discutida por meio de trabalhos moleculares e morfológicos (Hinojosa-Díaz, 2010; Ramírez *et al.* 2010). Faria Jr e Melo (2007) em seu trabalho sugerem a modificação de *Euglossa stellfeldi* antes pertencente ao subgênero *Glossura* para *Glossurella*, de modo que *Glossura* se tornaria um grupo mais homogêneo. Hinojosa-Díaz (2010) propõe uma reformulação em *Glossura*, *Glossuropoda* e *Glossurella* os quais formaram alguns ramos parafiléticos na filogenia a partir de dados de caracteres da genitália dos machos.

Ainda, Ramírez *et al.* (2010) com base em locos mitocondriais e nucleares ao estabelecer as relações filogenéticas entre os cinco gêneros de Euglossini, encontrou divergências em relação aos subgêneros *Glossura* e *Glossuropoda* como Hinojosa-Díaz (2010).

A técnica de sequenciamento de regiões dos genomas mitocondrial e nuclear está entre as mais amplamente utilizadas em análises filogenéticas. Particularmente em estudos com

abelhas, esta técnica vem sendo empregada por diferentes autores em análises com vários grupos de abelhas, incluindo estudos com abelhas corbiculadas (Cameron, 1993; Ascher *et al.*, 2001; Cameron & Williams, 2003; Arias *et al.*, 2006; Rasmussen & Cameron, 2007), e abelhas da tribo Euglossini (Michel-Salzat *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2010).

O trabalho de Ramírez *et al.* (2010) destaca-se pela importância na contribuição de informações valiosas sobre a tribo Euglossini e as relações dos diversos subgêneros e grupos de *Euglossa*, porém, deve-se ressaltar que algumas espécies de *Euglossa* pertencentes à Mata Atlântica não foram amostrados, de modo que tais espécies ainda estão à espera de novos estudos.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar indivíduos de 28 espécies do gênero *Euglossa*, amostrando espécies da Mata Atlântica, por meio de sequenciamento de fragmentos das regiões dos genes COI, 16S do DNA mitocondrial e 28S rDNA, para contribuir com informações sobre as relações filogenéticas destas espécies, bem como dos subgêneros as quais estas pertencem.

MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho foram utilizadas 28 espécies do gênero *Euglossa*, pertencentes a 5 subgêneros (as espécies *E. villosa* Moure e *E. obrima* Hinojosa-Díaz, Melo e Engel, do sexto subgênero *Dasystilbe* se encontra somente na América Central (Moure *et al.*, 2012) e 8 grupos totalizando 108 amostras (Tabela I). Das espécies utilizadas, 25 são encontradas na Mata Atlântica e 10 não foram amostradas por Ramirez *et al.* (2010), destacando algumas espécies que são frequentemente encontradas em trabalhos de levantamento de espécies e ecologia em fragmentos da Mata Atlântica como *E. pleosticta* e *E. fimbriata* (Sofia & Suzuki,

2004; Aguiar & Gaglianone, 2008) e espécies com divergências taxonômicas como *E. iopoecila*, *E. roubiki* e *E. jacquelynae* (Faria Jr & Melo, 2007; Nemésio, 2009).

Os machos de Euglossini das diferentes espécies de *Euglossa* aqui analisados foram amostrados com iscas-odores, usando tanto a metodologia de iscas-de-espera e captura com rede entomológica (Sofia *et al.*, 2004; Sofia & Suzuki, 2004), quanto a coleta com armadilhas de garrafas plásticas do tipo *pet* (Aguiar & Gaglianone, 2008). Quando possível, amostras de diferentes localidades de Mata Atlântica (e em alguns casos de outros biomas do Brasil: a exemplo do Cerrado e Floresta Amazônica) foram também incluídas nas análises. Contudo, infelizmente, só foi possível conseguir amostras de outras localidades para um número reduzido de espécies, incluindo: *E. cordata*, *E. pleosticta*, *E. truncata* e *E. crassipunctata*.

Iscas-odores foram também usadas para a atração das outras duas espécies de Euglossini utilizadas como grupo externo: *Eulaema cingulata* Fabricius (amostra de São José de Ubá, RJ) e *Eufriesea violacea* (Blanchard) (amostra coletada em Londrina, PR). No caso da espécie *Apis mellifera* L., também usada como grupo externo, nas análises foram utilizadas sequências do GenBank.

Além dos machos coletados, vários dos espécimes analisados neste trabalho foram cedidos por outros pesquisadores. Algumas destas amostras cedidas estavam preservadas em etanol 70% e outras constituíram material seco doados de coleções entomológicas.

Tabela I. Amostras de 28 espécies de *Euglossa* com indicação dos subgêneros, grupos e locais de coleta.

Espécies	Nº	Subgênero	Grupo	Cidade	Estados (Brasil)
<i>Eg. amazonica</i> Dressler	1-3	<i>Euglossa</i>	<i>purpurea</i>	Araguari	MG
<i>Eg. analis</i> Westwood	1-4	<i>Euglossa</i>	<i>analis</i>	Casimiro de Abreu	RJ
<i>Eg. annectans</i> Dressler	1-4	<i>Glossura</i>	-	Guaraqueçaba	PR
<i>Eg. anodorhynchi</i> Nemésio	1-2	<i>Euglossa</i>	<i>purpurea</i>	Guaraqueçaba	PR
<i>Eg. cognata</i> Moure	1	<i>Euglossa</i>	<i>analis</i>	-	MG
<i>Eg. cordata</i> (Linnaeus)	1-6	<i>Euglossa</i>	<i>cordata</i>	Campos dos Goytacazes	RJ
<i>Eg. cordata</i> (Linnaeus)	7-12	<i>Euglossa</i>	<i>cordata</i>	Guaraqueçaba	PR
<i>Eg. crassipunctata</i> Moure	1-3	<i>Glossurella</i>	<i>bursigera</i>	Cataguases	MG
<i>Eg. decorata</i> Smith	1-2	<i>Euglossella</i>	<i>viridis</i>	-	MG
<i>Eg. despecta</i> Moure	1-3	<i>Euglossa</i>	<i>cordata</i>	São Francisco Itabapoana	RJ
<i>Eg. fimbriata</i> Rebêlo e Moure	1	<i>Euglossa</i>	<i>cordata</i>	Ibiporã	PR
<i>Eg. fimbriata</i> Rebêlo e Moure	2-6	<i>Euglossa</i>	<i>cordata</i>	Londrina	PR
<i>Eg. fimbriata</i> Rebêlo e Moure	7	<i>Euglossa</i>	<i>cordata</i>	Uberlândia	MG
<i>Eg. ignita</i> Smith	1-4	<i>Glossura</i>	<i>piliventris</i>	Manaus	AM
<i>Eg. imperialis</i> Cockerell	1	<i>Glossura</i>	<i>piliventris</i>	Araguari	MG
<i>Eg. imperialis</i> Cockerell	2-4	<i>Glossura</i>	<i>piliventris</i>	Piumhi	MG
<i>Eg. iopoecila</i> Dressler	1-4	<i>Glossura</i>	<i>piliventris</i>	Guaraqueçaba	PR
<i>Eg. ioprosopa</i> Dressler	1-2	<i>Euglossa</i>	<i>cybelia</i>	Loreto (Peru)	-
<i>Eg. jacquelynae</i> Nemésio	1-4	<i>Euglossella</i>	<i>viridis</i>	-	MG
<i>Eg. melanotricha</i> Moure	1-4	<i>Euglossa</i>	<i>cordata</i>	Piumhi	MG
<i>Eg. mixta</i> Friese	1-4	<i>Euglossa</i>	<i>analis</i>	Manaus	AM
<i>Eg. modestior</i> Dressler	1-2	<i>Euglossa</i>	<i>cordata</i>	Manaus	AM
<i>Eg. nanomelanotricha</i> Nemésio	1-4	<i>Euglossa</i>	<i>cordata</i>	Jaborandi	BA
<i>Eg. pleosticta</i> Dressler	1-3	<i>Euglossa</i>	<i>purpurea</i>	Campos dos Goytacazes	RJ
<i>Eg. pleosticta</i> Dressler	4-6	<i>Euglossa</i>	<i>purpurea</i>	Casimiro de Abreu	RJ
<i>Eg. pleosticta</i> Dressler	7-8	<i>Euglossa</i>	<i>purpurea</i>	Guaraqueçaba	PR
<i>Eg. roderici</i> Nemésio	1-3	<i>Euglossa</i>	<i>analis</i>	Guaraqueçaba	PR
<i>Eg. roubiki</i> Nemésio	1-2	<i>Glossura</i>	<i>piliventris</i>	Igrapiúna	BA
<i>Eg. roubiki</i> Nemésio	3	<i>Glossura</i>	<i>piliventris</i>	Linhares	ES
<i>Eg. roubiki</i> Nemésio	4-5	<i>Glossura</i>	<i>piliventris</i>	Murici	AL
<i>Eg. rugilabris</i> Moure	1-2	<i>Glossuropoda</i>	<i>rugilabris</i>	Loreto (Peru)	-
<i>Eg. securigera</i> Dressler	1-4	<i>Euglossa</i>	<i>cordata</i>	Campos dos Goytacazes	RJ
<i>Eg. stellfeldi</i> Moure	1	<i>Glossurella</i>	-	Guaraqueçaba	PR
<i>Eg. townsendi</i> Cockerell	1	<i>Euglossa</i>	<i>purpurea</i>	São Carlos	SP
<i>Eg. truncata</i> Rebêlo e Moure	1-4	<i>Euglossa</i>	<i>purpurea</i>	Londrina	PR
<i>Eg. truncata</i> Rebêlo e Moure	5-7	<i>Euglossa</i>	<i>purpurea</i>	Araguari	MG
<i>Eg. viridis</i> (Perty)	1-3	<i>Euglossella</i>	<i>viridis</i>	Guaraqueçaba	PR

A metodologia de extração do DNA total das abelhas preservadas em álcool foi baseada em Suzuki *et al.* (2010), com algumas modificações. Para a obtenção do DNA foi utilizada a perna posterior direita de cada indivíduo analisado. O material foi “picotado” com auxílio de uma tesoura, lisado com tampão SDS, seguido de extrações sucessivas com fenol, clorofórmio e álcool-isoamílico. O DNA foi precipitado com etanol, ressuspenso em 30 µL de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e estocado a -20°C.

Para as amostras secas doadas de coleções entomológicas, foi utilizado o protocolo de extração com Chelex® 100. Foi utilizada a perna anterior direita de cada indivíduo analisado. O material foi “picotado” com auxílio de uma tesoura e depois macerado com auxílio de pistilo, seguido da adição de 300µl Chelex® 100 a 10% e incubação por 30 minutos a 56°C e posteriormente a aproximadamente 100°C por 5 minutos, sendo depois centrifugada a 14000 rpm. O sobrenadante obtido foi utilizado na reação de PCR.

Para as amostras extraídas com o protocolo fenol, clorofórmio e álcool-isoamílico foi realizada a quantificação do DNA em Fluorímetro DyNA Quant 200 (Hoefer) e o valor obtido foi utilizado nos cálculos das diluições para obtenção de 5 ng/µL de DNA (concentração utilizada nas reações de amplificação).

As amplificações do DNA das diferentes espécies do gênero *Euglossa* foram realizadas via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em duas regiões do genoma mitocondrial (COI e 16S) e uma região do genoma nuclear (28S). A porção mais próxima à extremidade 5' da região do gene citocromo c oxidase subunidade 1 (COI), correspondente à região *barcode*, foi amplificada utilizando os *primers* LepF1 e LepR1 (Herbert *et al.*, 2004). A porção seguinte à região *barcode* foi amplificada utilizando os *primers* COI-F e COI-R (Dick *et al.*, 2004). Uma porção da subunidade ribossomal 16S foi amplificada por meio dos *primers* confeccionados com base em sequências de abelhas Euglossini depositadas no GenBank: 16S-F 5'-CGAGGTCGCAAACATCT e 16S-R 5'-TAGCTGCAGTATATTGACT. A região do

genoma nuclear correspondente a uma porção da subunidade ribossomal 28S foi amplificada através do uso do conjunto de *primers* For28SVesp e Rev28SVesp (Hines *et al.*, 2007).

Reações de PCR foram produzidas em um volume total de 15 μ L contendo 1,5 μ L de tampão de reação 10x, 200 μ M de cada dNTP, 3,0 mM de $MgCl_2$, 0,5 μ M de cada *primer*, 2 μ L de DNA, 1 U de Taq polimerase (Invitrogen) e água ultrapura para completar o volume. As amplificações foram realizadas em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.) obedecendo um protocolo previamente otimizado específico para cada par de *primer*. De modo geral, após uma desnaturação inicial de 4 minutos à 90°C as amplificações foram compostas por 40 ciclos respectivamente de desnaturação, pareamento dos *primers* e extensão (*primers* da região COI: 94°C por 30s, 55°C por 30s e 72°C por 45s; 16S: 94°C por 30s, 55°C por 40s e 72°C por 1min; 28S: 94°C por 1min, 55°C por 1min e 72°C por 1min10s), terminando com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

A eficácia das amplificações foi verificada por meio da visualização dos produtos de PCR em eletroforese de gel de agarose 1,0%, posteriormente corados em brometo de etídio e fotodocumentados em transiluminador UV, usando-se o sistema digital Kodak EDAS 290.

O restante do produto da PCR foi purificado por digestão com 0,5 μ L do kit comercial Illustra™ ExoStar (GE Healthcare). As temperaturas e tempos de digestão e inativação foram ajustados conforme recomendação do fabricante.

Para cada produto de PCR foram realizadas duas reações de sequenciamento, uma reação com o primer forward e outra reação com o primer reverse. As reações de sequenciamento foram produzidas com volume total de 10 μ L, contendo 2 μ L do mix do kit “BigDye Terminator v.3.1” (Applied Biosystems), 1 μ L de tampão de sequenciamento 5x, 0,5 μ M do respectivo primer (forward ou reverse), de 100-200 ng de amostra purificada (produto da PCR) e água ultrapura para completar o volume. As amplificações foram realizadas em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.): desnaturação inicial de 3 minutos a 95°C,

seguida de 40 ciclos: 95°C por 15s, 55°C por 15s e 60°C por 2min. O produto resultante da amplificação foi submetido a um processo de precipitação conforme recomendações do fabricante do kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Por fim os produtos resultantes do processo de precipitação foram submetidos à leitura em sequenciador ABI PRISM® 3500xl (Applied Biosystems).

Os eletroferogramas resultantes da leitura automática do sequenciador foram avaliados com o aplicativo Phred-Phrap que gerou sequências consenso por meio do aplicativo CAP3 do pacote computacional “Electropherogram Quality Analysis” (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>). As sequências foram comparadas com outras sequências depositadas no GenBank (NCBI), com o auxílio da ferramenta “BLAST Search”.

Para o alinhamento das sequências foi utilizado o algoritmo Clustal W, incluso no software BioEdit v.7.0.5.3 (Hall, 1999), os quais foram checados manualmente.

O viés filogenético dos dados moleculares obtidos foi testado por meio da análise de saturação dos dados, o qual estima a correlação entre as taxas de transições (s) e transversões (v) com a distância genética entre os táxons por meio do programa DAMBE (Xia 2000). Para tanto foi utilizado o modelo de distância K2P (Kimura-2-Parameter distance model) (Schneider). As taxas de transição e transversão devem ser diretamente proporcionais às distâncias genéticas, de modo que não haja a intersecção entre as retas que representam a distribuição dos dados. Neste caso verifica-se a não saturação dos dados (Schneider, 2007), portanto estes podem ser utilizados nas análises filogenéticas.

Todas as sequências obtidas foram utilizadas inicialmente nas análises filogenéticas em separado para comparação, bem como foram combinadas em uma matriz única na tentativa de construir árvores com o maior número de dados possível, refletindo em topologias correspondentes à evolução dos táxons.

Três metodologias de reconstrução filogenética foram empregadas nas análises, máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (ML) e Análise Bayesiana. O programa MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011) foi utilizado para as análises de máxima parcimônia e máxima verossimilhança testando as respectivas topologias com o método de *bootstrap* com 1000 permutações aleatórias. O mesmo programa foi utilizado para selecionar o melhor modelo de substituição nucleotídica por meio de uma análise de máxima verossimilhança, a qual indicou o modelo *general time reversibel* com distribuição gamma (GTR+G), através dos critérios de informação bayesiana (BIC) e Akaike (AIC), tanto para cada sequência de gene como para a sequência de genes concatenados.

A análise bayesiana foi realizada pelo programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). As buscas pelo método Monte Carlo via cadeias de Markov (MCMC) foram feitas ao longo de 4.000.000 de gerações, amostrando uma árvore a cada 100 gerações. Os dados de saída gerados pela análise bayesiana foram visualizadas utilizando o aplicativo Tracer v1.4 (Rambaut & Drummond, 2007) para definir o ponto de descarte das árvores iniciais com maior grau de variância. Em seguida o aplicativo TreeAnnotator 1.4.8 incluso no pacote de programas BEAST (Rambaut & Drummond, 2007) foi utilizado para realizar o processo de descarte das 4000 árvores iniciais gerando um consenso das 36000 árvores restantes.

RESULTADOS

Os tamanhos dos fragmentos obtidos por PCR das regiões dos genes mitocondriais e nuclear para as amostras das espécies de *Euglossa* foram, aproximadamente: *barcode*: 665 pb, COI: 562 pb, 16S: 360 pb e 28S: 817 pb (Tabela II).

Não se obteve sucesso para a amplificação de alguns fragmentos, portanto para a região 16S das espécies *E. amazonica*, *E. jacquelynae* e *E. ioprosopa* foram utilizadas as matrizes excluindo estas sequências e nas análises filogenéticas estas sequências foram consideradas como dados perdidos.

Após o alinhamento e a correção manual das sequências obteve-se uma matriz com os seguintes valores de caracteres: 665 para a região *barcode*, 562 para a região COI, 359 para 16S e 725 para 28S. Todos os genes em conjunto totalizaram uma matriz com 2311 caracteres utilizados para as análises filogenéticas (Tabela II).

Tabela II. Tamanho dos fragmentos amplificados por PCR e número de caracteres analisados após alinhamento e correção das sequências de parte das regiões dos genes COI, CytB, 16S e 28S das amostras das espécies de *Euglossa*.

Região	Tamanho do fragmento amplificado	Número de caracteres após correção
COI (barcode)	665 pb	665 caracteres
COI (posterior ao barcode)	562 pb	562 caracteres
16S	360 pb	359 caracteres
28S	817 pb	725 caracteres
Total		2311 caracteres

Os resultados obtidos pelo teste de saturação de substituição para os dados de todos os genes agrupados indicam que a taxa de transição/transversão em relação à distância genética aumenta de forma linear $R^2(s) = 0,8228$ e $R^2(v) = 0,9537$ (Figura 1) e a análise gráfica indica que os dados não estão saturados.

Os testes de saturação de substituição para os dados de todos os genes analisados separadamente também indicam que a taxa de transição/transversão em relação à distância genética aumenta de forma linear (Figura 2), indicando que os dados de cada uma das regiões analisadas não estão saturados.

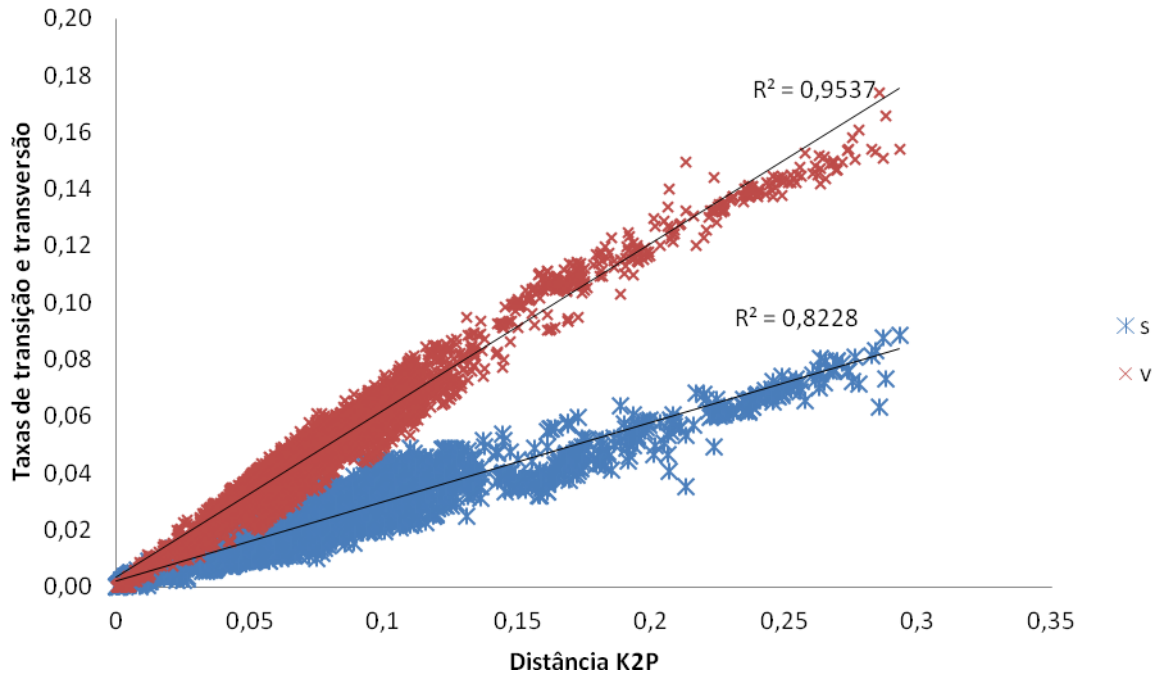


Figura 1. Relação entre as taxas de transições (s) e transversões (v) em relação à distância genética para o conjunto de dados concatenados (*barcode*, COI, 16S e 28S) das amostras de *Euglossa* analisadas.

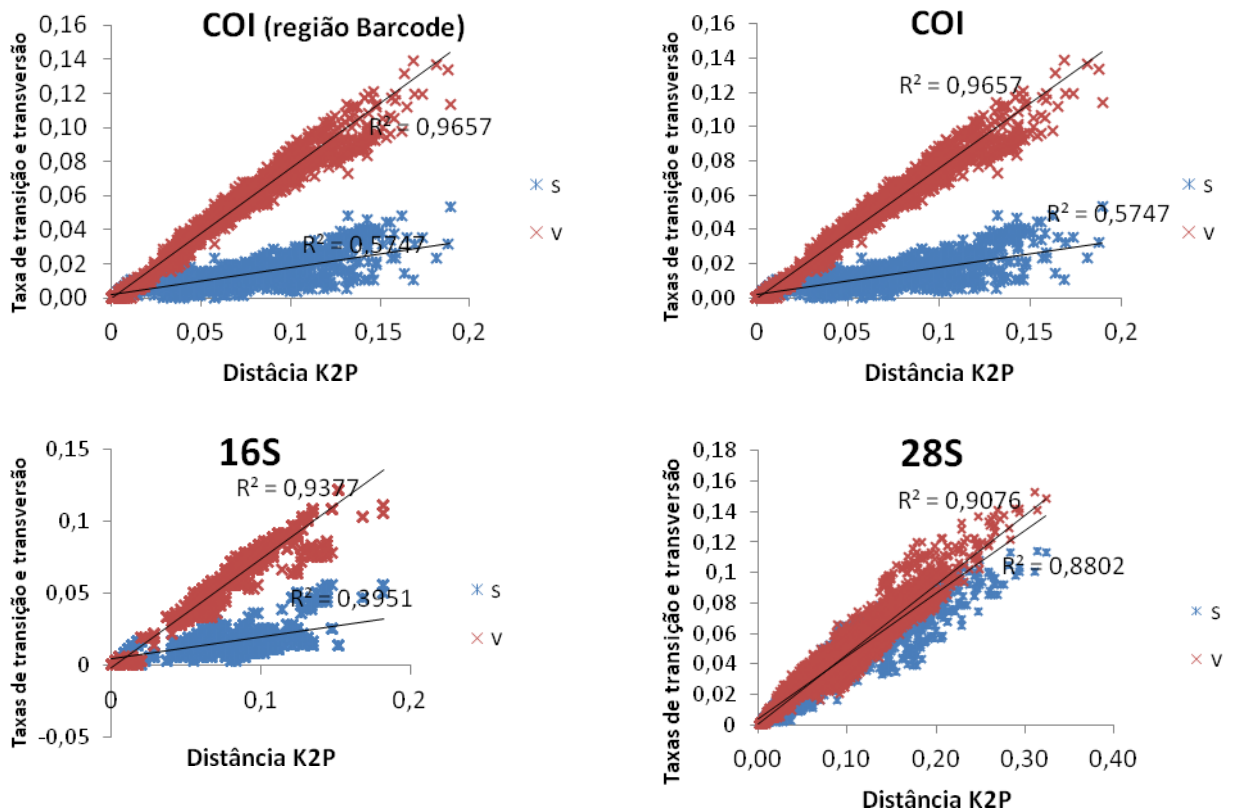


Figura 2. Relação entre as taxas de transições (s) e transversões (v) em relação à distância genética (K2P) nas amostras de espécies de *Euglossa* para as regiões dos genes: COI (região *barcode*); COI (região posterior ao *barcode*); subunidade ribossomal 16S; subunidade ribossomal 28S.

A partir dos dados das sequências de cada uma das regiões analisadas (COI região *barcode* e região posterior ao *barcode*, 16S e 28S), foi possível realizar a análise filogenética e a construção de três árvores com base em modelos de filogenia diferentes: análise bayesiana (Figuras 3, 5, 7 e 9), máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML) (Figuras 4, 6, 8 e 10).

Ao comparar as árvores geradas, considerando as três análises filogenéticas empregadas, por cada um dos genes em separado, verifica-se que as árvores do gene COI, tanto para a região *barcode* quanto para a região posterior ao *barcode*, mostraram grupamentos das espécies dos subgêneros mais consistentes do que dos genes 16S e 28S. No caso, as árvores geradas a partir dos dados das sequências de 16S, por exemplo, agruparam amostras de espécies diferentes como *E. crassipunctata* com *E. ignita* e *E. despecta* as quais pertencem aos subgêneros *Glossurella*, *Glossura* e *Euglossa* respectivamente.

Já nas árvores geradas a partir do gene 28S, ocorreu a separação de *E. imperialis* das demais amostras do subgênero *Glossura*.

Porém, verifica-se que nas árvores geradas a partir das regiões do gene COI ocorreu agrupamento de amostras de *E. pleosticta* e *E. truncata*, ambos do subgênero *Euglossa*, sendo que nas árvores de 16S estas espécies se mostram próximas, porém, as amostras de cada espécie se distinguem umas das outras formando dois grupos distintos.

Além, disto, para as duas regiões do gene COI observa-se a posição do subgênero *Euglossella* como grupo-irmão dos demais subgêneros.

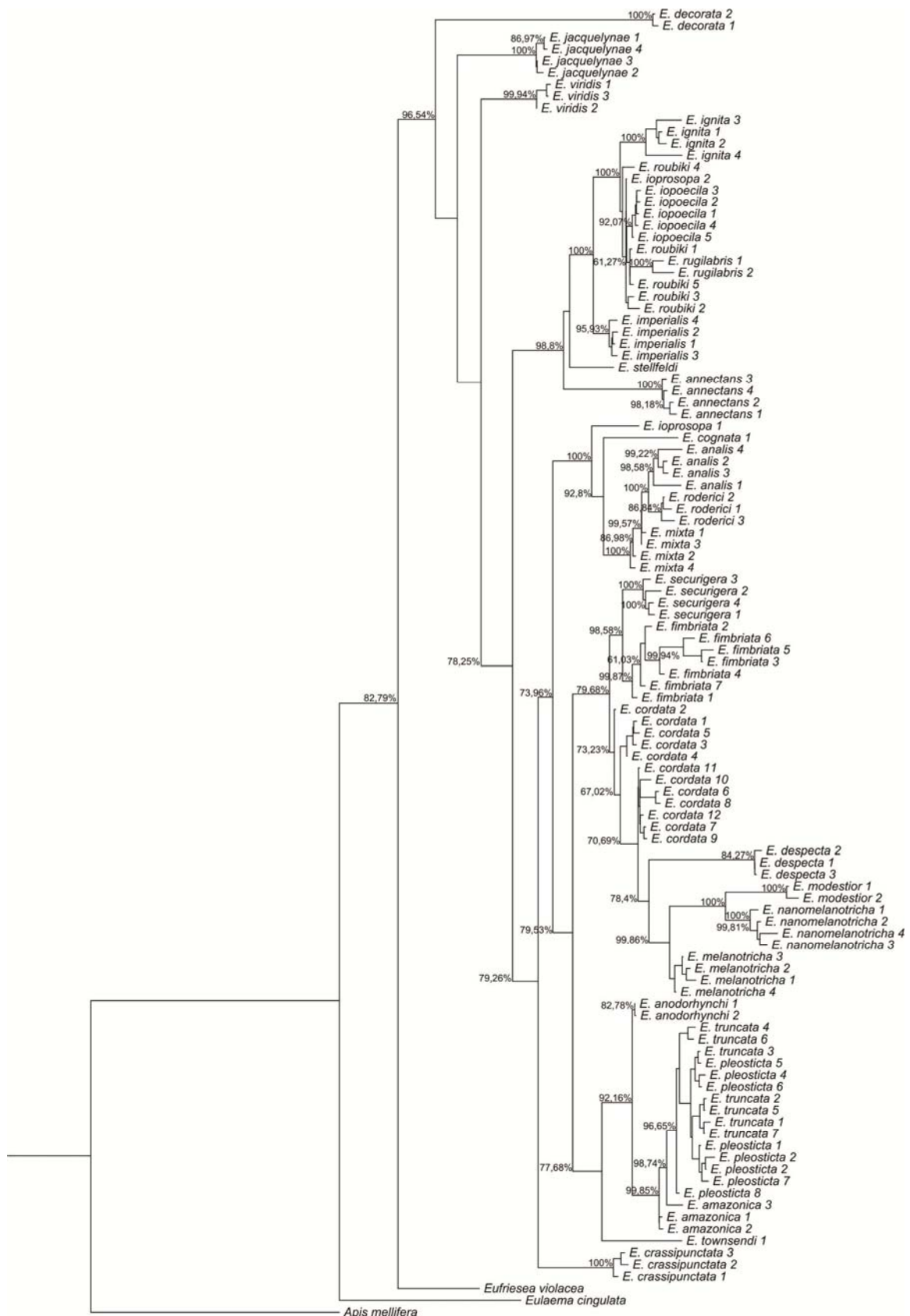


Figura 3. Árvore filogenética criada a partir dos dados da análise bayesiana gerados a partir de 665 caracteres da região *barcode* do gene COI de 108 amostras de 28 espécies de *Euglossa* usando o programa MrBayes 3.1.2. Três amostras representando as espécies *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem às probabilidades posteriores, sendo excluídos valores abaixo de 50%.



Figura 4. Árvores de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML) de 108 amostras de 28 espécies de *Euglossa*. Análise realizada a partir de 665 caracteres da região *barcode* do gene COI. Os valores de *bootstrap* foram calculados no programa computacional MEGA5.1 com 1000 permutações. Três amostras representando as espécies *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem aos valores de *bootstrap*. Foram excluídos valores de *bootstrap* abaixo de 50%.

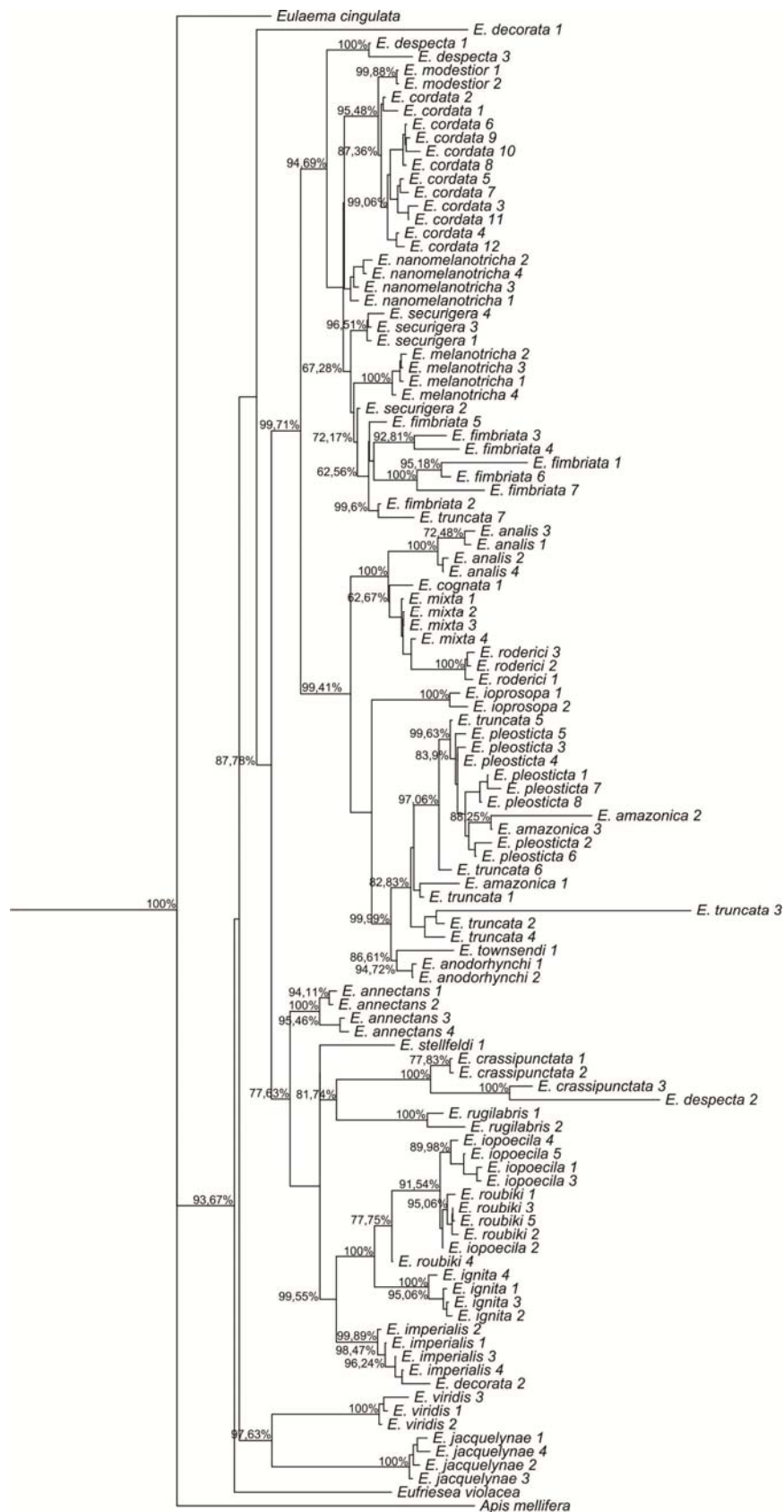


Figura 5. Árvore filogenética criada a partir dos dados da análise bayesiana gerados a partir de 562 caracteres da região posterior ao *barcode* do gene COI de 108 amostras de 28 espécies de *Euglossa* usando o programa MrBayes 3.1.2. Três amostras representando as espécies *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem às probabilidades posteriores, sendo excluídos valores abaixo de 50%.

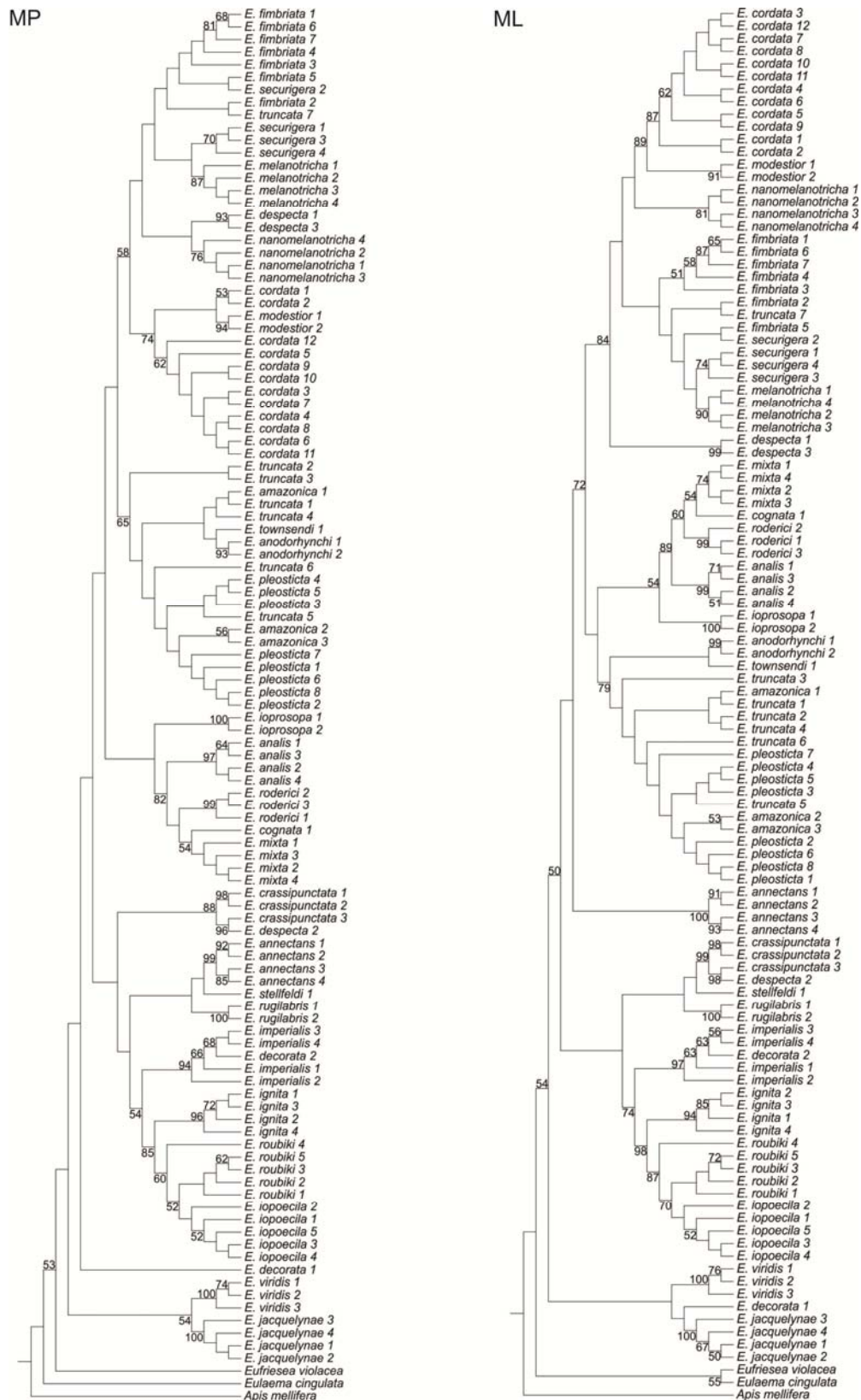


Figura 6. Árvores de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML) de 108 amostras de 28 espécies de *Euglossa*. Análise realizada a partir de 562 caracteres da região posterior ao *barcode* do gene COI. Os valores de *bootstrap* foram calculados no programa computacional MEGA5.1 com 1000 permutações. Três amostras representando as espécies *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem aos valores de *bootstrap*. Foram excluídos valores de *bootstrap* abaixo de 50%.

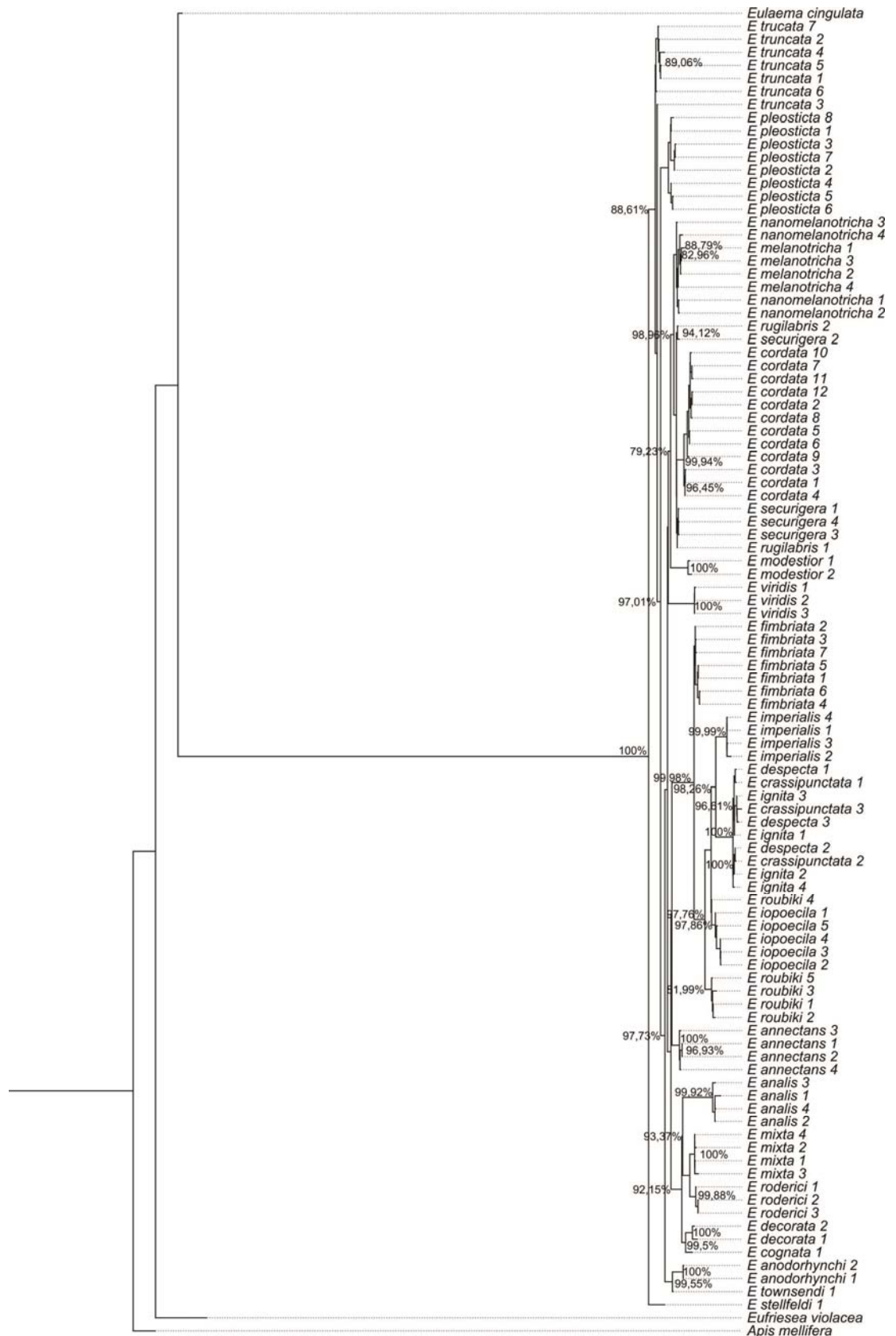


Figura 7. Árvore filogenética criada a partir dos dados da análise bayesiana gerados a partir de 360 caracteres do gene 16S de 99 amostras de 25 espécies de *Euglossa* usando o programa MrBayes 3.1.2. Três amostras representando as espécies *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem às probabilidades posteriores, sendo excluídos valores abaixo de 50%.

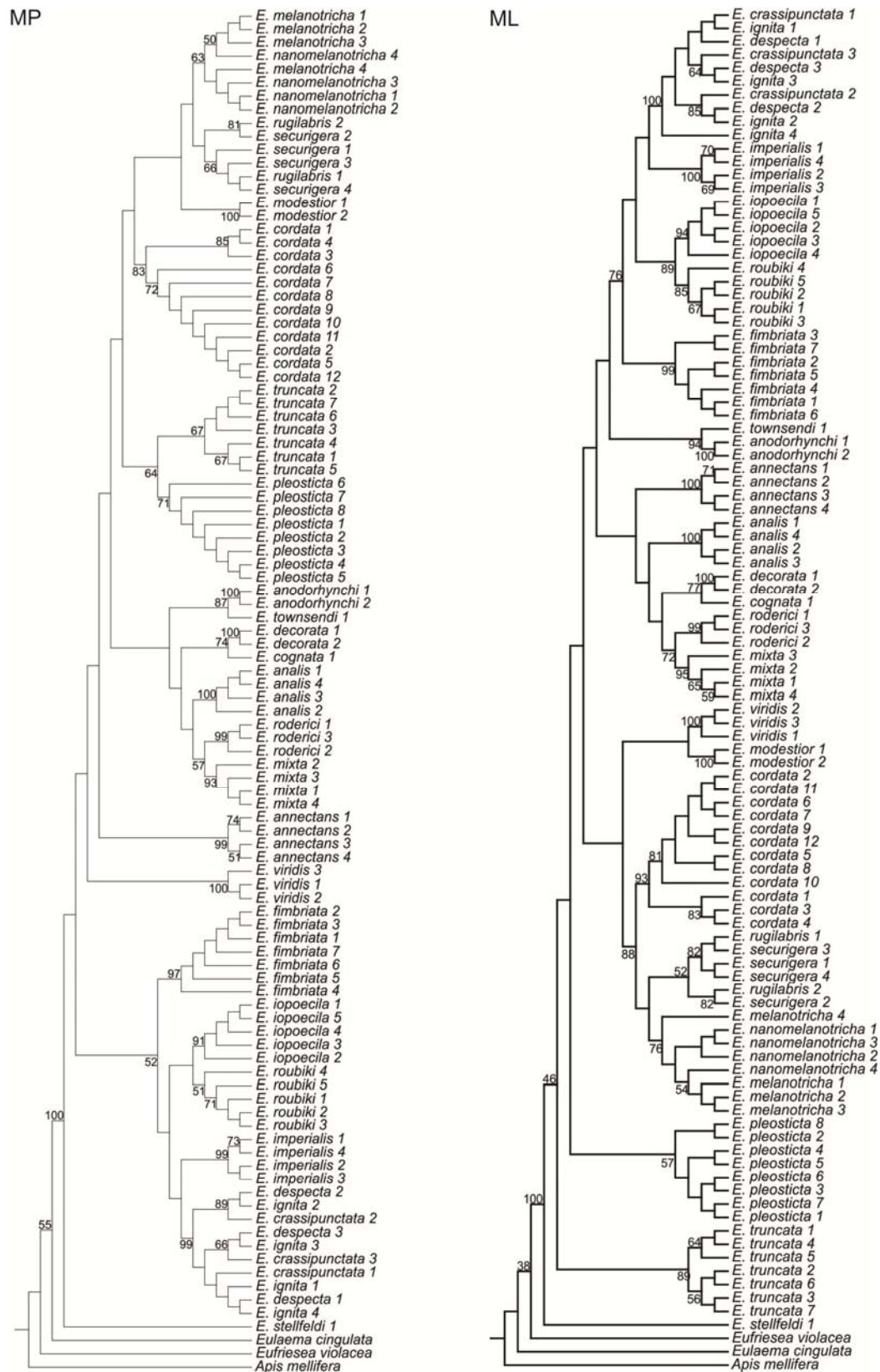


Figura 8. Árvores de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML) de 99 amostras de 25 espécies de *Euglossa*. Análise realizada a partir de 360 caracteres do gene 16S. Os valores de *bootstrap* foram calculados no programa computacional MEGA5.1 com 1000 permutações. Três amostras representando as espécies *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem aos valores de *bootstrap*. Foram excluídos valores de *bootstrap* abaixo de 50%.

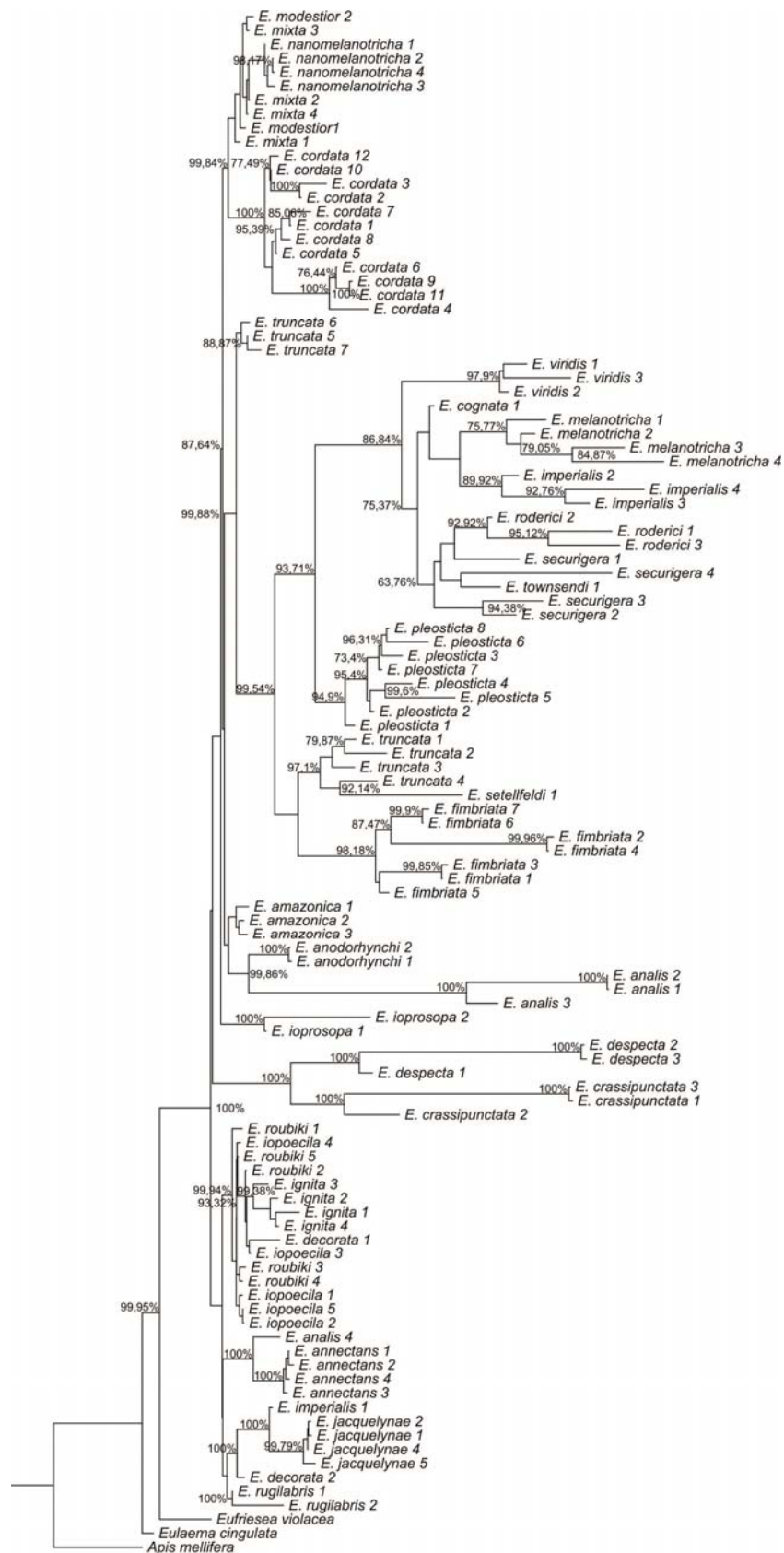


Figura 9. Árvore filogenética criada a partir dos dados da análise bayesiana gerados a partir de 817 caracteres do gene 28S de 108 amostras de 28 espécies de *Euglossa* usando o programa MrBayes 3.1.2. Três amostras representando as espécies *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem às probabilidades posteriores, sendo excluídos valores abaixo de 50%.

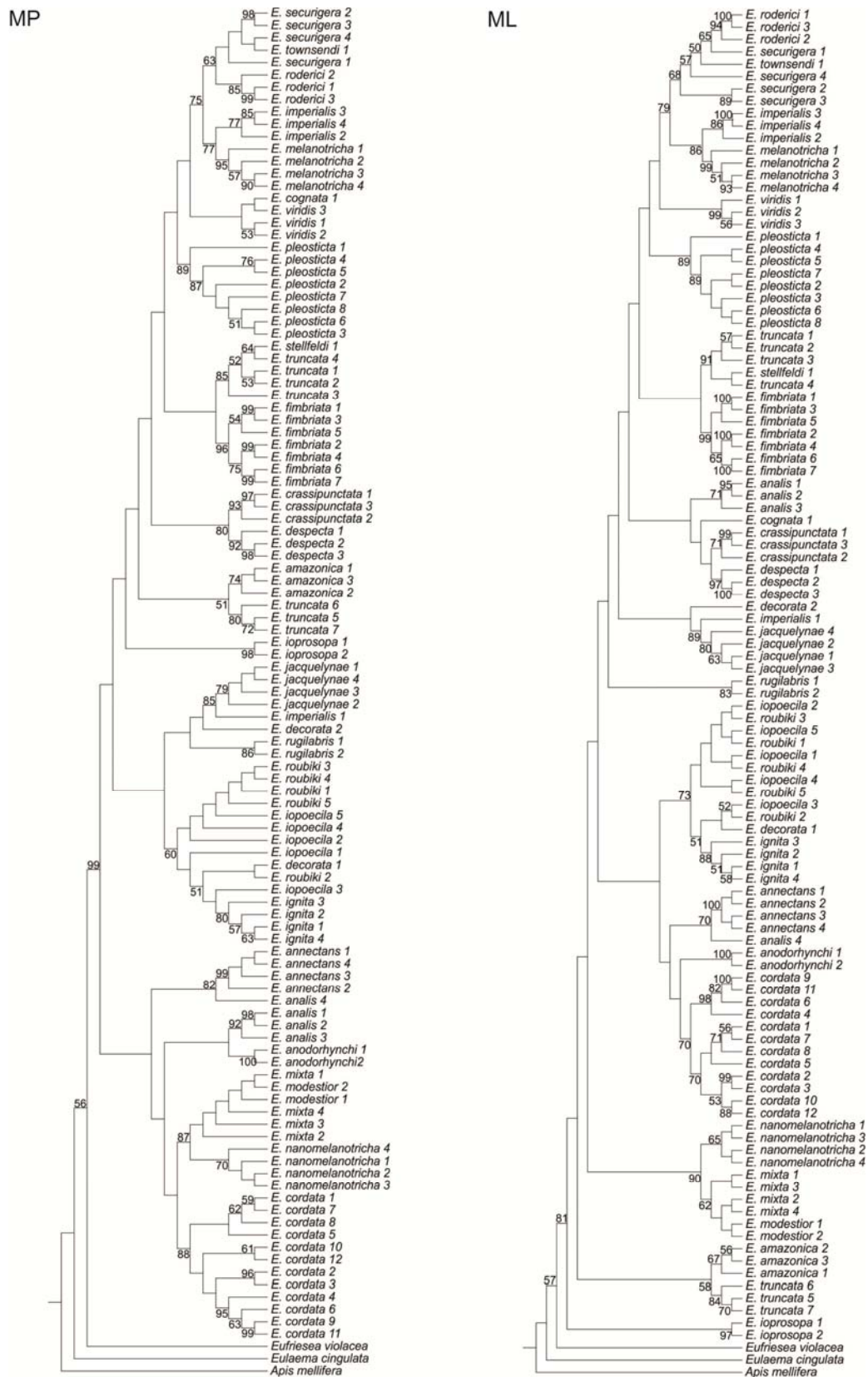


Figura 10. Árvores de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML) de 108 amostras de 28 espécies de *Euglossa*. Análise realizada a partir de 817 caracteres do gene 28S. Os valores de *bootstrap* foram calculados no programa computacional MEGA5.1 com 1000 permutações. Três amostras representando as espécies *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem aos valores de *bootstrap*. Foram excluídos valores de *bootstrap* abaixo de 50%.

A partir dos dados das sequências de todas as regiões concatenadas, com todas as espécies analisadas inclusas, foram realizadas as análises filogenéticas de análise bayesiana (Figura 11), máxima parcimônia (Figura 12) e máxima verossimilhança (Figura 13).

As árvores geradas por meio dos três modelos utilizados, com a sequência de todos os genes concatenados, mostraram *Euglossella* como grupo irmão dos outros subgêneros de *Euglossa*, com uma alta sustentação pela análise de *bootstrap* em todas as análises (Figuras 2, 3 e 4). Contudo, particularmente no caso de *E. decorata*, que nas análises bayesiana e de máxima parcimônia aparece agrupada com outras espécies de *Euglossella*, na análise de verossimilhança os dois indivíduos desta espécie aparecem misturados com outras espécies de *Glossura*. Destaca-se também que os subgêneros *Glossura*, *Glossurella* e *Glossuropoda* formam um clado que se agrupa com *Euglossa* com valores altos de *bootstraps*.

Os dados do presente trabalho (considerando as sequências concatenadas) mostram a espécie *E. rugilabris* (subgênero *Glossuropoda*) agrupada com as espécies do subgênero *Glossura*. Além disto, a amostra de *E. stellfeldi* (subgênero *Glossurella*) constitui um grupo irmão de *E. annectans* (subgênero *Glossura*).

Com exceção da árvore de máxima verossimilhança, as espécies de *Euglossella* formaram um grupo consistente, com *E. viridis* formando um clado com *E. jacquelynae* e posteriormente se agrupam com *E. decorata*.

O subgênero *Euglossa* apresentou um grupamento com todas as espécies que corroboram com a classificação da literatura, porém, a separação dos grupos dentro do subgênero ainda possui alguns pontos de divergência.

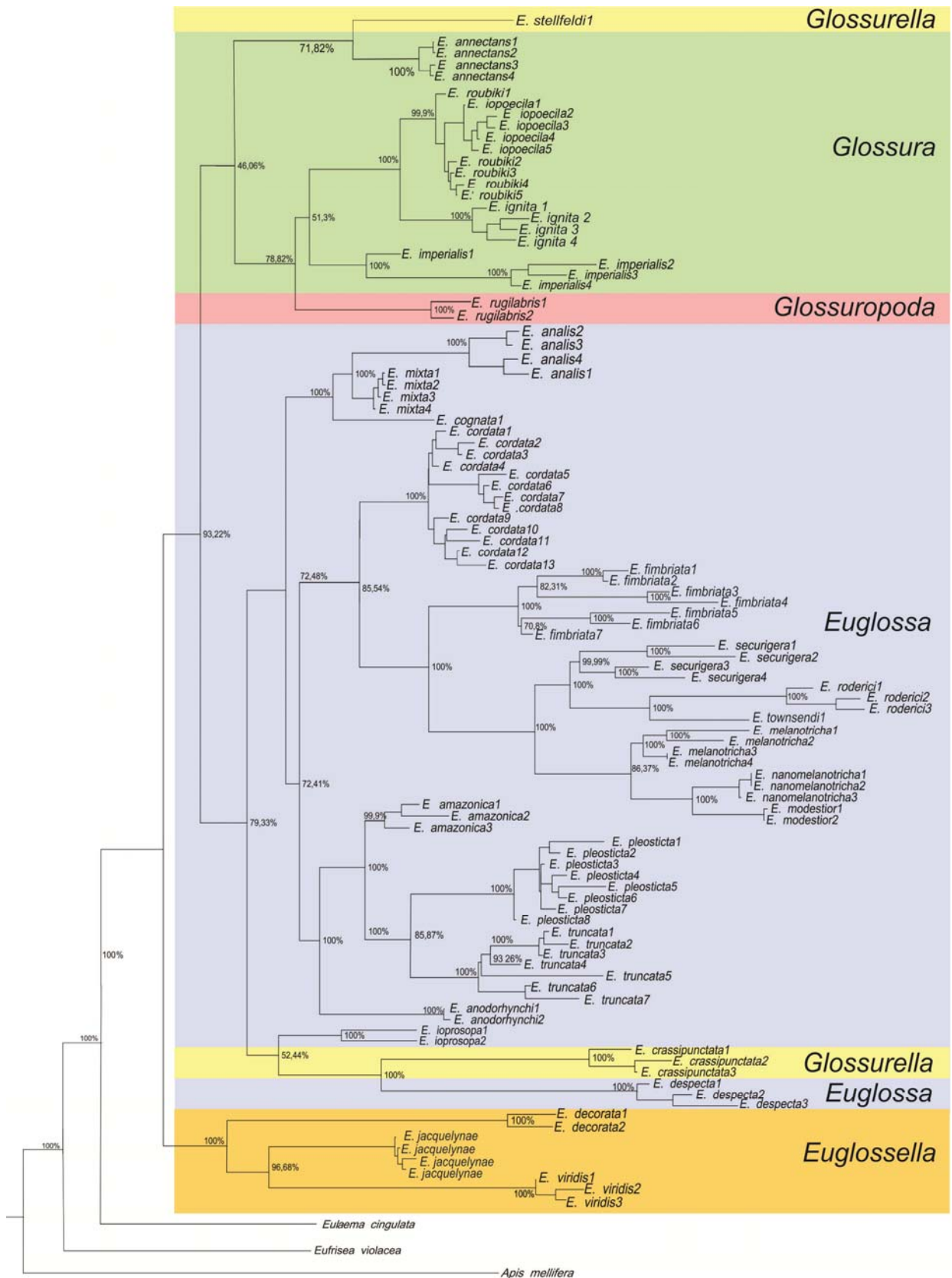


Figura 11. Árvore filogenética criada a partir dos dados da análise bayesiana gerados a partir de 2311 caracteres dos genes COI, 16S e 28S de 108 amostras de 28 espécies de *Euglossa* usando o programa MrBayes 3.1.2. Três amostras representando as espécies *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem às probabilidades posteriores, sendo excluídos valores abaixo de 50%.

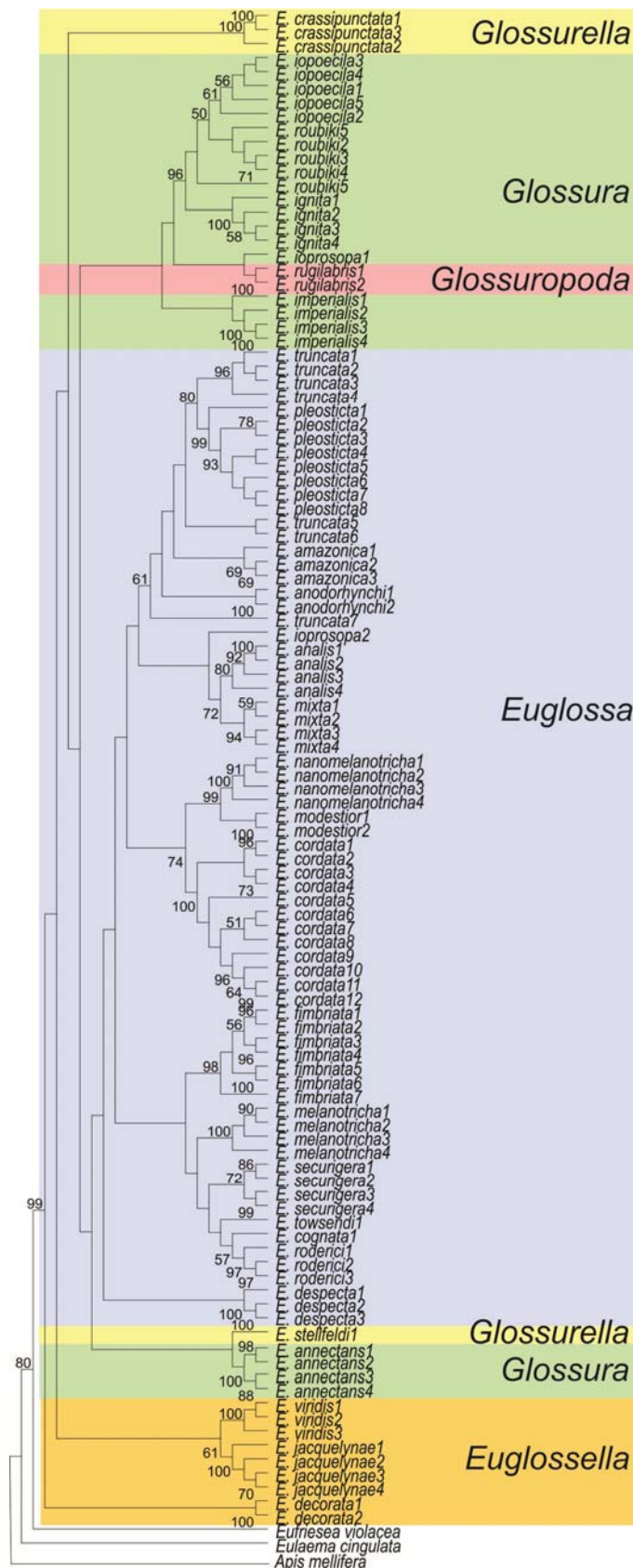


Figura 12. Árvore de máxima parcimônia (MP) de 108 amostras de 28 espécies de *Euglossa*. Análise realizada a partir de 2311 caracteres dos genes COI, 16S e 28S. Os valores de *bootstrap* foram calculados no programa computacional MEGA5.1 com 1000 permutações. Três amostras representando as espécies *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem aos valores de *bootstrap*. Foram excluídos valores de *bootstrap* abaixo de 50%.

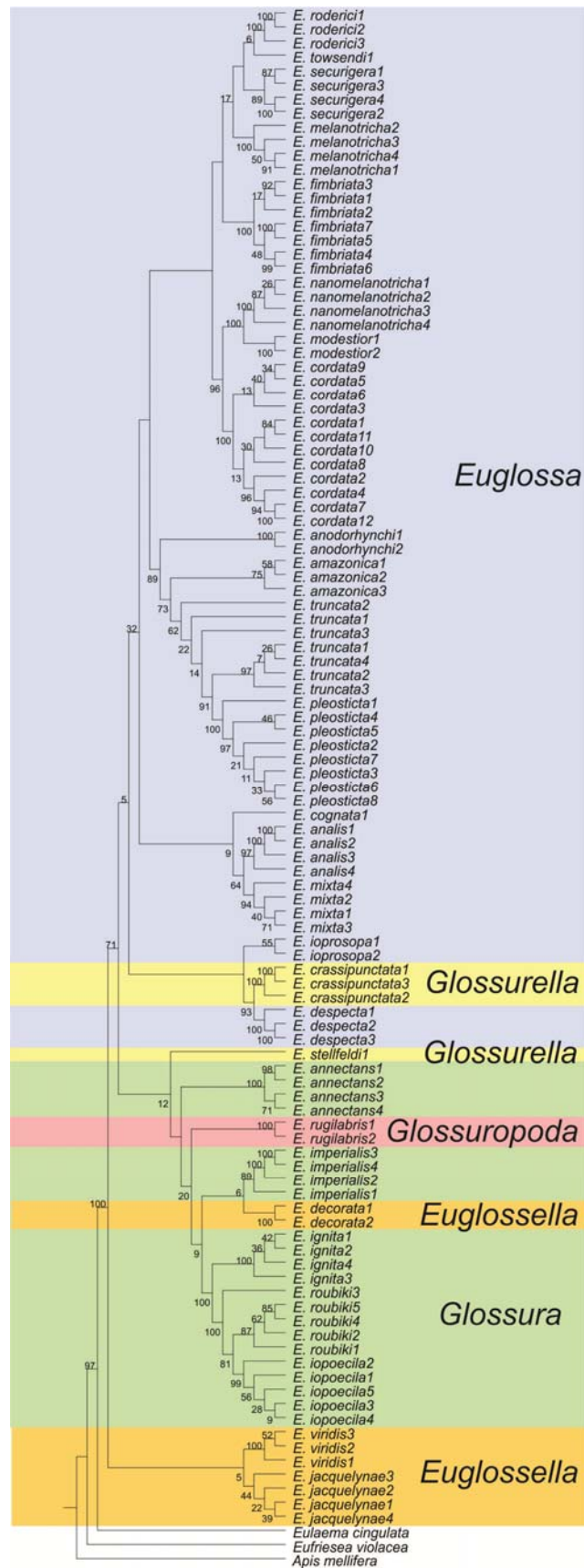


Figura 13. Árvore de máxima verossimilhança (ML) de 108 amostras de 28 espécies de *Euglossa*. Análise realizada a partir de 2311 caracteres dos genes COI, 16S e 28S. Os valores de *bootstrap* foram calculados no programa computacional MEGA5.1 com 1000 permutações. Três amostras representando as espécies *Eulaema cingulata*, *Eufriesea violacea* e *Apis mellifera* foram usadas como grupo externo. Os números correspondem aos valores de *bootstrap*. Foram excluídos valores de *bootstrap* abaixo de 50%

DISCUSSÃO

As análises com base nas sequências do gene COI tanto para a região *barcode* quanto para a região posterior ao *barcode* demonstraram que este se mostrou mais eficiente, em comparação aos outros genes, para a formação das topologias dos subgêneros em relação às referências na literatura. Simon *et al.* (1994) afirma que o gene codificador da citocromo oxidase I é o gene mitocondrial mais conservado em termos de evolução de aminoácidos.

Em relação ao gene 16S, Whitfield & Cameron (1998), analisando sequências de 434pb de 16S de amostras de diferentes superfamílias de Hymenoptera, verificaram que este gene é informativo para análise filogenética entre espécies ou populações estreitamente relacionadas ou entre tribos, subfamílias ou famílias. Porém, no presente trabalho, possivelmente o número de caracteres encontrados para 16S foi pequeno para agrupar eficientemente as amostras de algumas espécies.

Para o gene 28S o número de caracteres obtido foi maior do que os outros genes, mas não houve a formação consistente de todos os grupos dos subgêneros. O gene 28S é um gene considerado mais conservado do que os demais analisados, por ser um gene nuclear, o que pode ter acarretado as diferenças nos grupamentos.

As árvores dos diferentes genes em separado mostraram várias topologias discordantes, o que indica a possibilidade de ocorrência de formações de árvores de genes que são diferentes das árvores de espécies. Isto pode ocorrer devido ao curto tempo de divergência entre as diferentes espécies (Pamilo & Nei, 1988). Porém, ainda é possível inferir sobre a árvore de espécies com o uso de mais de um indivíduo por espécie e ainda utilizando mais de um loco para as análises (Rosenberg & Nordborg, 2002).

Michel-Salzat *et al.* (2004) ao traçar a filogenia dos gêneros de *Euglossa*, utilizando caracteres genéticos (genes 16S, COI, LW *Rh* e EF-1 α) e morfológicos, obteve melhores

resultados nas topologias, com ramos mais consistentes quando utilizou os dados de todos os genes combinados em relação aos resultados dos genes em separado.

Assim, destaca-se a necessidade de combinar os caracteres de todos os genes analisados de modo que um número maior de caracteres e o uso de genes que possuem taxas evolutivas diferentes (DNA mitocondrial e nuclear) podem gerar dados mais consistentes para as análises filogenéticas de *Euglossa*.

Dados de todas as sequências de genes concatenados:

Para a análise bayesiana e máxima parcimônia (Figuras 11 e 12) foram confirmadas as posições dos subgêneros em relação ao trabalho de Ramírez *et al.* (2010): *Euglossella* forma um grupo irmão dos outros subgêneros de *Euglossa*, e as posições das espécies dos subgêneros *Glossura*, *Glossurella* e *Glossuropoda* em alguns casos se misturam, não formando grupos distintos por subgênero. No trabalho de Ramírez *et al.* (2010) *Glossura* e *Glossurella*, por exemplo, constituíram um grupo parafilético.

Dois agrupamentos, que se repetiram em todas as árvores, se destacam, pois não corroboram com a classificação de grupos e subgêneros descrita para as espécies, porém, corroboram com dados observados em trabalhos recentes da literatura (Hinojosa-Díaz, 2010; Ramírez, 2010), o agrupamento de *E. rugilabris* com as espécies do subgênero *Glossura* que corrobora com Ramírez (2010) e *E. stellfeldi* constituindo um grupo irmão de *E. annectans* o que possivelmente acresce mais um dado para a discussão sobre os subgêneros de *Euglossa*. Porém, no presente trabalho somente um macho de *E. stellfeldi* foi amostrado, portanto deve-se ter cautela sobre os dados obtidos.

Cockerel (1917) sugeriu a criação do subgênero *Glossura* para incluir espécies com aparelhos bucais alongados e escutelo bigiboso, de modo que as demais espécies formariam o subgênero *Euglossa* s.str. Moure (1967) acrescentou o terceiro subgênero *Euglossella*.

Dressler (1978) cria o quarto subgênero *Dasystilbe* para incluir espécies que compartilhavam características de *Glossura* e *Euglossella*, além de fazer uma abordagem dos quatro subgêneros existentes até então. Neste mesmo trabalho, Dressler separou as espécies descritas de *Euglossa* em 12 grupos (Hinojosa-Díaz, 2010), posteriormente, Dressler (1982c) e Moure (1989) sugeriram a criação de mais dois subgêneros: *Glossurella* e *Glossuropoda* respectivamente (Roubik & Hanson, 2004). Dressler (1982c) propôs a criação desse novo grupo a partir de *Glossura* (espécie tipo *bursigera*), de modo que o grupo se constituiria de indivíduos parecidos com *Glossura*, com algumas espécies com “bolsos” característicos, depressões semicirculares com tufos diagonais de cerdas. Moure (1989) propôs a criação de mais um subgênero (espécie tipo *intersecta*, igualmente presente anteriormente em *Glossura*) com indivíduos que se destacam com um basitarso médio largo.

Hinojosa-Díaz (2010) propõe uma reformulação em *Glossura*, *Glossuropoda* e *Glossurella* os quais formaram alguns ramos parafiléticos na filogenia a partir de dados de caracteres da genitália dos machos.

Faria Jr e Melo (2007) separou a espécie *E. stellfeldi* do subgênero *Glossura* e o classificou para o subgênero *Glossurella* por meio de análises de dados morfológicos dos grupos, de modo que o grupo *Glossura* se constituiria então de espécies com características mais homogêneas. As espécies analisadas por Faria Jr e Melo (2007) de *Glossurella* (incluindo a espécie tipo *E. bursigera*), diferente das espécies de *Glossura*, apresentam uma depressão circular visível sobre a superfície interna da tíbia posterior, como *E. stellfeldi* igualmente apresentou. Porém estes mesmos autores ainda afirmam em seu trabalho que extensas análises filogenéticas são necessárias para provar a posição das espécies nos diferentes subgêneros.

Em relação ao subgênero *Euglossella*, destaca-se a formação de um clado entre *E. viridis* e *E. jacquelynae* para as três análises realizadas. Estas duas espécies são consideradas

espécies distintas por Nemésio (2007; 2009) e reconhecidas como uma única espécie no catálogo Moure (Moure *et al.*, 2012). Neste caso, *E. jacquelynae* é tratada como sinonímia de *E. viridis*. As duas espécies são similares em tamanho e cor, porém, Nemésio (2009) afirma que as duas espécies não são simpátricas e possuem características que as diferem como a forma da mancha paraocular, que é maior em *E. jacquelynae*, e da forma do tufo anterior da mesotibia. Na árvore gerada pelas análises bayesianas, as duas espécies parecem formar ramos que as separam como espécies distintas, porém, este resultado não se repetiu para as outras duas árvores analisadas, portanto, ainda são necessários estudos com um maior número de indivíduos e amostragens de diferentes locais de ocorrência das duas espécies para um melhor esclarecimento sobre estes táxons.

Ainda, Hinojosa-Díaz e Engel (2011) a partir de dados morfológicos e inferências genéticas (Ramírez *et al.*, 2010) fizeram a revisão do subgênero *Euglossella* e a partir de seus resultados, propuseram a divisão deste em dois grupos: grupo *viridis*, já existente em classificações anteriores, e a criação do grupo *decorata*, que se caracterizaria por espécies com coloração amarelo-acastanhada com iridescência na cabeça e mesosoma, e uma ausência quase total de cor metálica no metasoma, diferenciando de *viridis* cujas espécies possuem tegumento do corpo brilhantemente forte, com coloração que pode variar de azul metálico, verde, roxo ou avermelhada (Hinojosa-Díaz & Engel, 2011). Nas análises filogenéticas, *E. decorata* aparece como grupo irmão do clado *E. viridis* + *E. jacquelynae*, o que possivelmente corrobora com a classificação de Hinojosa-Díaz & Engel (2011).

O subgênero *Euglossa* apresentou uma tendência à formação dos grupos previamente descritos com base em caracteres morfológicos (*cordata*, *purpurea*, *analis*, e *cybelia*) (Dressler, 1978), principalmente levando-se em consideração a árvore de máxima parcimônia (Figura 3), no entanto, nos três métodos de reconstrução filogenética *Euglossa* não apresentou

uma topologia completamente resolvida com variações de diferentes táxons entre os grupamentos (Figuras 2, 3 e 4).

A espécie *E. crassipunctata* (subgênero *Glossurella*) nas árvores de máxima verossimilhança e bayesiana (Figuras 2 e 4) agrupou com o clado do subgênero *Euglossa*, neste caso, para que haja a definição da posição desta espécie, possivelmente seja necessário um maior número de caracteres para definição deste táxon, ou ainda a adição de novos táxons para sustentar com melhor precisão os ramos formados (Barraclough & Nee, 2001).

Nas árvores de máxima verossimilhança e bayesiana o gênero *Eulaema* Lepelletier agrupa com *Euglossa* Latreille e posteriormente *Eufriesea* Cockerell agrupa com os dois gêneros, já na árvore de máxima parcimônia a posição de *Eulaema* e *Eufriesea* se inverte. Para Ramírez et al. (2010) as posições dos dois gêneros foi inconsistente, dependendo do método de análise filogenética ou do modelo de evolução de sequência utilizado. Michel-Salzat et al. (2004), encontrou um clado apical formado por *Eulaema* e *Eufriesea*. Já para Dick et al. (2004), analisando uma porção do gene COI os dois gêneros formam um clado que se agrupa posteriormente com o gênero *Euglossa*. Portanto, para a resolução da posição destes táxons ainda são necessários novos estudos.

A árvore que se mostrou mais consistente com os dados da literatura foi a gerada por meio da análise bayesiana, com ramos que apresentaram valores de *bootstraps* mais consistentes, e grupamentos de amostras de uma mesma espécie formados com um maior grau de confiabilidade. Porém, não se pode descartar o uso de diferentes modelos para solucionar pontos específicos dos grupos.

Assim, infere-se a necessidade de maiores esforços para os estudos dos subgêneros de *Euglossa*. Trabalhos que envolvam a genética de populações das diferentes espécies com dúvidas taxonômicas e possíveis reclassificações nos subgêneros possivelmente retratarão de forma mais clara o *status* destas abelhas.

Estes esforços poderão auxiliar inclusive para uma melhor conservação destas, uma vez que algumas espécies que estão sendo propostas como sinonímias podem constituir espécies diferentes, ou ainda espécies tratadas como distintas podem na verdade constituir populações de uma mesma espécie.

Agradecimentos

Ao CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro ao projeto e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROCAD) pelo apoio financeiro e pela bolsa de K.M. Suzuki. Os autores agradecem também aos seguintes pesquisadores pela doação das amostras de diferentes espécies de *Euglossa*: Solange Cristina Augusto, Celso Feitosa Martins, Gabriel Augusto Rodrigues de Melo, André Nemésio, Aline Mackert dos Santos, Willian Moura de Aguiar, Guilherme do Carmo Silveira e Douglas Caldeira Giangarelli. Ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal – IAPAR e Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas – UEL; ao IBAMA e IAP pela autorização para coleta de abelhas

REFERÊNCIAS

- Ackerman J. D. 1983.** Diversity and seasonality of male euglossine bees (Hymenoptera: Apidae) in Central Panama. *Ecology* 64: 274-283.
- Aguiar W.M., Gaglianone M.C. 2008.** Comunidade de abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em remanescentes de Mata Estacional Semidecidual sobre Tabuleiro no Estado do Rio de Janeiro. *Neotropical Entomology* 37: 118-125.
- Arias M.C., Brito R.M., Francisco F.O., Moretto G., 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.
- Ascher J.S., Danforth B.N., Ji S. 2001.** Phylogenetic utility of the major opsin in bees (Hymenoptera: Apoidea): A reassessment. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19: 76-93.
- Barraclough T.G., Nee, S. 2001.** Phylogenetics and speciation. *TRENDS in Ecology & Evolution* 16: 391-399.
- Cameron S.A. 1993.** Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 90: 8687-8691.
- Cameron S.A. 2004.** Phylogeny and biology of Neotropical Orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Entomology* 49: 377-404.
- Cameron S.A., Williams P.H. 2003.** Phylogeny of bumble bees in the New World subgenus *Fervidobombus* (Hymenoptera: Apidae): congruence of molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 552-563.
- Cockerel T.D.A. 1917.** Some Euglossine bees. *Canadian Entomologist* 49: 144-146.
- 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. *Molecular Ecology* 13: 3775-3785.
- Dressler R.L. 1978.** An infrageneric classification of *Euglossa*, with notes on some features of special taxonomic importance (Hymenoptera: Apidae). *Revista de Biologia Tropical* 26: 187-198.
- Dressler, R.L. 1982a.** Biology of orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 373-394.
- Dressler R.L. 1982b.** New species of *Euglossa* II. (Hymenoptera: Apidae). *Revista de Biologia Tropical*. 30: 121-129.
- Dressler R.L. 1982c.** New species of *Euglossa*. III. The *bursigera* species group (Hymenoptera: Apidae). *Revista de Biologia Tropical* 30: 131-140.
- Dressler R.L. 1982d.** New species of *Euglossa*. IV. The *cordata* and *purpurea* species groups (Hymenoptera: Apidae). *Revista de Biologia Tropical* 30: 141-150.

- Faria Jr. L.R.R., Melo G.A.R. 2007.** Species of *Euglossa* (*Glossura*) in the Brazilian Atlantic forest, with taxonomic notes on *Euglossa stellfeldi* Moure (Hymenoptera, Apidae, Euglossina). *Revista Brasileira de Entomologia* 51: 275-284.
- Faria L.R.R. Melo, G.A.R. 2012.** Species of *Euglossa* of the *analis* group in the Atlantic forest (Hymenoptera, Apidae). *Zoologia* 29:349-374.
- 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., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H., Hallwachs, W. 2004.** Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academic of Science* 101: 14812-14817.
- Hines H.M., Hunt J.H., O'Connor T.K., Gillespies J.J., Cameron S.A. 2007.** Multigene phylogeny reveals eusociality evolved twice in vespid wasps. *Proceedings of the National Academic of Science* 104: 3295–3299.
- Hinojosa-Díaz I.A. 2010.** Comparative genital morphology, phylogeny, and classification of the orchid bee genus *Euglossa* Latreille (Hymenoptera: Apidae), with Distributional modeling of adventive Euglossines. PhD Dissertation. University of Kansas, Lawrence Kansas 209 pp.
- Hinojosa-Díaz I.A., Engel M.S. 2011.** *Euglossa williamsi*, a new species of orchid bee from the Amazon Basin of Ecuador and Peru, with notes on its taxonomic association and biogeography (Hymenoptera, Apidae). *ZooKeys* 159: 49–63.
- Michel-Salzat A., Cameron S.A., Oliveira M.L. 2004.** Phylogeny of the orchid bees (Hymenoptera: Apinae: Euglossina): DNA and morphology yield equivalent patterns. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 309-323.
- Michener C.D. 1974.** *The Social Behavior of Bees: A Comparative Study*. Cambridge, Massachusetts: Belknap Press of Harvard University Press. 404p.
- Minckley R.L., Reyes S.G. 1996.** Capture of the orchid bee, *Eulaema polychroma* (Fries) (Apidae: Euglossini) in Arizona, with notes on northern distributions of other mesoamerican bees. *Journal of Kansas Entomological Society* 69: 102-104.
- Moure J.S. 1967.** Descrição de algumas espécies de Euglossinae (Hym., Apoidea). *Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica* 5: 373-394.
- Moure J.S. 1989.** *Glossuropoda*, novo subgênero de *Euglossa*, e duas espécies novas da Amazônia, do mesmo subgênero (Apidae-Hymenoptera). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 84: 387-389.
- Moure J.S., Melo G.A.R., Faria JR L.R.R. 2012.** Euglossini Latreille, 1802. In MOURE, J.S.; URBAN, D.; MELO, G.A.R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version*. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>.
- Nemésio A. 2007.** Three new species of *Euglossa* Latreille (Hymenoptera: Apidae) from Brazil. *Zootaxa* 1547: 21–31.

- Nemésio A. 2009.** Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of the Brazilian Atlantic Forest. *Zootaxa* 2041, 1-242.
- Nemésio A. 2011.** *Euglossa bembei* sp. n. (Hymenoptera: Apidae): a new orchid bee from the Brazilian Atlantic Forest belonging to the *Euglossa cybelia* Moure, 1968 species group. *Zootaxa* 3006: 43-49.
- Pamilo P., Nei M. 1998.** Relationships between Gene trees and Species trees. *Molecular Biology and Evolution* 5: 568-583.
- Rambaut A., Drummond A.J. 2007.** Tracer v1.4, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Ramírez S.R., Roubik D.W., Skov C., Pierce N.E. 2010.** Phylogeny, diversification patterns and historical biogeography of euglossine orchid bees (Hymenoptera: Apidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 100: 552-572.
- 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.
- Rebêlo J.M.M. 2001.** *História natural das euglossíneas – as abelhas das orquídeas*. São Luís: Lithograf, 152p
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. 2003.** MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rosenberg N.A., Nordborg M. 2002.** Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews Genetics* 3: 380-390.
- Roubik D.W., Hanson P.H. 2004.** *Orchid bees of Tropical America, Biology and field guide*. Heredia, Costa Rica: INBio Press.
- Schneider H. 2007.** *Métodos de análise filogenética: um guia prático*. Ribeirão Preto: Holos Editora.
- 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.
- Skov C., Wiley J. 2005.** Establishment of the neotropical orchid bee *Euglossa viridissima* (Hymenoptera: Apidae) in Florida. *The Florida Entomologist* 88: 225-227.
- Sofia S.H., Suzuki K.M. 2004.** Comunidades de machos de abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em fragmentos florestais no Sul do Brasil. *Neotropical Entomology* 33: 693-702.
- Sofia, S.H., Santos, A.M., Silva, C.R.M. 2004.** Euglossine bees (Hymenoptera, Apidae) in a remnant of Atlantic Forest in Paraná State, Brazil. *Itheringia* 94: 217-222.

- Suzuki K.M., Arias M.C., Giangarelli D.C., Freiria G.A., Sofia, S.H. 2010.** Mitochondrial DNA diversity of orchid bee *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera, Apidae) populations assessed by PCR-RFLP. *Biochemical Genetics* 48: 326-341.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011.** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739.
- Whitfield J.B., Cameron, S.A. 1998.** Hierarchical analysis of variation in the mitochondrial 16S rRNA gene among Hymenoptera. *Molecular Biology and Evolution* 15: 1728-1743.
- Xia X. 2000.** *Data analysis in molecular biology and evolution*. Boston/Dordrecht/London: Kluwer Academic Publishers.

Capítulo 4**An orchid bee showing both female and male morphological features: a gynandromorph
or intersex individual?**

Karen M. Suzuki¹, Douglas C. Giangarelli¹, Solange C. Augusto^{2,*}, Silvia H. Sofia^{1,*}

¹Laboratório de Genética e Ecologia Animal, Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, km 380, 86051-980, Londrina, PR, Brazil

²Laboratório de Ecologia e Comportamento de Abelhas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, Bloco 2D, 38400-902 Uberlândia- MG, Brazil

Short title: An anomalous orchid bee

*E-mail: shsofia@uel.br; scaugusto@umuarama.ufu.br

Corresponding author: S.H. Sofia, shsofia@uel.br

Submetido à Revista Apidologie

Abstract

This study used morphological and genetic approaches to describe for the first time an individual of a euglossine bee (*Euglossa melanotricha*) showing both female and male morphological features. The genetic analysis was based on microsatellite markers, which were amplified from DNA extracted from left and right insect hind legs, exhibiting male and female phenotypes, respectively. The morphological analysis revealed that the individual studied had a sting and most parts of the insect body, except for the three left legs, showing female phenotype. From the nine microsatellite loci amplified, none was heterozygous for both phenotypes/samples analyzed. The genetic results suggest two main possibilities: the bee showing female and male morphological features is either a hemizygous (or haploid) for both body parts genotyped or a diploid individual, but homozygous for all loci analyzed. Our findings indicate that the organism analyzed is an intersex, since both female and male body parts (tissue) of this individual were genetically uniform.

Euglossini / *Euglossa melanotricha* / microsatellite / anomalous bee / euglossine

INTRODUCTION

In morphological terms, gynandromorphs and intersex can be defined as organisms that have both male and female characteristics in the same individual (Narita et al., 2010; Negri and Pellecchia, 2012; Tulgetske and Stouthamer, 2012). Nevertheless, while the first ones are genetically chimerical organisms, exhibiting both male and female genotypes in their tissues, intersex are characterized for being genetically uniform and, consequently, at least some parts of their tissues have either a sexual phenotype opposite to their genetic sex or an intermediate sexual phenotype (Narita et al., 2010).

Among insects of the order Hymenoptera, there are several reports on the occurrence of gynandromorph (or intersex) individuals in nature (Michez et al., 2009; Narita et al., 2010). In most of these studies, gynandromorphy is the term most commonly used, since with some exceptions (Beukeboom et al., 2007a; Dobata et al., 2012), the reports on cases of gynandromorphism are restricted to morphological descriptions (Gonzalez, 2004; Engel, 2007; Lucia et al., 2009, Sampson et al., 2010; Giangarelli and Sofia, 2011).

Especially in bees, over 100 cases of gynandromorphism involving different species are described in the literature (reviewed by Wcislo et al., 2004; Michez et al., 2009; Hinojosa-Díaz et al., 2012). Although the mechanisms that generate gynandromorphs (and intersexes) have not yet been completely elucidated, the occurrence of gynandromorphs among these and other hymenopterans has been attributed to the haplodiploid sex-determination system (Yoshizawa et al., 2009; Narita et al., 2010).

In haplodiploid insects, such as bees, the common mode of reproduction is arrhenotoky, from which males arise from unfertilized (haploid) eggs, and thus are hemizygous, while females arise from fertilized eggs and thus are diploid organisms (Cook, 1993). Within hymenopterans, a number of sex determining mechanisms has been proposed attempting to explain how males and females are produced under this haplodiploid system

(Beukeboom et al., 2007a). Particularly in bees, the single locus-complementary sex determination (sl-CSD) system, involving the *csd* multiallelic locus, was proved to occur for different species (Van Wilgenburg et al., 2006; Beukeboom et al., 2007a). Under sl-CSD, bees that are heterozygous at this locus develop into female phenotypes, whereas hemizygous develop into haploid males (Cook and Crozier, 1995; Van Wilgenburg et al., 2006). On the other hand, in diploid individuals, when the *csd* locus is in homozygosis, diploid males, usually sterile and unviable, can also be produced (Cook and Crozier, 1995; Zayed, 2009).

With regard to the genetic aspects involving gynandromorphism in bees, three main hypotheses reviewed by Michez et al. (2009) have been proposed, in an attempt to explain the emergence of gynandromorphs in these insects: (a) embryogenic fertilization, (b) polyspermy, and (c) elimination of chromosomes. The first hypothesis seeks to explain the onset of maternal characters expressed in the male parts of the gynandromorphs. In this case, such occurrence is attributed to a delay in the entrance of the sperm into the oocyte cytoplasm and the fusion of maternal and paternal nuclei only after the first cleavage of the oocyte (Gordh and Headrick, 2001; Michez et al. 2009). The second hypothesis relies upon records of gynandromorphs produced in laboratory and, therefore, from known parents, displaying paternal characters in the male parts of the body of such gynandromorphs. The explanation involving polyspermy presented herein is ascribed to the penetration of two sperms into the oocyte, one of which yielding a diploid nucleus after fusion with the oocyte nucleus and the second originating a haploid nucleus with a paternal genome (Morgan, 1905; Rothenbuhler et al., 1952; Michez et al., 2009). The third hypothesis, which purports the elimination of the chromosome, could explain the occurrence of female and male characters in diploid tissues. Due the expression of the CSD locus, the tissues with male characteristics should be hemizygous or homozygous, and the female tissues heterozygous. In this case, the elimination

of the chromosome would result in the loss of the features regulated by the CSD locus (Gordh and Headrick, 2001). This loss would occur during the zygote's cell division, when a female nucleus would lose the CSD locus, although duplicate genetic content is still maintained for the remaining loci. Another possibility is the occurrence of mutation and/or inhibition of only the CSD allele and not of the entire chromosome (Michez et al., 2009). Such authors sustain that the currently available molecular methodologies can help elucidate the possible genetic mechanisms involved in the origin and development of gynandromorphs. In fact, in a recent study of microsatellite markers, Dobata et al. (2012) observed that the tissues showing a female phenotype of a gynandromorph ant (*Diacamma* sp), had alleles consistent with its biparental inheritance (diploid), whereas most of the tissues with male characteristics possessed alleles indicating the possible occurrence of androgenesis, i.e., paternal origin of the tissue (haploid).

As regards the study of bees, Paxton et al. (2009) support that the codominant nature of microsatellites makes them potentially important tools for the inference of ploidy in this group of Hymenoptera. Microsatellites have been employed and proven effective in the determination of kinship between individuals of the same colony (Cowan and Stahlhut, 2004). Furthermore, microsatellite markers have helped in the study of cases of diploid males in orchid bees (Souza et al., 2010), for which three recent publications bring the first reports of the occurrence of gynandromorphs (Giangarelli and Sofia, 2011; Hinojosa-Díaz et al., 2012; Silveira et al., 2012), although none of these studies carried out a genetic analysis of the specimens described.

Thus, the present study aimed to describe morphologically an anomalous individual of the species *Euglossa melanotricha* Moure, 1967, showing the morphological characteristics of both sexes and based on the use of microsatellite markers provide information on the genotype of this organism.

MATERIAL AND METHODS

The species *Euglossa (Euglossa) melanotricha* is typical of ecosystems with more open vegetation domains (Silveira et al., 2002), such as the Cerrado biomes (Alvarenga et al., 2007), where the only known nests were recorded (Augusto and Garofalo, 2007). Normally found in high altitude areas (> 1000m above sea level) in southeastern Brazil, this bee is rare or absent in regions of low altitude (Nemésio, 2009).

The individual of *E. melanotricha* analyzed in this study was collected after its emergence in a nest, whose development had being accompanied through direct observations. This nest was found by one of the authors (Augusto, SC) in a cavity of the ground, in an area of the Cerrado bioma (Brazilian savanna), located in Uberlândia (18°55'S and 48°17'W), State of Minas Gerais, southeastern Brazil.

For the comparative genetic analyses, we utilized two females collected from the same nest of the studied specimen, but from another generation, and two males collected with odor-baits near a forest fragment in the municipality of Piumhi, state of Minas Gerais, southeastern Brazil.

The morphological description used for the analyzed specimen was based on Giangarelli and Sofia (2011). Morphological measurements and photographic records of this individual were performed using a stereo photo microscope (Motic SMZ 168; Speed Co. Ltd., Xiamen, China). The morphological measurements were taken three times with the help of the Motic Image Plus 2.0 software. In this work, we will present the average measurements obtained.

For the genetic analyses of the individual presenting characteristics of both sexes, we performed DNA extractions from the right and left legs of the bee (showing, respectively, female (F) and male (M) phenotypes). In the case of the two males and two females specimens analyzed for comparative purposes, DNA was obtained from the right hind leg.

The DNA extraction method was based on Suzuki et al. (2010) with some modifications. The material was minced using scissors, and subsequently, samples were incubated with proteinase K (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) and extraction buffer (1% SDS, 200 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 8.0), for 2 h at 64°C. Then, DNA was purified with standard phenol-chloroform extractions, precipitated with ice-cold absolute ethanol, and resuspended in 70 μL TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). The DNA concentration was determined using a DyNA Quant 200 fluorometer (Hoefer) using Hoechst 33258 dye and was diluted so that all DNA samples were at a standard concentration (5 ng/ μL).

For the amplification reactions, we tested 16 different pairs of primers described for *Euglossa cordata* (Souza et al., 2007) and *Euglossa annectans* (Paxton et al., 2009) and nine primers were selected for the analyses. The annealing temperatures of each *primers* where optimized for use in the PCR reactions. The amplified loci and their annealing temperatures were: Egc26 and ann4 (50°C), ann2 (53°C), Egc24, Egc51 and ann8 (54°C) and Egc37 and ann41 (56°C). The forward primers of each pair received a small additional 5' end tag (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'). This same short sequence was synthesized with the addition of one of the three 6-FAM, HEX and NED fluorophores independently to be used as a third primer, following the amplification strategy described by Schuelke (2000).

Each PCR reaction was carried out in a 5- μL solution containing 1 μL of DNA template, 2.5 μL GoTaq[®] Colorless Master Mix (Promega) 2x, 0.1 μL glycerol, 0.125 μM of tailed primer, 0.125 μM of reverse primer, 0.0125 μM of forward primer and ultrapure water.

The amplifications were performed in a thermocycler (PTC-100, MJ Research, Inc.); the protocol was optimized according to the pair of primers utilized. The amplifications began with an initial denaturation at 95°C for five minutes, followed by 10 cycles comprising an initial step of denaturation for 30 seconds at 94°C, a primer annealing step of one minute with

a temperature that varied according to the primer utilized, and a final step of one minute at 72°C, followed by 25 additional cycles consisting of 30 seconds at 89°C and one minute annealing at the same temperature used in the 10 previous cycles and one minute at 72°C. After the cycles, a final extension was applied for 30 minutes at 72°C.

The fragments yielded by PCR were submitted to automatic electrophoresis in an ABI sequencer model 3500xl (Applied Biosystems). A GeneScan™ 600-LIZ ® (Applied Biosystems) was used as the standard marker of the fragment sizes. The sample genotypes were analyzed using the GeneMarker 1.85 software (SoftGenetics, State College, PA) and checked manually.

RESULTS

Considering that in the literature the terms gynandromorph and intersex are often used interchangeably (Tulgetske and Stouthamer, 2012), in the current study the term ‘gynandromorph’ will be used hereinafter aiming to clarify the presentation and discussion of the results.

- Morphological description of the ‘gynandromorph’:

The individual analyzed showed a total body length of 11.17 mm and width (between the wings) of 3.52 mm. The head width measured 4.82 mm and the right and left jaws, 1.64 mm and 1.24 mm, respectively. The right and left antennae, measuring 3.58 mm and 3.58 mm, respectively, had 12 segments.

Most of the body showed female characteristics: paraocular unstained head (Fig. 1a) and antennae with 12 segments; scutellar tuft (Fig. 1d) and stinger (Fig. 1f). However, the right side legs exhibited a female phenotype and the left side legs, a male phenotype (Fig. 1a, b): (i) metatibia with a slit (left side) (male feature) (Fig. 1h), (ii) metatibia with a corbicula (right) (female feature) (Fig. 1i), (iii) mesotibia (left) with a velvety area with basal and distal

cushions (typical male characteristics) (Fig. 1j), (iv) mesotibia (right side) without velvety area and cushions (Fig. 1k).

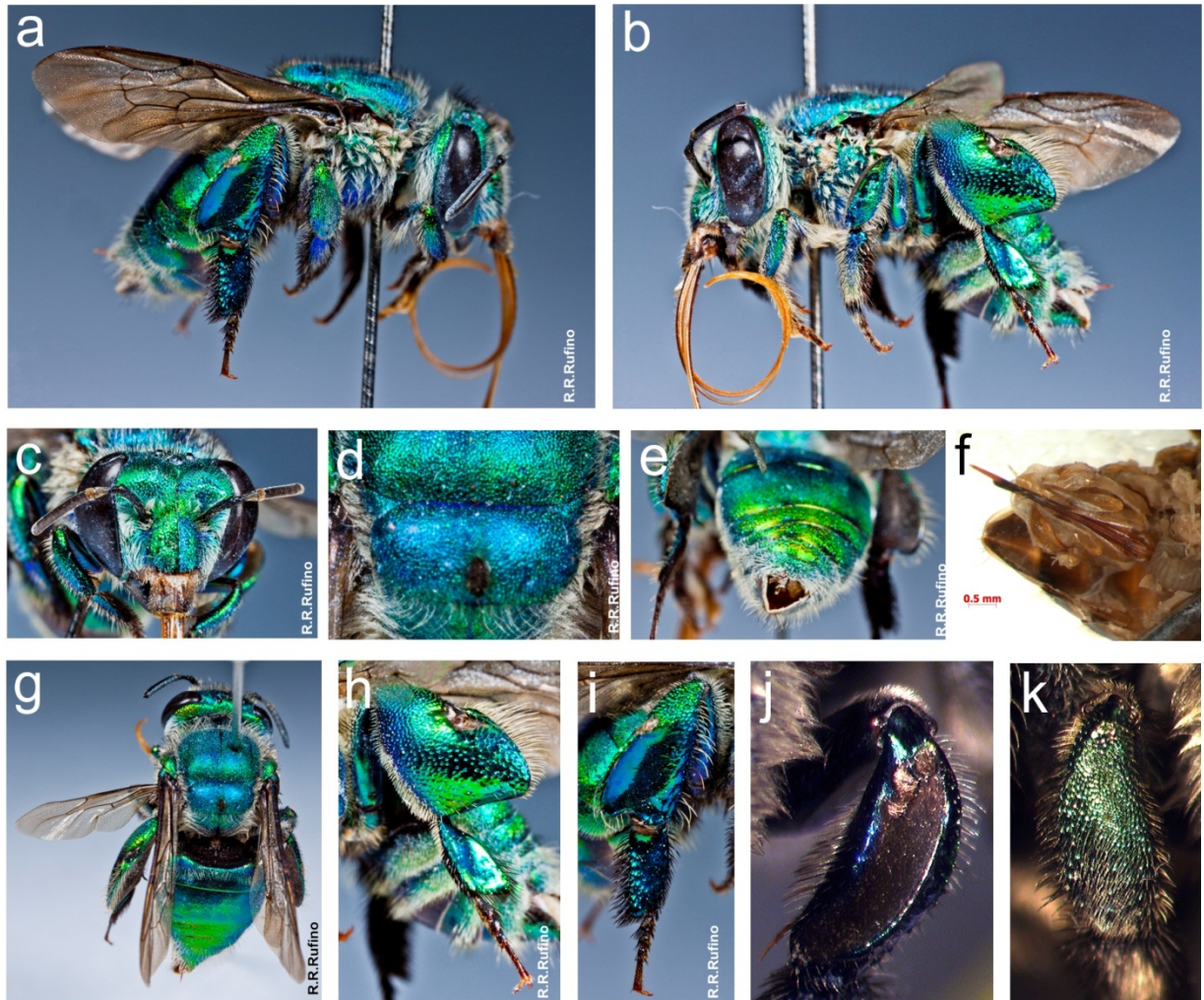


Fig. 1 Individual of *Euglossa melanotricha* with male and female phenotypic characteristics. a: side view (right), b: side view (left), c: front view of the head; d: scutellum with a scutellar tuft (as observed in the female of this species), e: view of the abdomen showing the sting; f: ventral view of the sting; g: dorsal view, h: metatibia (left) with the presence of slit, i: metatibia (right) with Corbicula; j: mesotibia (left) with velvety area and basal and distal cushions; k: mesotibia (right side)

- Genetic analysis of the ‘gynandromorph’:

For each of the nine loci studied, we observed the occurrence of a single allele for both metatibiae analyzed (left/M and right/F) i.e., both samples of the analyzed individual presented the same genotype, which was compatible with a hemizygous individual or homozygous diploid. As regards the males (1 and 2) and female controls (1 and 2), the results

revealed that the two analyzed males showed a single allele per locus, compatible with the haploid or hemizygous pattern of male bees, while the two females were heterozygous for at least one of the nine loci investigated.

With respect to female 1 (F1), from the nine amplified loci, at least six revealed to be heterozygous, while female 2 (F2) was heterozygous at eight of the nine loci (Table I). Among all amplified loci in this work, despite having proven to be polymorphic, locus ann41 was ineffective to reveal heterozygosis among the analyzed females. The estimated sizes of each allele identified at the nine microsatellite loci ranged from 115 bp (primer ann04) to 221 bp (primer Egc51) (Table I).

Table I. Alleles found at the nine loci of analyzed microsatellites for leg samples (left/male and right/female) of the anomalous individual of *Euglossa melanotricha*, showing the phenotypes of both sexes, and for the samples (legs) of the two males (M1 and M2) and two females (F1 and F2) of this species exhibiting normal phenotypes, which were used in comparative analyses.

Alleles size range for each locus		Alleles found for each sample					
Locus	Size (pb)	Left leg (male phenotype)	Right leg (female phenotype)	Normal M1	Normal M2	Normal F1	Normal F2
Egc 24 ^a	(192-204) ^a	187	187	199	199	190 / 199	199 / 202
Egc 26 ^a	(164-168) ^a	162	162	162	162	159 / 162	159 / 162
Egc 37 ^a	(154-166) ^a	155	155	149	149	149 / 152	152 / 155
Egc 51 ^a	(223-229) ^a	210	210	218	218	218 / 218	218 / 221
ann 02 ^b	(186-200) ^b	194	194	176	174	174 / 198	192 / 198
ann 04 ^b	(129-145) ^b	127	127	119	121	121 / 121	115 / 121
ann 08 ^b	(145-171) ^b	121	121	141	141	137 / 145	137 / 139
ann 24 ^b	(165-197) ^b	169	169	163	159	159 / 169	169 / 169
ann 41 ^b	(164-176) ^b	158	158	154	154	154 / 154	154 / 154

^aSouza et al. (2007) tested on *E. melanotricha*; ^bPaxton et al. (2009) estimated for *E. annectans*.

DISCUSSION / CONCLUSION

Different authors have proposed some categories or classes of gynandromorphism in Hymenoptera in an attempt to group the individuals presenting some kind of morphological pattern in the distribution of male and female characters throughout the body (Dalla Torre and Friese, 1899; Michez et al., 2009). In a review of the records and studies of gynandromorphism in bees, Michez et al. (2009) recognize three main categories: 1) bilateral, if the male and female parts of the body are the same and symmetric, 2) transverse, if the sexual characteristics are distributed into two asymmetric parts, and 3) mosaic (or mixed), if the sexual characteristics are randomly distributed throughout the body. According to Weislo et al. (2004), the mosaic (or mixed) class is most frequently found in bees, although there are discrepant data in the literature regarding this occurrence (Michez et al., 2009).

The present work purports that despite the clear predominance of female tissues, especially throughout the head, mesosoma and metasoma, the analyzed individual can be inserted into the mosaic (or mixed) category, as it has male and female characteristics unevenly distributed throughout its body. Similarly to our results, the three other cases of gynandromorphism in orchid bees (*Euglossa iopoecila* Dressler, *Euglossa tridentata* Moure and *Eulaema athleticana* Nemésio) recently published also correspond to the asymmetric mosaic pattern (Giangarelli and Sofia, 2011; Hinojosa-Díaz et al., 2012; Silveira et al., 2012).

Engel (2007) conveys that reports of the internal morphological aspects in bee gynandromorphs are most needed and still scarce in the literature. Although this work accomplished only a partial dissection of the metasoma, it was possible to identify the presence of an apparently normal stinger in the metasoma of the *E. melanotricha* specimen analyzed. Recently, the presence of this organ was also reported for the species *Eulaema athleticana* (Silveira et al., 2012). In the case of this species, as well as in *E. melanotricha*, the metasoma showed entirely phenotypic female characteristics.

Concerning the genetic findings, which revealed the occurrence of only one allele per microsatellite locus analyzed, it seems acceptable to suppose that the tissues from the left (male trait) and right (female trait) legs of *E. melanotricha* studied herein are haploid (at least with regard to the male body part) and/or diploid homozygous at the nine loci. However, several studies involving euglossine females and amplification of a number of microsatellite loci, similar to those analyzed in the present work, revealed that females of these bees are heterozygous at least at one locus (Paxton et al., 2009; Souza et al., 2010; Cerântola et al., 2011). Cerântola et al. (2011), analyzing nine microsatellite loci for the study of 11 populations of *Euglossa cordata* L., observed the presence of heterozygous females at all loci analyzed.

As previously mentioned (see Materials and Methods section), from the nine loci employed in the genotyping of five individuals of *E. melanotricha* analyzed herein (i.e. the 'gynandromorph', the two males and the two females with normal phenotype), four were described by Souza et al. (2007) for the species *E. cordata* and five were described for *E. annectans* (Paxton et al., 2009). When comparing the heterozygosity (H_o) observed in the analysis of females of these two studies, it appears that, from this set of loci, only the locus ann41 showed a low value of H_o (0.143) in the analysis of 21 females of *E. annectans* (Paxton et al., 2009), while the remaining seven loci showed estimates of H_o ranging from 0.45 to 0.95 in the species studied (Souza et al., 2007, Paxton et al., 2009).

Thus, in the present work, considering the high efficiency of most analyzed loci in detecting heterozygous females (except for locus ann41), the results suggest that the anomalous individual of *E. melanotricha*, is probably a hemizygote organism. Furthermore, when considering the genetic uniformity of the phenotypically different tissues (male and female) of this individual, the gynandromorphism of *E. melanotricha* analyzed here seems to be, in fact, an intersex body.

If the assessed individual of *E. melanotricha* is actually a hemizygous, as suggested by the results, the three main hypotheses proposed to explain the origin of gynandromorphs in Hymenoptera (i.e., embryonic fertilization, polyspermy and elimination of chromosomes (see Rothenbuhler, 1958 and Michez et al., 2009), which consider the presence of at least some diploid tissue in the gynandromorphs produced, should then be discarded here.

On the other hand, if both samples are haploid, this would necessarily result in a change in the *csd* gene regulation, which, under normal conditions, produces only females in heterozygous diploid organisms for the alleles of this gene (Cook, 1993; Van Wilgenburg et al., 2006; Heimpel and de Boer, 2008). The occurrence of heterozygous in this locus expresses a factor responsible for the *splicing* of the mRNA of the gene called feminizer (*fem*) (described in Apidae bees), which is involved in the development of females (Hasselmann et al., 2008; Rabeling and Kronauer, 2013).

Like other Hymenoptera with complementary sex determination (CSD), female orchid bees are diploid and males are normally haploid (Paxton et al., 2009). Thus, the origin of haploid tissues with female phenotype in the case of the individual of *E. melanotricha* becomes very difficult to explain. Beukeboom et al. (2007b) reported the occurrence of haploid females in the wasp of the species *Nasonia vitripennis* Walker. However, it is worth noting that these wasps do not possess the CSD locus. In this species, the sex determination usually occurs by 'maternal imprinting' or from the expression of the gene *transformer* (*tra*) (homologous to the *fem* gene) of maternal origin. The regulation occurs through the splicing of the mRNA of the *tra* from a factor generated by the paternal active gene. In diploid organisms, there is the occurrence of the *splicing* that generates the development of females, while in haploid organisms, the gene that regulates the splicing is deactivated, enabling the occurrence of generation of males (Rabeling and Kronauer, 2013). In the case of haploid

females of the *Nasonia vitripennis*, a failure of imprinting triggers the splicing of the mRNA of the *tra* (Beukeboom et al., 2007a).

In recent years, some studies have reported the infection of different species of Hymenoptera, including bees (*Apis mellifera*), by endosymbiotic bacteria of the genus *Wolbachia* (Heimpel and de Boer, 2008; Narita et al., 2010; Pattabhiramaiah et al., 2011). This bacterium would induce the feminization of an unfertilized egg through genome duplication (diploidization). However, it is not possible to explain the occurrence of homozygous diploid in an organism regulated by the CSD locus (Heimpel and de Boer, 2008).

Thus, in our study, if both samples (male and female legs) of *E. melanotricha* are diploid tissues, what it seems not to be the case, the male characteristics could be attributed to a homozygosity at the CSD locus, while female phenotypes would not find any explanation in the current literature. Taking into consideration the single locus complementary sex determination (sl-CSD) mechanism, usually accepted to explain the expression of male and female phenotypes in euglossine bees (Paxton et al., 2009; Asplen et al., 2009), both hemizygous (n) or homozygous (2n) genotypes in an intersex bee cannot explain how male and female phenotypes could be simultaneously expressed in the anomalous individual herein studied. Based on this, we suggest that future studies involving bees showing morphological characteristics of both sexes in the same individual, such as the specimen of *E. melanotricha* should be conducted. Such studies could be done using different genetic analyses, involving different methodologies, such as cytogenetic and flow cytometry analyses, which can be of great value in the attempt to better elucidate how these gynandromorphic and intersex organisms are generated. At the same time, studies consisting in the analysis and detection of several genes involved in the regulation of the sex determination could help to understand which mechanisms (environmental, physiological and genetic) are involved in this process.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ronaldo Ronan Ruffino for the photographic work and to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and CAPES/PROCAD (158/2007) for granting a scholarship to K. M. Suzuki and for their financial support to this study.

REFERENCES

- Alvarenga P.E.F., Freitas R.F., Augusto S.C. (2007) Diversidade de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em áreas de cerrado do Triângulo Mineiro, MG, Biosci. J. 23, 30-37.
- Asplen M.K., Whitfield J.B., De Boer J.G., Heimpel G.E. (2009) Ancestral state reconstruction analysis of hymenopteran sex determination mechanisms, J. Evolution. Biol. 22, 1762-1769.
- Augusto S.C., Garófalo C.A. (2007) Nidificação de *Euglossa (Euglossa) melanotricha* Moure (Hymenoptera: Apidae) no solo do cerrado, Neotrop. Entomol. 36, 153-156.
- Beukeboom L.W., Kamping A., van de Zande L. (2007a) Sex determination in the haplodiploid wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Chalcidoidea): A critical consideration of models and evidence, Semin. Cell Dev. Biol. 18, 371-378.
- Beukeboom L.W., Kamping A., Louter M., Pijnacker L.P., Katju V., Ferree P.M., Werren J.H. (2007b) Haploid females in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*, Science 315, 206.
- Cerântola N.C.M., Oi C.A., Cervini M., Del Lama M.A. (2011) Genetic differentiation of urban populations of *Euglossa cordata* from the state of São Paulo, Brazil, Apidologie 42, 214-222.
- Cook J.M. (1993) Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence, Heredity 71, 421-435.
- Cook J.M., Crozier R.H. (1995) Sex determination and population biology of the Hymenoptera, Trends. Ecol. Evol. 10, 281-286.
- Cowan D.P., Stahlhut J.K. (2004) Functionally reproductive diploid and haploid males in an inbreeding hymenopteran with complementary sex determination, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 10374-10379.

- Dalla Torre K.W., Friese H. 1899. Die hermaphroditen und gynandromorphen Hymenopteren, Ber. Nat. Med. Ver. 24, 1-96.
- Dobata S., Shimoji H., Ohnishi H., Hasegawa E., Tsuji K. (2012) Paternally inherited alleles in male body parts of an ant (*Diacamma* sp.) sex mosaic: implication for androgenetic male production in the Hymenoptera, Insect. Soc. 59, 55-59.
- Engel M.S. (2007) A lateral gynandromorph in the bee genus *Thyreus* and the sting mechanism in the Melectini (Hymenoptera: Apidae), Am. Mus. Novit. 3553, 1-11.
- Giangarelli D.C., Sofia S.H. (2011) First Record of a Gynandromorph Orchid Bee, *Euglossa iopoecila* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini), Ann. Entomol. Soc. Am. 104, 229-232.
- Gordh G., Headrick D. (2001) A Dictionary of Entomology, CABI publishing, New-York.
- González V.H. (2004) A gynandromorph of *Megachile (Austromegachile) montezuma* Cresson (Hymenoptera: Apoidea, Megachilidae), Entomotropica 19, 155-156.
- Hasselmann M., Gempel T., Schiøtt M., Nunes-Silva C.G., Otte M., Beye M. (2008) Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees, Nature 454, 519-523.
- Heimpel, G.E., de Boer J.G. (2008) Sex Determination in the Hymenoptera, Annu. Rev. Entomol. 53, 209-230.
- Hinojosa-Díaz I.A., Gonzalez V.H., Ayala R., Mérida J., Sagot P., Engel M.S. (2012) New orchid and leaf-cutter bee gynandromorphs, with an updated review (Hymenoptera, Apoidea), Zoosyst. Evol. 88, 205-214.
- Lucia M., Abrahamovich A.H., Alvarez L.J. (2009) A Gynandromorph of *Xylocopa nigrocincta* Smith (Hymenoptera: Apidae), Neotrop. Entomol. 38, 155-157.
- Michez D., Rasmont P., Terzo M., Vereecken N.J. (2009) A synthesis of gynandromorphy among wild bees (Hymenoptera: Apoidea), with an annotated description of several new cases, Ann. Soc. Entomol. 45, 365-375.

- Morgan T.H. (1905) An alternative interpretation of the origin of gynandromorphous insects, *Science* 21, 632-634.
- Narita S., Pereira R.A.S., Kjellberg F., Kageyama D. (2010) Gynandromorphs and intersexes: potential to understand the mechanism of sex determination in arthropods, *Terr. Arthropod Rev.* 3, 63-96.
- Negri I., Pellicchia M. (2012) Sex steroids in insects and the role of the endosymbiont *Wolbachia*: A new perspective, in: Dubey R. (Ed.), *Sex Hormones*, InTech, Rijeka, pp.353-374.
- Nemésio A. (2009) Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of the Brazilian Atlantic Forest, *Zootaxa* 2041, 1-242.
- Pattabhiramaiah M., Brueckner D., Witzel K.P., Junier P., Reddy M.S. (2011) Prevalence of *Wolbachia* in the European honeybee, *Apis mellifera carnica*, *World Appl. Sci. J.* 15, 1503-1506.
- Paxton R.J., Zobel M.U., Steiner J., Zillikens A. (2009) Microsatellite loci for *Euglossa annectans* (Hymenoptera, Apidae) and their variability in other orchid bees, *Mol. Ecol. Resour.* 9, 1221-1223.
- Rabeling C., Kronauer D.J.C. (2013) Thelytokous parthenogenesis in eusocial Hymenoptera, *Annu. Rev. Entomol.* 58, 273-292.
- Rothenbuhler W.C., Gowen J.W., Park O.W. (1952) Androgenesis with zygogenesis in gynandromorphic honeybees (*Apis mellifera* L.), *Science* 115, 637-638.
- Sampson B.J., Kirker G.T., Werle C. T. (2010) Morphology, courtship and mating of a mixed bilateral gynander of *Osmia ribifloris biedermannii* Michener (Hymenoptera: Megachilidae), *J. Kansas Entomol. Soc.* 83, 347-351.
- Schuelke M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments, *Nat. Biotechnol.* 18, 233-234.

- Silveira F.A., Melo G.A., Almeida E.A.B. (2002) Abelhas brasileiras – sistemática e identificação, MMA e Fundação Araucária, Belo Horizonte.
- Silveira M.S., Peixoto M.H.P., Martins C.F., Zanella F.C.V. (2012) Gynandromorphy in *Eulaema atleticana* Nemésio (Apidae, Euglossini), EntomoBrasilis 5, 238-241.
- Souza R.O., Cervini M., Del Lama M.A., Paxton R.J. (2007) Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera, Apidae), Mol. Ecol. Notes 7, 1352-1356.
- Souza R.O., Del Lama M.A., Cervini M., Mortari N., Eltz. T., Zimmermann Y., Bach C., Brosi B.J., Suni S., Quezada-Euán J.J.G., Paxton R.J. (2010) Conservation genetics of neotropical pollinators revisited: microsatellite analysis suggests that diploid males are rare in orchid bees, Evolution 64, 3318-3326.
- Suzuki K.M., Arias M.C., Giangarelli D.C., Freiria G.A., Sofia S.H. (2010) Mitochondrial DNA diversity of orchid bee *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera, Apidae) populations assessed by PCR-RFLP, Biochem. Genet. 48, 326-341.
- Tulgetske G.M., Stouthamer R. (2012) Characterization of intersex production in *Trichogramma kaykai* infected with parthenogenesis-inducing *Wolbachia*, Naturwissenschaften 99, 143-152.
- Van Wilgenburg E., Driessen G., Beukeboom L.W. (2006) Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an "unintelligent" design?, Front. Zool. 3, 1-15.
- Wcislo W.T., Gonzalez V.H., Arneson L. (2004) A review of deviant phenotypes in bees in relation to brood parasitism, and a gynandromorph of *Megalopta genalis* (Hymenoptera: Halictidae), J. Nat. Hist. 38, 1443-1457.
- Yoshizawa J., Mimori K., Yamauchi K., Tsuchida K. (2009) Sex mosaics in a male dimorphic ant *Cardiocondyla kagutsuchi*, Naturwissenschaften 96, 49-55.
- Zayed A. (2009) Bee genetics and conservation, Apidologie 40, 237-262.

CONCLUSÕES

- 1) As análises de distância genética e filogenéticas indicam que os indivíduos de *E. iopocila* e *E. roubiki* constituem uma mesma espécie. Porém, existe uma tendência a formação de grupos que correspondem às áreas de endemismo da Mata Atlântica.

- 2) Os dados indicam o subgênero *Euglossella* como grupo irmão dos outros subgêneros de *Euglossa*, ainda, alguns ramos das árvores geradas se mostraram parafiléticos corroborando os resultados de outros trabalhos, que apontam um agrupamento entre *Glossura*, *Glossurella* e *Glossuropoda*. Os resultados apontam para a necessidade de uma revisão dos subgêneros de *Euglossa*.

- 3) O indivíduo da espécie *E. melanotricha* possui a maior parte do corpo com fenótipo feminino, com exceção das três pernas do lado esquerdo. Os locos microssatélites analisados mostraram um genótipo ou haplóide, ou homocigoto para ambas as partes (feminina e masculina) analisadas. Os resultados indicam ainda que o organismo da espécie *E. melanotricha* se trata de um organismo intersexo, pois este possui partes femininas e masculinas (tecidos fenotipicamente diferentes) e é geneticamente uniforme.

REFERÊNCIAS

AB' SABER, A.N. A teoria dos refúgios: Origem e significado. **Revista do Instituto Florestal**, Edição Especial. 1992.

AB' SABER, A.N. **Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas**. São Paulo: Atelié Editorial. 2003.

ACKERMAN, J. D. Diversity and seasonality of male euglossine bees (Hymenoptera: Apidae) in Central Panama. **Ecology**, v. 64, p. 274-283. 1983.

ADLER, P.H.; FOOTTIT, R.G. Introduction. In: FOOTTIT, R.G.; ADLER, PETER H. **Insect Biodiversity: Science and Society**, pp. 1-6. UK: Wiley-Blackwell. 2009.

AGUIAR, A.P.; CHIARELLO, A.G.; MENDES, S.L.; Matos, E.N. Os Corredores Central e da Serra do Mar na Mata Atlântica brasileira. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (Eds.) **Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas**. Belo Horizonte: Conservação Internacional. 2005.

AGUIAR W.M.; GAGLIANONE M.C. Comunidade de abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em: **Remanescentes de Mata Estacional Semidecidual sobre Tabuleiro no Estado do Rio de Janeiro**. Neotropical Entomology. 37, 118-125. 2008

ALVARENGA, P.E.F.; FREITAS R.F.; AUGUSTO, S.C. Diversidade de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em áreas de cerrado do Triângulo Mineiro, MG. **Bioscience Journal**, v. 23, p. 30-37. 2007.

ÁLVAREZ, I., WENDEL, J.F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular, Phylogenetics and Evolution**, v. 29, p. 417-434. 2003.

ANJOS-DA-SILVA, E. J.; REBÊLO, J. M. M. A new species of *Exaerete* Hoffmannsegg (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) from Brazil. **Zootaxa**, v. 1105, p. 27–35. 2006.

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

ARIAS M.C.; BRITO, R.M.; FRANCISCO, F.O.; MORETTO, G.; OLIVEIRA, F.F.; SILVESTRE, D.; SHEPPARD, W.S. Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. **Apidologie**, v. 37, p. 259-274. 2006.

ASCHER, J.S.; DANFORTH, B.N.; JI, S. Phylogenetic utility of the major opsin in bees (Hymenoptera: Apoidea): A reassessment. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 19, p. 76-93. 2001.

ASPEN, M.K.; WHITFIELD, J.B.; DE BOER, J.G.; HEIMPEL, G.E. Ancestral state reconstruction analysis of hymenopteran sex determination mechanisms. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 22, p. 1762-1769. 2009.2009.

- AUGUSTO, S.C.; GARÓFALO, C.A. Nesting biology and social structure of *Euglossa* (*Euglossa*) *townsendi* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossini), **Insectes Sociaux**, v. 51, p. 400-409. 2004.
- AUGUSTO, S.C.; GARÓFALO, C.A. Nidificação de *Euglossa* (*Euglossa*) *melanotricha* Moure (Hymenoptera: Apidae) no solo do cerrado. **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 153-156. 2007.
- AUGUSTO, S.C.; GARÓFALO, C.A. Bionomics and sociological aspects of *Euglossa fimbriata* (Apidae, Euglossini). **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 525-538. 2009.
- AUGUSTO, S.C., GARÓFALO, C.A. Task allocation and interactions among females in *Euglossa carolina* nests (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). **Apidologie**, p. 1-12. 2010.
- BANDELT, H.-J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 37-48. 1999.
- BARRACLOUGH T.G.; NEE, S. Phylogenetics and speciation. **TRENDS in Ecology & Evolution** 16: 391-399. 2001.
- BEMBÉ, B. **Revision der *Euglossa cordata*-gruppe und untersuchungen zur funktionsmorphologie und faunistik der Euglossini (Hymenoptera, Apidae)**. Ph.D Thesis. LMU München: Faculty of Biology, Munique. 2004.
- BEUKEBOOM, L.W.; KAMPING, A.; VAN DE ZANDE L. Sex determination in the haplodiploid wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Chalcidoidea): A critical consideration of models and evidence. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 18, p. 371-378. 2007a.
- BEUKEBOOM, L.W.; KAMPING, A.; LOUTER, M.; PIJNACKER, L.P.; KATJU, V.; FERREE, P.M.; WERREN J.H. Haploid females in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*, **Science**, v. 315, p. 206. 2007b.
- BEYE, M.; HASSELMANN, M.; FONDRK, M.K.; PAGE JR., R.E.; OMHOLT, S.W. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. **Cell**, v. 114, p. 419-429. 2003.
- BOORE, J.L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 1767-1780. 1999.
- BORRELL, B.J. Long tongues and loose niches: evolution of euglossine bees and their nectar flowers. **Biotropica**, v. 37, p. 664-669. 2005.
- BRITO, R.M.; ARIAS, M.C. Mitochondrial DNA characterisation of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by PCR + RFLP and sequencing. **Apidologie**, v. 36, p. 431-437. 2005.
- CAMERON, S.A. Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 90, p. 8687-8691. 1993.

CAMERON, S.A. Phylogeny and biology of Neotropical Orchid bees (Euglossini). **Annual Review of Entomology**, v. 49, p. 377-404. 2004.

CAMERON, S.A., MARDULYN, P. Multiple molecular data sets suggest independent origins of highly eusocial behavior in bees (Hymenoptera: Apinae). **Systematic Biology**, v. 50, p. 194–214. 2001.

CAMERON, S.; RAMÍREZ, S. Nest architecture and nesting ecology of the orchid bee *Eulaema meriana* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 74, p. 142-165. 2001.

CAMERON, S.A.; WILLIAMS, P.H. Phylogeny of bumble bees in the New World subgenus *Fervidobombus* (Hymenoptera: Apidae): congruence of molecular and morphological data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 28, p. 552-563. 2003.

CARDINAL, S.; DANFORTH, B. N. The antiquity and evolutionary history of social behavior in bees. **PlosOne**, v. 6 (6), e21086, p. 1-9. 2011.

CERÂNTOLA, N.C.M.; OI, C.A.; CERVINI M.; DEL LAMA, M.A. Genetic differentiation of urban populations of *Euglossa cordata* from the state of São Paulo, Brazil, **Apidologie**, v. 42, p. 214-222. 2011.

CHA, S.Y.; YOON, H.J.; LEE, E.M.; YOON, M.H.; HWANG, J.S.; JIN, B.R.; HAN, Y.S.; KIM, I. The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the bumblebee, *Bombus ignites* (Hymenoptera: Apidae), **Gene**, v.392, p.206-220. 2007.

COCKEREL, T.D.A. Some Euglossine bees. **Canadian Entomologist**, v.49, p.144-146. 1917.

COCOM PECH, M.E.; MAY-ITZÁ, W.J.; MEDINA MEDINA, L.A.; QUEZADA-EUÁN, J.J.G. Sociality in *Euglossa (Euglossa) viridissima* Friese (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). **Insectes Socias**, v. 55, p. 428-433. 2008.

COOK, J.M. Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence, **Heredity**, v. 71, p. 421-435. 1993.

COOK, J.M.; CROZIER R.H. Sex determination and population biology of the Hymenoptera. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 10, p. 281-286. 1995.

COSTA, M.A.; DEL LAMA, M.A.; MELO, G.A.R.; SHEPPARD, W.S. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. **Apidologie**, v. 34, p. 73-84. 2003.

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

COWAN, D.P.; STAHLHUT, J.K. Functionally reproductive diploid and haploid males in an inbreeding hymenopteran with complementary sex determination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 101, p. 10374-10379. 2004.

- CRUZ-LANDIM, C. Haplo-diploidia em Hymenoptera. **Brazilian Journal of Genetics**, v. VII, p. 433-449, 1984.
- DALLA TORRE, K.W.; FRIESE, H. Die hermaphroditen und gynandromorphen Hymenopteren. **Berichte des Naturwissenschaftlich-Medizinischen Vereins in Innsbruck**, v. 24, p. 1-96. 1899.
- DANFORTH, B.N. Phylogeny of the bee genus *Lasioglossum* (Hymenoptera: Halictidae) based on mitochondrial COI sequence data. **Systematic Entomology**, v. 24, p. 377-393. 1998.
- DANFORTH, B.N.; SAUQUET, H.; PACKER, L. Phylogeny of the bee genus *Halictus* (Hymenoptera: Halictidae) based on parsimony and likelihood analyses of nuclear EF-1 α sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.13, p.605-618. 1999.
- DANFORTH, B.N.; CONWAY, L.; SHUQING, J. Phylogeny of eusocial *Lasioglossum* reveals multiple losses of eusociality within a primitively eusocial clade of bees (Hymenoptera: Halictidae). **Systematic Biology**, v. 52, p. 23-36. 2003.
- DASILVA, M.B.; PINTO-DA-ROCHA, R. História Biogeográfica da Mata Atlântica: Opiliões (Arachnida) como Modelo para sua Inferência. In: CARVALHO, C.J.B.; ALMEIDA, E.A.B. (Eds.). **Biogeografia da América do Sul Padrões & Processos**. p.221-238, 2011. São Paulo.
- DASILVA, J.M.C.; SOUZA, M.C.; CASTTELLETI, C.H.M. Areas of endemism for passerine birds in the Atlantic forest, South America. **Global Ecology Biogeography**. v.13, p.85-92. 2004.
- DI MUCCIO, T.; MARINUCCI, M.; FRUSTERI, L.; MAROLI, M.; PESSON, B.; GRAMICCIA, M. Phylogenetic analysis of *Phlebotomus* species belonging to the subgenus *Larrousius* (Diptera, Psychodidae) by ITS2 rDNA sequences. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 387–393. 2000.
- DICK, C.W.; ROUBIK, D.W.; GRUBER, K.F.; BERMINGHAM, E. Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 3775-3785. 2004.
- DOBATA, S.; SHIMOJI, H.; OHNISHI, H., HASEGAWA, E.; TSUJI K. Paternally inherited alleles in male body parts of an ant (*Diacamma* sp.) sex mosaic: implication for androgenetic male production in the Hymenoptera. **Insectes Sociaux**, v. 59, p. 55-59. 2012.
- DODSON, C.H.; DRESSLER, R.L.; HILLS, H.G.; ADAMS, R.M.; WILLIAMS, N.H. Biologically active compounds in orchid fragrances. **Science**, v. 164, p. 1243-1249. 1969.
- DRESSLER, R.L. Pollination by euglossine bees. **Evolution**, v. 22, p. 202-210. 1968.
- DRESSLER, R.L. An infrageneric classification of *Euglossa*, with notes on some features of special taxonomic importance (Hymenoptera: Apidae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 26, p. 187-198. 1978.

- DRESSLER, R.L. Biology of orchid bees (Euglossini). **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 13, p. 373-394. 1982a.
- DRESSLER, R.L. New species of *Euglossa* II. (Hymenoptera: Apidae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 30, p. 121-129. 1982b.
- DRESSLER, R.L. New species of *Euglossa*. III. The *bursigera* species group (Hymenoptera: Apidae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 30, p. 131-140. 1982c.
- DRESSLER, R.L. New species of *Euglossa*. IV. The *cordata* and *purpurea* species groups (Hymenoptera: Apidae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 30, p. 141-150. 1982d.
- DRUMMOND, A.J.; RAMBAUT, A. BEAST: bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolution Biology**, v. 7, p. 214. 2007
- ELTZ, T.; WHITTEN, W.M.; ROUBIK, D.W.; LINSÉNMAIR, K.E. Fragrance collection, storage, and accumulation by individual male orchid bees. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, p. 157-176. 1999.
- ELTZ, T.; ROUBIK, D.W.; LUNAU, K. Experience-dependent choices ensure species-specific fragrance accumulation in male orchid bees. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 59, p. 149-156. 2005.
- ELTZ, T.; ZIMMERMANN, Y.; HAFTMANN, J.; TWELE, R.; FRANCKE, W.; QUEZADA-EUAN, J.J.G.; LUNAU, K. Enfleurage, lipid recycling and the origin of perfume collection in orchid bees. **Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences**, v. 274, p. 2843-2848. 2007.
- ENGEL, M.S. A lateral gynandromorph in the bee genus *Thyreus* and the sting mechanism in the Melectini (Hymenoptera: Apidae). **American Museum Novitates**, v. 3553, p. 1-11. 2007.
- FARIA JR., L.R.R.; MELO, G.A.R. Species of *Euglossa* (*Glossura*) in the Brazilian Atlantic forest, with taxonomic notes on *Euglossa stellfeldi* Moure (Hymenoptera, Apidae, Euglossina). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 51, p. 275-284. 2007.
- FARIA, L. R. R.; MELO, G.A.R. A new species of *Eufriesea* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossina) from northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 55, p. 35-39. 2011.
- FARIA, L.R.R.; MELO, G.A.R. Species of *Euglossa* of the *analis* group in the Atlantic forest (Hymenoptera, Apidae). **Zoologia**. v.29, p.349-374. 2012.
- FLOYD, R.M.; WILSON, J.J.; HEBERT, P.D.N. DNA barcodes and insect biodiversity. In: FOOTIT, R.G.; ADLER, PETER H (eds.), **Insect Biodiversity: Science and Society**, pp. 417-432. UK: Wiley-Blackwell. 2009.
- FRANCISCO, F. O.; SILVESTRE, D.; ARIAS, M.C. Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction maps. **Apidologie**, v. 32, p. 323-332. 2001.

FRANKHAM, F.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 262p.

FRÉZAL, L.; LEBLOIS, R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, p. 727-736. 2008.

GARÓFALO, C.A. Social structure of *Euglossa cordata* nests (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Entomologia Generalis**, v. 11, p. 77-83. 1985.

GONZÁLEZ, V.H. A gynandromorph of *Megachile (Austromegachile) montezuma* Cresson (Hymenoptera: Apoidea, Megachilidae). **Entomotropica**, v.19, p. 155-156. 2004.

GIANGARELLI, D.C.; SOFIA, S.H. First record of a gynandromorph orchid bee, *Euglossa iopoecila* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, p. 229-232. 2011.

GORDH, G.; HEADRICK, D. **A Dictionary of Entomology**. Wallingford: CABI Publishing, 2001. 1032p.

GONZÁLEZ, V.H. A gynandromorph of *Megachile (Austromegachile) montezuma* Cresson (Hymenoptera: Apoidea, Megachilidae). **Entomotropica** 19, 155-156. 2004.

GRIMALDI D.; ENGEL M.S. **Evolution of the insects**. New York. Cambridge University Press. 2005.

HACKETT, B.J.; GIMNIG, J.; GUELBEOGO, W.; COSTANTINI, C.; KOEKEMOER, L.L.; COETZEE, M.; COLLINS, F.H.; BESANSKY, N.J. Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. **Insect Molecular Biology**, v.9, p.369-374. 2000.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98. 1999.

HASSELMMAN, M.; GEMPEL, T.; SCHIØTT, M.; NUNES-SILVA, C.G.; OTTE, M.; BEYE, M. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. **Nature**, v. 454, p. -523. 2008.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Society of London B, Biological Science**, v. 270, p. 313-321. 2003.

HEBERT, P.D.N.; PENTON, E.H.; BURNS, J.M.; JANZEN, D.H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 101, p. 14812-14817. 2004.

HEIMPEL, G.E.; DE BOER, J.G. Sex determination in the Hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 209-230. 2008.

HINES, H.M.; HUNT, J.H.; O'CONNOR, T.K.; GILLESPIES, J.J.; CAMERON, S.A. Multigene phylogeny reveals eusociality evolved twice in vespid wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 104, p. 3295–3299. 2007.

Hinojosa-Díaz I.A. 2010. Comparative genital morphology, phylogeny, and classification of the orchid bee genus *Euglossa* Latreille (Hymenoptera: Apidae), with Distributional modeling of adventive Euglossines. PhD Dissertation. University of Kansas, Lawrence Kansas 209 pp.

HINOJOSA-DÍAZ, I.A.; ENGEL, M.S. *Euglossa williamsi*, a new species of orchid bee from the Amazon Basin of Ecuador and Peru, with notes on its taxonomic association and biogeography (Hymenoptera, Apidae). **ZooKeys**, v. 159, p. 49–63. 2011.

HINOJOSA-DÍAZ, I.A.; GONZALEZ, V.H.; AYALA, R.; MÉRIDA, J.; SAGOT, P.; ENGEL, M.S. New orchid and leaf-cutter bee gynandromorphs, with an updated review (Hymenoptera, Apoidea). **Zoosystematics and Evolution**, v. 88, p. 205-214. 2012.

JANZEN D.H. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. **Science**, v. 171, p. 203-205. 1971.

KEKECOGLU, M.; BOUGA, M.; SOYSAL, M.I.; HARIZANIS, P. Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee populations from Turkey using PCR-RFLP's analysis of two mtDNA segments. **Bulgarian Journal of Agriculture Science**, v.15, p. 589-597 2009.

KIMSEY, L.S. Systematics of bees of the genus *Eufriesea*. **University of California Publications in Entomology**, v. 95, p. 1–125. 1982.

KIMSEY, L.S. Generic relationships within the Euglossini (Hymenoptera: Apidae). **Systematic Entomology**, v. 12, p. 63-72. 1987.

KUHLMANN, M.; ELSE, G.R.; DAWSON, A.; QUICKE, D.L.J. Molecular, biogeographical and phenological evidence for the existence of three western European sibling species in the *Colletes succinctus* group (Hymenoptera: Apidae). **Organisms, Diversity and Evolution**, v. 7, p. 155-165. 2007.

LI, Y.; ZHOU, X.; FENG, G.; HU, H.; NIU, L.; HEBERT, P.D.N.; HUANG, D. COI and ITS2 sequences delimit species, reveal cryptic taxa and host specificity of fig-associated *Sycophila* (Hymenoptera, Eurytomidae). **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 31-40. 2010.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-2. 2009.

LÓPEZ-URIBE, M.M.; DEL LAMA, M.A. Molecular identification of species of the genus *Euglossa* Latreille (Hymenoptera: Apidae, Euglossini), **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 712-720. 2007.

LUCIA, M.; ABRAHAMOVICH, A.H.; ALVAREZ, L.J. A Gynandromorph of *Xylocopa nigrocincta* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 155-157. 2009.

- MICHEL-SALZAT, A.; CAMERON, S.A.; OLIVEIRA, M.L. Phylogeny of the orchid bees (Hymenoptera: Apinae: Euglossina): DNA and morphology yield equivalent patterns. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 32, p. 309-323. 2004.
- MICHENER, C.D. **The Social Behavior of Bees: A Comparative Study**. Cambridge, Massachusetts: Belknap Press of Harvard University Press. 1974. 404p.
- MICHENER, C.D. **The Bees of the World**. Baltimore, Maryland. John Hopkins University Press. 2007.
- MICHEZ, D.; RASMONT, P.; TERZO, M.; VEREECKEN, N.J. A synthesis of gynandromorphy among wild bees (Hymenoptera: Apoidea), with an annotated description of several new cases. **Annales de la Société Entomologique de France**, v.45, p. 365-375. 2009.
- MINCKLEY, R.L.; REYES, S.G. Capture of the orchid bee, *Eulaema polychrome* (Friese) (Apidae: Euglossini) in Arizona, with notes on northern distributions of other Mesoamerican bees. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 69, p. 102–104. 1996.
- MORGAN, T.H. An alternative interpretation of the origin of gynandromorphous insects, **Science**, v. 21, p. 632-634. 1905.
- MOURE, J.S. Descrição de algumas espécies de Euglossinae (Hym., Apoidea). **Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica**, v. 5 p. 373-394. 1967
- MOURE J.S. *Glossuropoda*, novo subgênero de *Euglossa*, e duas espécies novas da Amazônia, do mesmo subgênero (Apidae-Hymenoptera). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 84: 387-389. 1989.
- MOURE, J.S.; MELO, G.A.R.; FARIA JR, L.R.R. Euglossini Latreille, 1802. In: MOURE, J.S.; URBAN, D.; MELO, G.A.R. (Orgs). **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region - online version**. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. 2012.
- NARITA, S.; PEREIRA, R.A.S.; KJELLBERG, F.; KAGEYAMA, D. Gynandromorphs and intersexes: potential to understand the mechanism of sex determination in arthropods. **Terrestrial Arthropod Reviews**, v. 3, p. 63-96. 2010.
- NEGRI, I.; PELLECCIA, M. Sex steroids in insects and the role of the endosymbiont *Wolbachia*: A new perspective, In: DUBEY, R.H. (ed.), **Sex Hormones**. Rijeka: InTech, pp.353-374. 2012.
- NEMÉSIO, A. Three new species of *Euglossa* Latreille (Hymenoptera: Apidae) from Brazil. **Zootaxa**, v. 1547, p. 21–31. 2007.
- NEMÉSIO, A. Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of the Brazilian Atlantic Forest. **Zootaxa**, v. 2041, p. 1-242. 2009.
- NEMÉSIO A. 2011. *Euglossa bembei* sp. n. (Hymenoptera: Apidae): a new orchid bee from the Brazilian Atlantic Forest belonging to the *Euglossa cybelia* Moure, 1968 species group. **Zootaxa** 3006: 43-49.

- NEMÉSIO, A.; SANTOS JR, J.E.; SANTOS, F.R. *Eufriesea zhangii* sp. n. (Hymenoptera: Apidae: Euglossina), a new orchid bee from Brazil revealed by molecular and morphological characters. **Zootaxa**, v. 3609, p. 562-582. 2013.
- OLIVEIRA, M. L. Três novas espécies de abelhas da Amazônia pertencentes ao gênero *Eulaema* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Acta Amazônica**, v. 36, p. 121-128. 2006.
- OLIVEIRA-FILHO, A.T., RATTER, J.A. A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. **Edinburgh Journal of Botany**. v.52, p.141-194. 1995.
- OLIVEIRA-FILHO, A.T., RATTER, J.A. Padrões florísticos das matas ciliares da região dos cerrados e a evolução das paisagens do Brasil Central durante o Quaternário tardio. In: RODRIGUES, R.R., LEITÃO FILHO, H.F. (Org.). **Matas Ciliares: Bases multidisciplinares para estudo, conservação e restauração**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 73-89. 2000.
- OSPINA-TORRES, R. Revisión de la morfología genital masculina de *Eulaema* (Hymenoptera: Apidae). **Revista de Biología Tropical**, v. 46, p. 749-762. 1998
- OTERO, J.T.; ULLOA-CHACON, P.; SILVERSTONE-SOPKIN, P.; GIRAY, T. Group nesting and individual variation in behavior and physiology in the orchid bee *Euglossa nigropilosa* Moure (Hymenoptera, Apidae). **Insectes Sociaux**, v. 55, p. 320-328. 2008.
- PAMILO, P.; NEI, M. Relationships between Gene trees and Species trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.5, p.568-583.
- PATTABHIRAMAIAH, M.; BRUECKNER, D.; WITZEL, K.P.; JUNIER, P.; REDDY, M.S. Prevalence of *Wolbachia* in the european honeybee, *Apis mellifera carnica*. **World Applied Sciences Journal**, v. 15, p. 1503-1506. 2011.
- PAXTON, R.J.; ZOBEL, M.U.; STEINER, J.; ZILLIKENS, A. Microsatellite loci for *Euglossa annectans* (Hymenoptera, Apidae) and their variability in other orchid bee. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 1221-1223. 2009.
- PEMBERTON, R.W.; WHEELER, G.S. Orchid bees don't need orchids mutualists—evidence from the naturalization of an orchid bee in Florida. **Ecology**, v. 87, p. 1995-2001. 2006.
- PRAZ, C.J.; MÜLLER, A.; DANFORTH, B.N.; GRISWOLD, T.L.; WIDMER, A.; DORN, S. Phylogeny and biogeography of bees of the tribe Osmiini (Hymenoptera: Megachilidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p. 185-197. 2008.
- RABELING, C.; KRONAUER, D.J.C. Thelytokous parthenogenesis in eusocial Hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 273-292. 2013.
- RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J. Tracer v1.4, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. 2007.
- RAMÍREZ, S. *Euglossa samperi* n. sp., a new species of orchid bee from the Ecuadorian Andes (Hymenoptera: Apidae). **Zootaxa**, v. 1272, p. 61-68. 2006.

- RAMÍREZ, S.; DRESSLER, R.L.; OSPINA, M. Abejas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) de la región neotropical: Listado de especies con nota sobre su biología. **Biota Colombiana**, v. 3, p. 7-118. 2002.
- RAMÍREZ, S.R.; ROUBIK, D.W.; SKOV, C.; PIERCE, N.E. Phylogeny, diversification patterns and historical biogeography of euglossine orchid bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of the Linnean Society**, v. 100, p. 552-572. 2010.
- RASMUSSEN, C.; CAMERON, S.A. A molecular phylogeny of the Old World stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the non-monophyly of the large genus *Trigona*. **Systematic Entomology**, v. 32, p. 26-39. 2007.
- RASMUSSEN, C.; CAMERON, S.A. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 99, p. 206–232. 2010.
- RASMUSSEN, C.; SKOV, C. Description of a new species of *Euglossa* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) with notes on comparative biology. **Zootaxa**, v. 1210, p. 53–67. 2006.
- REBÊLO J.M.M. **História natural das euglossíneas – as abelhas das orquídeas**, São Luís: Lithograf, 2001. 152p.
- REHAN, S.M.; SHEFFIELD, C.S. Morphological and molecular delineation of a new species in the *Ceratina dupla* species-group (Hymenoptera: Apidae: Xylocopinae) of eastern North America. **Zootaxa**, v. 2873, p. 35–50. 2011.
- ROCHA-FILHO, L.C.; KRUG, C.; SILVA, C.I.; GARÓFALO, C.A. Floral resources used by Euglossini bees (Hymenoptera: Apidae) in coastal ecosystems of the Atlantic Forest. **Psyche**, 2012, doi:10.1155/2012/934951.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574. 2003.
- ROSENBERG N.A.; NORDBORG M. Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. **Nature Reviews Genetics**, v.3, p. 380-390. 2002.
- ROUBIK, D.W. Sibling Species of *Glossura* and *Glossuropoda* in the Amazon Region (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 77, p. 235–253. 2004.
- ROUBIK, D.W., HANSON, P.H. **Abejas de Orquídeas de la América Tropical. Biología y Guía de Campo (Orchid Bees of Tropical America). Biology and Field Guide**. Heredia, Costa Rica. INBio Press. 2004. 370p.
- ROTHENBUHLER, W.C.; GOWEN, J.W.; PARK, O.W. Androgenesis with zygogenesis in gynandromorphic honeybees (*Apis mellifera* L.), **Science**, v. 115, p. 637-638. 1952.
- SAMPSON, B.J.; KIRKER, G.T.; WERLE, C.T. Morphology, courtship and mating of a mixed bilateral gynander of *Osmia ribifloris biedermannii* Michener (Hymenoptera: Megachilidae). **Journal of Kansas Entomological Society**, v. 83, p. 347-351. 2010.

- SÁNCHEZ, L. Sex-determining mechanisms in insects. **International Journal of Developmental Biology**, v. 52, p. 837-856. 2008.
- SCUDDER, G.G.E. The importance of insects. In: FOOTIT, R.G.; ADLER, PETER H (eds.), **Insect Biodiversity: Science and Society**, pp. 7-32. UK: Wiley-Blackwell. 2009.
- SCHNEIDER, H. **Métodos de Análise Filogenética: Um Guia Prático**. 2ª ed. Ribeirão Preto: Holos Editora. 2007.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234. 2000.
- SHEFFIELD, C.R.; HEBERT, P.D.N.; KEVAN, P.G.; PACKER, L. DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 196-207. 2009.
- SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.; ALMEIDA, E.A.B. **Abelhas brasileiras – sistemática e identificação**. MMA e Fundação Araucária, Belo Horizonte. 2012.
- SILVEIRA, M.S.; PEIXOTO, M.H.P.; MARTINS, C.F.; ZANELLA, F.C.V. Gynandromorphy in *Eulaema atleticana* Nemésio (Apidae, Euglossini). **EntomoBrasilis**, v. 5, p. 238-241. 2012.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**. v.87, p.651-701. 1994.
- SKOV, C.; WILEY, J. Establishment of the Neotropical orchid bee *Euglossa viridissima* (Hymenoptera: Apidae) in Florida. **Florida Entomologist**, v. 88, p. 225–227. 2005.
- SOFIA, S.H.; SUZUKI, K.M. Comunidades de machos de abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em fragmentos florestais no Sul do Brasil. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 693-702. 2004.
- SOFIA, S.H., SANTOS, A.M., SILVA, C.R.M. Euglossine bees (Hymenoptera, Apidae) in a remnant of Atlantic Forest in Paraná State, Brazil. **Iheringia**.94: 217-222. 2004.
- SOUZY, S.L.; GIRAY, T.; ROUBIK, D.W. Solitary and group nesting in the orchid bee *Euglossa hyacinthina* (Hymenoptera, Apidae). **Insectes Sociaux**, v. 50, p. 248–255. 2003.
- SOUZA, R.O.; CERVINI, M.; DEL LAMA, M.A.; PAXTON, R.J. Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera, Apidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 1352-1356. 2007.
- SOUZA, R.O.; DEL LAMA, M.A.; CERVINI, M.; MORTARI, N.; ELTZ, T.; ZIMMERMANN, Y.; BACH, C.; BROSI, B.J.; SUNI, S.; QUEZADA-EUÁN, J.J.G.; PAXTON, R.J. Conservation genetics of neotropical pollinators revisited: microsatellite analysis suggests that diploid males are rare in orchid bees, **Evolution**, v. 64, p. 3318-3326. 2010.

- SUZUKI, K.M.; ARIAS, M.C.; GIANGARELLI, D.C.; FREIRIA, G.A.; SOFIA, S.H. Mitochondrial DNA diversity of orchid bee *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera, Apidae) populations assessed by PCR-RFLP. **Biochemical Genetics**, v. 48, p. 326-341. 2010
- TAKAHASHI, N.C.; PERUQUETTI, R.C.; DEL LAMA, M.A.; CAMPOS, L.A.O. A reanalysis of diploid male frequencies in euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). **Evolution** v. 55, p. 1897–1899. 2001.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**. 2011.
- TULGETSKE, G.M.; STOUTHAMER, R. Characterization of intersex production in *Trichogramma kaykai* infected with parthenogenesis-inducing *Wolbachia*, **Naturwissenschaften**, v. 99, p. 143-152. 2012.
- UNRUH, T. R.; MESSING, R.H. Intraspecific biodiversity in Hymenoptera: implications for conservation and biological control. In: LASALLE, J. and GAULD, I.D. eds., **Hymenoptera and Biodiversity**, CAB International, Wallingford, UK. 1993.
- URBAN, D.; MOURE, J. S. Um caso de anomalia em *Eulaema mimitica* Moure (Hymenoptera, Apidae, Euglossinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.46, p. 229-230. 2002.
- VAN WILGENBURG, E.; DRIESSEN, G.; BEUKEBOOM, L. Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an “unintelligent” design? **Frontiers in Zoology**, v. 3, p. 1–15. 2006.
- VIADANA, A.G., CAVALCANTI, A.P.B. A teoria dos refúgios florestais aplicada ao Estado de São Paulo. **The Royal Canadian Geographical Society**. v.61-80, 2007. Available at www.uvanet.br/rcgs.
- WAUGH, J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **BioEssays**, v. 29; p. 188–197. 2007.
- WCISLO, W.T.; GONZALEZ, V.H., ARNESON L. A review of deviant phenotypes in bees in relation to brood parasitism, and a gynandromorph of *Megalopta genalis* (Hymenoptera: Halictidae). **Journal of Natural History**, v. 38, p. 1443-1457. 2004.
- WHEELER, Q.D. In: FOOTITT, R.G.; ADLER, P.H.; PETER H (eds.). **Insect Biodiversity: Science and Society**. 2009.
- WHITFIELD, J.B.; CAMERON, S.A. Hierarchical analysis of variation in the mitochondrial 16S rRNA gene among Hymenoptera. **Molecular Biology and Evolution**, v.15, p.1728-1743. 1998.
- WILGENBURG E.; DRIESSEN, G.; BEUKEBOOM, L.W. Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an "unintelligent" design? **Frontiers in Zoology**, v. 3, p. 1-15. 2006.

WHITING, P.W. Multiple alleles in complementary sex determination in *Habrobracon*. **Genetics**, v. 28, p. 365-382. 1943.

WILLIAMS, N.H.; DODSON, C.D. Selective attraction of male euglossine bees to orchid floral fragrances and its importance in long distance pollen flow. **Evolution**, v. 26, p. 84-95. 1972.

WOLSTENHOLME, D.R. Animal mitochondrial DNA: Structure and evolution. In: WOLSTENHOLME, D.R.; JEON, K.W. (eds.) **Mitochondrial Genomes**. Academic Press. 1992. p.173-214.

YOSHIZAWA, J.; MIMORI, K.; YAMAUCHI, K.; TSUCHIDA, K. Sex mosaics in a male dimorphic ant *Cardiocondyla kagutsuchi*. **Naturwissenschaften**, v. 96, p. 49-55. 2009.

XIA, X. 2000. Data analysis in molecular biology and evolution. Kluwer Academic Publishers. Boston/Dordrecht/London.

ZAYED, A. Bee genetics and conservation. **Apidologie**, v. 40, p. 237-262. 2009.

ZIMMERMANN, Y.; SCHORKOPF, D.L.P.; MORITZ, R.F.A.; PEMBERTON, R.W.; QUEZADA-EUAN, J.J.G.; ELTZ, T. Population genetic structure of orchid bees (Euglossini) in anthropogenically altered landscapes. **Conservation Genetics**, v. 12, p. 1183-1194.

ZUCCHI, R.; CAMARGO, J.M.F.; SAKAGAMI, S.F. Biological observations on a Neotropical bee, *Eulaema nigrita*, with a review on the biology of Euglossinae (Hymenoptera: Apoidea) - A comparative study. **Journal of Faculty Science Hokkaido University, Zoology**, v. 17, p. 271-380. 1969.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Teste de Máxima Verossimilhança para 24 diferentes modelos e de substituição nucleotídica em todas as posições dos códons, considerando sequências de cinco genes (COI *barcode*, COI, CytB, 16S, 28S) em 72 amostras (65 amostras de *E. iopoecila* e *E. roubiki* e sete amostras do grupo externo).

Model	#Param	BIC	AICc	lnL	Invariant	Gamma	R	Freq A	Freq T	Freq C	Freq G
GTR+G	228	49977	47598	-23571	n/a	0,49662	0,521	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
GTR+G+I	229	49989	47599	-23570	0,02849	0,52446	0,521	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
T92+G	222	50691	48374	-23965	n/a	0,49239	0,5258	0,3347	0,3347	0,1653	0,1653
T92+G+I	223	50704	48376	-23965	0,029122	0,52059	0,5258	0,3347	0,3347	0,1653	0,1653
TN93+G	225	50728	48379	-23964	n/a	0,49492	0,5255	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
TN93+G+I	226	50740	48381	-23964	0,028252	0,52244	0,5255	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
HKY+G	224	50741	48404	-23978	n/a	0,4943	0,5265	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
HKY+G+I	225	50754	48405	-23977	0,027768	0,52124	0,5265	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
GTR+I	228	51013	48634	-24089	0,417193	n/a	0,3965	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
JC+G	220	51553	49257	-24408	n/a	0,50498	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25
JC+G+I	221	51565	49258	-24408	0,029658	0,53478	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25
T92+I	222	51582	49265	-24410	0,415952	n/a	0,5092	0,3347	0,3347	0,1653	0,1653
K2+G	221	51586	49280	-24419	n/a	0,50462	0,5967	0,25	0,25	0,25	0,25
K2+G+I	222	51599	49281	-24419	0,029486	0,53422	0,5967	0,25	0,25	0,25	0,25
TN93+I	225	51619	49270	-24410	0,413785	n/a	0,5084	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
HKY+I	224	51634	49296	-24424	0,414718	n/a	0,5082	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
JC+I	220	52382	50086	-24823	0,418289	n/a	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25
K2+I	221	52412	50106	-24832	0,41833	n/a	0,5875	0,25	0,25	0,25	0,25
GTR	227	52532	50162	-24854	n/a	n/a	0,3939	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
T92	221	53113	50806	-25182	n/a	n/a	0,5052	0,3347	0,3347	0,1653	0,1653
TN93	224	53137	50799	-25175	n/a	n/a	0,5051	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
HKY	223	53151	50824	-25189	n/a	n/a	0,5053	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
JC	219	53895	51610	-25586	n/a	n/a	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25
K2	220	53926	51630	-25595	n/a	n/a	0,5875	0,25	0,25	0,25	0,25

CONTINUAÇÃO DO APÊNDICE A

Frequência de substituição de bases em todas as posições dos códons, considerando sequências de cinco genes (COI *barcode*, COI, CytB, 16S, 28S) em 72 amostras (65 amostras de *E. iopocila* e *E. roubiki* e sete amostras do grupo externo).

A=>T	A=>C	A=>G	T=>A	T=>C	T=>G	C=>A	C=>T	C=>G	G=>A	G=>T	G=>C
0,17	0,02	0,08	0,13	0,05	0,02	0,04	0,12	0,1	0,13	0,04	0,09
0,17	0,02	0,08	0,13	0,05	0,02	0,04	0,12	0,1	0,13	0,04	0,09
0,1	0,05	0,06	0,1	0,06	0,05	0,1	0,12	0,05	0,12	0,1	0,05
0,1	0,05	0,06	0,1	0,06	0,05	0,1	0,12	0,05	0,12	0,1	0,05
0,12	0,05	0,08	0,09	0,05	0,05	0,09	0,12	0,05	0,13	0,12	0,05
0,12	0,05	0,08	0,09	0,05	0,05	0,09	0,12	0,05	0,13	0,12	0,05
0,12	0,05	0,06	0,09	0,06	0,05	0,09	0,14	0,05	0,11	0,12	0,05
0,12	0,05	0,06	0,09	0,06	0,05	0,09	0,14	0,05	0,11	0,12	0,05
0,18	0,02	0,05	0,14	0,05	0,04	0,03	0,12	0,1	0,09	0,09	0,09
0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
0,11	0,05	0,06	0,11	0,06	0,05	0,11	0,12	0,05	0,12	0,11	0,05
0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08
0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08
0,12	0,05	0,07	0,09	0,05	0,05	0,09	0,12	0,05	0,12	0,12	0,05
0,12	0,05	0,06	0,09	0,06	0,05	0,09	0,14	0,05	0,11	0,12	0,05
0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08
0,18	0,02	0,05	0,14	0,05	0,04	0,04	0,12	0,09	0,09	0,08	0,09
0,11	0,05	0,06	0,11	0,06	0,05	0,11	0,12	0,05	0,12	0,11	0,05
0,12	0,05	0,07	0,09	0,05	0,05	0,09	0,12	0,05	0,12	0,12	0,05
0,12	0,05	0,06	0,09	0,06	0,05	0,09	0,14	0,05	0,11	0,12	0,05
0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08

APÊNDICE B

Teste de Máxima Verossimilhança em 24 diferentes modelos de substituição nucleotídica e frequência de substituição de bases em todas as posições dos códons, considerando sequências de quatro genes (COI *barcode*, COI, 16S, 28S) de 108 amostras de 28 espécies de *Euglossa* além de três amostras do grupo externo.

Model	#Param	BIC	AICc	lnL	Invariant	Gamma	R	Freq A	Freq T	Freq C	Freq G
GTR+G	228	49977	47598	-23571	n/a	0,49662	0,521	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
GTR+G+I	229	49989	47599	-23570	0,02849	0,52446	0,521	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
T92+G	222	50691	48374	-23965	n/a	0,49239	0,5258	0,3347	0,3347	0,1653	0,1653
T92+G+I	223	50704	48376	-23965	0,029122	0,52059	0,5258	0,3347	0,3347	0,1653	0,1653
TN93+G	225	50728	48379	-23964	n/a	0,49492	0,5255	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
TN93+G+I	226	50740	48381	-23964	0,028252	0,52244	0,5255	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
HKY+G	224	50741	48404	-23978	n/a	0,4943	0,5265	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
HKY+G+I	225	50754	48405	-23977	0,027768	0,52124	0,5265	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
GTR+I	228	51013	48634	-24089	0,417193	n/a	0,3965	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
JC+G	220	51553	49257	-24408	n/a	0,50498	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25
JC+G+I	221	51565	49258	-24408	0,029658	0,53478	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25
T92+I	222	51582	49265	-24410	0,415952	n/a	0,5092	0,3347	0,3347	0,1653	0,1653
K2+G	221	51586	49280	-24419	n/a	0,50462	0,5967	0,25	0,25	0,25	0,25
K2+G+I	222	51599	49281	-24419	0,029486	0,53422	0,5967	0,25	0,25	0,25	0,25
TN93+I	225	51619	49270	-24410	0,413785	n/a	0,5084	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
HKY+I	224	51634	49296	-24424	0,414718	n/a	0,5082	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
JC+I	220	52382	50086	-24823	0,418289	n/a	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25
K2+I	221	52412	50106	-24832	0,41833	n/a	0,5875	0,25	0,25	0,25	0,25
GTR	227	52532	50162	-24854	n/a	n/a	0,3939	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
T92	221	53113	50806	-25182	n/a	n/a	0,5052	0,3347	0,3347	0,1653	0,1653
TN93	224	53137	50799	-25175	n/a	n/a	0,5051	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
HKY	223	53151	50824	-25189	n/a	n/a	0,5053	0,2902	0,3793	0,1592	0,1713
JC	219	53895	51610	-25586	n/a	n/a	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25
K2	220	53926	51630	-25595	n/a	n/a	0,5875	0,25	0,25	0,25	0,25

CONTINUAÇÃO APÊNDICE B

Frequência de substituição de bases em todas as posições dos códons, considerando sequências de quatro genes (COI *barcode*, COI, 16S, 28S) em 108 amostras de 28 espécies de *Euglossa* além de três amostras do grupo externo.

A=>T	A=>C	A=>G	T=>A	T=>C	T=>G	C=>A	C=>T	C=>G	G=>A	G=>T	G=>C
0,17	0,02	0,08	0,13	0,05	0,02	0,04	0,12	0,1	0,13	0,04	0,09
0,17	0,02	0,08	0,13	0,05	0,02	0,04	0,12	0,1	0,13	0,04	0,09
0,1	0,05	0,06	0,1	0,06	0,05	0,1	0,12	0,05	0,12	0,1	0,05
0,1	0,05	0,06	0,1	0,06	0,05	0,1	0,12	0,05	0,12	0,1	0,05
0,12	0,05	0,08	0,09	0,05	0,05	0,09	0,12	0,05	0,13	0,12	0,05
0,12	0,05	0,08	0,09	0,05	0,05	0,09	0,12	0,05	0,13	0,12	0,05
0,12	0,05	0,06	0,09	0,06	0,05	0,09	0,14	0,05	0,11	0,12	0,05
0,12	0,05	0,06	0,09	0,06	0,05	0,09	0,14	0,05	0,11	0,12	0,05
0,18	0,02	0,05	0,14	0,05	0,04	0,03	0,12	0,1	0,09	0,09	0,09
0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
0,11	0,05	0,06	0,11	0,06	0,05	0,11	0,12	0,05	0,12	0,11	0,05
0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08
0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08
0,12	0,05	0,07	0,09	0,05	0,05	0,09	0,12	0,05	0,12	0,12	0,05
0,12	0,05	0,06	0,09	0,06	0,05	0,09	0,14	0,05	0,11	0,12	0,05
0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08
0,18	0,02	0,05	0,14	0,05	0,04	0,04	0,12	0,09	0,09	0,08	0,09
0,11	0,05	0,06	0,11	0,06	0,05	0,11	0,12	0,05	0,12	0,11	0,05
0,12	0,05	0,07	0,09	0,05	0,05	0,09	0,12	0,05	0,12	0,12	0,05
0,12	0,05	0,06	0,09	0,06	0,05	0,09	0,14	0,05	0,11	0,12	0,05
0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08