

Carolina Ferreira Cardoso

**A IMPORTÂNCIA DA DIAGONAL ÁRIDA (CAATINGA, CERRADO E CHACO)
NO ISOLAMENTO DE POPULAÇÕES DE ESPÉCIES DE EUGLOSSINA (INSECTA:
HYMENOPTERA: APIDAE) NOS DOMÍNIOS MORFOCLIMÁTICOS DA
AMAZÔNIA E DA MATA ATLÂNTICA – UM ESTUDO FILOGEOGRÁFICO**

Belo Horizonte

2013

Carolina Ferreira Cardoso

**A IMPORTÂNCIA DA DIAGONAL ÁRIDA (CAATINGA, CERRADO E CHACO)
NO ISOLAMENTO DE POPULAÇÕES DE ESPÉCIES DE EUGLOSSINA (INSECTA:
HYMENOPTERA: APIDAE) NOS DOMÍNIOS MORFOCLIMÁTICOS DA
AMAZÔNIA E DA MATA ATLÂNTICA – UM ESTUDO FILOGEOGRÁFICO**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ecologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Amaral da Silveira

Co-orientador: Prof. Dr. Fabrício Rodrigues dos Santos

Belo Horizonte

2013

“What makes things baffling is their degree of complexity, not their sheer size... a star is simpler than an insect.”

“O que torna as coisas desconcertantes é o seu grau de complexidade e não seu tamanho... uma estrela é mais simples do que um inseto.”

— *Martin Rees*

Exploring Our Universe and Others

Scientific American, 1999

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Fernando por me aceitar como aluna e pela orientação desde a minha iniciação científica! Ferdinando, obrigada pelas risadas, pelo rock progressivo, pelo companheirismo, por tantos ensinamentos sobre abelhas e pela sua amizade!

Muito obrigada aos meus pais, Vera e José Celso, por todo amor e carinho e por me incentivarem a estudar sempre! Pai, o seu interesse pelas plantas (em especial pelas orquídeas!) e pela vida me contagiaram desde que eu era “pequetita”! Agradeço imensamente aos meus sogros queridos, Lola e Fuad (*in memorium*), por todo carinho que sempre me deram! Vocês são muito especiais para mim! Obrigada também aos meus queridos irmãos Renata, Ricardo, Cristiane e Igor, aos meus cunhados e, especialmente, aos meus sobrinhos Cathatina, João Pedro, Clara, Bernardo, Ana, Livia e Tomás por todo carinho e incentivo!

Agradeço ao *Canadian Centre for DNA Barcoding* (Guelph, Canadá), especialmente à Dra. Julie K. Stahlhut, pelo sequenciamento de grande parte das amostras deste projeto.

Muito obrigada ao Prof. Laurence Packer (York University) e toda equipe do *Packer Lab*, em especial à Jennifer Albert que foi super prestativa e me ajudou muito durante o estágio sanduíche. Agradeço ainda aos Profs. Dr. Bridget Stutchbury, Dr. Joel Shore e Dr. Amro Zayed, da mesma universidade, por disponibilizar material e equipamentos de seus laboratórios durante o estágio sanduíche. Eu não poderia deixar de agradecer aos meus amigos Sheila Dumesh, Anne-Isabelle Gravel, Cory S. Sheffield, Sheila R. Colla, Alana Taylor, Hien T. Ngo, Scott MacIvor, Natalia Veiga, Nick de Silva pelo apoio e grande amizade durante os seis meses no Canadá!

Muito obrigada a minha amiga Carmenzita (Carmen Yurrita Obliols) pela confecção dos mapas apresentados nesta tese e pelo apoio e amizade durante o estágio no Canadá.

Agradeço ao Prof. Dr. André Nemésio (UFU) e aos curadores do *Royal Ontario Museum* (Toronto, Canadá) por forneceram valiosos espécimes da Mata Atlântica e da América Central, respectivamente. Sou muito grata ao Dr. Jerry Rozen e Dr. John Ascher do *American Museum of Natural History* de Nova Iorque pela receptividade e permissão de acesso à grandiosa e importantíssima coleção do AMNH e pelo fornecimento de amostras incluídas neste estudo. Agradeço também à amiga Margarita López-Uribe (Cornell University) por fornecer amostras para este estudo e por tantas dicas sobre PCRs, marcadores nucleares e análises feitas neste estudo. Muito obrigada à Rose (Roselaine M. C. Silveira) e ao Maverick (Roderic B. Martines) da Biobrasilis por várias amostras da Amazônia; ao Dr. David Roubik pelas amostras da Guiana Francesa; ao Prof. Dr. Gabriel Melo (UFPR) pelas amostras de *Euglossa bidentata* e pela re-identificação de espécimes do subgênero *Euglossa* da Mata Atlântica; à Dra. Márcia Maués e suas orientadas, Mariana Taniguchi e Talyanne Moura, da Embrapa Amazônia Oriental por amostras do Pará; à Michelle Guimarães (UFCE) pelas amostras de várias localidades do Ceará e ao José Eustáquio S. Junior pelas amostras de Rondônia.

Agradeço também ao pessoal da APA Rio Vermelho-Humboldt (CEPA Rudengas) e do CEPA Vila da Glória pelo apoio à nossa expedição de coleta em áreas de Mata Atlântica de Santa Catarina. Infelizmente, quase nenhuma Euglossina apareceu... Obrigada ao pessoal do PARNA Ubajara, principalmente a Sra. Nagila M. P. Gomes e o Sr. Francisco Humberto Bezerra, pelo apoio durante as coletas realizadas neste parque belíssimo situado nos Brejos de Altitude do Ceará.

Muito obrigado ao Prof. Fabrício R. Santos por permitir que eu fizesse o trabalho de bancada no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (UFMG),

sempre disposto a ajudar no que fosse preciso! Agradeço imensamente ao pessoal do LBEM, especialmente ao José Eustáquio Santos-Junior, à Bárbara R. N. Chaves, à Gisele P. M. Dantas, à Daniela Lacerda, ao Augusto, ao José, à Larissa e ao Anderson V. Chaves pelo apoio nos trabalhos de biologia molecular e análises de dados. Obrigada pela paciência, viu gente!

Obrigada a todo pessoal do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Abelhas pelo apoio e amizade durante todos estes anos! Valeu Vivi's, Alezita, Rudolf, Rafildo, Priti, Amandita, Philip's, Déborah, Igor, Paulita, Maverick, Rose, Rose (do Zé), Zé, Ana (que entrou agora e é um doce de pessoa!) e a todos os outros amigos que passaram por este laboratório e que deixam muita saudade!

Agradeço ao Prof. Dr. João Aguiar Nogueira Batista por permitir a utilização de equipamentos do Laboratório de Sistemática Vegetal (UFMG), onde fotografias dos géis de agarose puderam ser feitas.

Muito obrigada ao Prof. Dr. Adalberto José dos Santos do Laboratório de Aracnologia (UFMG) e ao Prof. Dr. Paulo Christiano de Anchieta Garcia do Laboratório de Herpetologia (UFMG) por permitir o uso de equipamentos, onde com a ajuda imprescindível da Priti (Priscila Guimarães Dias), pude tirar fotografias das abelhas apresentadas nesta tese. Obrigada ao Rudolf (Rodolfo Cesar C. Arantes) pela doação dos DVDs que foram utilizados para gravar os arquivos das fotos!

Deixo aqui registrado o meu agradecimento à Universidade Federal de Minas Gerais pela contribuição à minha formação acadêmica, em especial ao Prof. Rogério Parentoni, que me recebeu de forma tão acolhedora no ex-Laboratório de Ecologia e Comportamento de Insetos, onde tive a oportunidade de me iniciar no estudo dos insetos.

Muito obrigada aos Prof. Dr. Eduardo A. B. Almeida (USP/FFCLRP), Prof. Dr. Eduardo Leite Borba (UFABC) e Prof. Dr. Gustavo C. S. Kuhn (UFMG) pelas críticas e sugestões ao projeto desta tese.

Os professores Dr. Almir Pepato (UFMG) e Dr. Gabriel M. Yazbeck (UFSJ) deram valiosas contribuições para as análises moleculares deste projeto.

Obrigada ao Rafildo (Rafael Ferrari) pela checagem dos caracteres morfológicos dos espécimes após as análises moleculares.

Obrigada ao pessoal da FUNDEP, principalmente à Carina Souza, pelo apoio durante a vigência do projeto da FAPEMIG.

Deixo meus agradecimentos ao ICMBio-SISBIO pela licença de coleta e transporte concedida (Nº 26425-1 e 26425-2).

Agradeço imensamente à FAPEMIG (Projeto APQ 2006-10) e ao PRONEX História Natural (2009) pelo financiamento deste projeto. Agradeço ainda à FAPEMIG pela bolsa de doutorado e ao *Canadian Department of Foreign Affairs and International Trade (Emerging Leaders in the Americas Program)* pela bolsa sanduíche de seis meses durante o estágio na *York University* (Toronto, Canadá).

Meu querido Gabriel, obrigada por toda força e incentivo de sempre! O seu carinho e compreensão foram fundamentais em todas as etapas deste estudo! Sem isso, eu não teria forças para continuar a caminhada...

RESUMO

A subtribo Euglossina (Hymenoptera: Apidae), de ampla distribuição na região Neotropical, possui aproximadamente 220 espécies e é mais diversificada nos ecossistemas florestais. Este estudo avalia a estrutura filogeográfica de espécies/pares-de-espécies irmãs de abelhas Euglossina, que ocorrem tanto na Amazônia (AmF), quanto na Mata Atlântica (AtF). As relações históricas interespecíficas e interpopulacionais são avaliadas aqui por meio da utilização de parte do gene mitocondrial para a subunidade I da citocromo c oxidase (COI) como marcador molecular. É avaliada a hipótese de que a separação da AmF e AtF pela diagonal xérica constituída pela Caatinga, Cerrado e Chaco, entre estes domínios florestais tem atuado no isolamento das populações de espécies de Euglossina, produzindo um conjunto de pares de espécies crípticas. Machos de *Euglossa* (*Glossurella*) *crassipunctata* [n = 98; 579 pares de base (pb)] e de outros quatro pares de espécies com grandes afinidades são incluídos neste estudo: (i) *Euglossa* (*Euglossa*) *bidentata* (n = 10; AmF) e *E. (Euglossa) marianae* (n = 45; AtF; 532 pb); (ii) *Euglossa* (*Euglossa*) *mixta* (n = 34; AmF) e *E. (Euglossa) calycina* (n = 17; AtF; 533 pb); (iii) *Euglossa* (*Euglossa*) *iopyrrha* (n = 1; AmF) e *E. (Euglossa) botocuda* (n = 39; AtF; 503 pb); e (iv) *Eulaema* (*Eulaema*) *bombiformis* (n = 21; AmF e América Central) e *E. (Eulaema) niveofasciata* (n = 52; AtF; 558 pb). Através de inferência Bayesiana e redes de haplótipos é constatado que a diagonal árida da América do Sul tem atuado no isolamento das populações de *E. crassipunctata*, o que suporta a decisão recente de descrever as populações da AtF como *E. clausi*, e aquelas da AmF como *E. moratoi*, restringindo-se o nome *E. crassipunctata* apenas às populações da América Central. A sequência de eventos de vicariância aqui inferida para o par *E. calycina*/*E. mixta* é coincidente com aquela previamente obtida para grupos de espécies de *Geotrigona* e *Paratrigona*. Pela estimativa prévia da idade mínima de *E. mixta* (5 Ma), é possível que a diagonal árida (em uma de suas várias ocorrências, a partir do final do Mioceno) seja o fator causal da separação entre as populações AtF e AmF neste grupo. Para o grupo *crassipunctata*, verifica-se o inverso, em concordância com os eventos de vicariância entre grupos de espécies de *Partamona* e alguns de *Geotrigona*. A estimativa de idade mínima do grupo *crassipunctata* ($\approx 14,7$ Ma) sugere que a separação entre a América Central e AmF seja contemporânea à transgressão do mar Maracaibo (Mioceno médio) e que, a separação entre a AmF e a AtF possivelmente tenha ocorrido no Pleistoceno. A distinção entre as espécies *E. bombiformis* e *E. niveofasciata* não é suportada nos resultados aqui apresentados. No entanto, é preciso considerar que diferenças morfológicas, ainda que sutis, congruentes com a disjunção geográfica sugerem a existência de barreiras entre as populações. A baixa estruturação da filogenia do COI encontrada para o par *E. niveofasciata*/*E. bombiformis* pode indicar retenção de polimorfismo ancestral que, associada aos baixos valores de divergência interespecífica, suportam a hipótese de separação recente entre estas espécies, coincidente com a formação da diagonal árida da América do Sul no Pleistoceno. É possível que *E. niveofasciata* e *E. bombiformis* sejam entidades reais, não distinguíveis pelo COI, e a análise de outros genes, juntamente com caracteres morfológicos poderia auxiliar na elucidação deste problema. A maioria das decisões taxonômicas tomadas recentemente foi suportada pelos resultados das análises com o gene COI. Em alguns casos (*E. marianae*, *E. bidentata* e *E. mixta*), este gene sugere a existência de complexos de espécies ainda confundidas sob um mesmo nome. Os dados sugerem que o que é chamado de *E. mixta*, hoje, possa, na realidade ser um conjunto de espécies, com duas espécies novas a serem descritas, uma da Amazônia e outra da América Central. O nome *E. mixta* deve ser restrito a uma das populações da América Central. Um estudo cladístico de todo grupo *analisis* (todas as espécies do subgênero *Euglossa* citadas acima e outras seis não incluídas neste estudo) se faz necessário, assim como o uso de mais marcadores moleculares para que as relações dentro deste grupo possam ser esclarecidas. Ressalta-se a importância da população de *E. clausi* de Murici, AL, que pode ser considerada uma “Unidade Evolutiva Significativa”, isolada geograficamente das outras populações.

Palavras-chave: História evolutiva das abelhas; espécies crípticas; biogeografia; DNA mitocondrial; COI.

ABSTRACT

The subtribe Euglossina (Hymenoptera: Apidae: Apini), broadly distributed in the Neotropical region, is currently represented by approximately 220 species, being most diversified in rainforest ecosystems. This study evaluates the phylogeographic structure of species/sister-species-pairs of Euglossina, with occurrence both in Amazonic (AmF) and the Atlantic (AtF) rainforests. The interspecific and interpopulational historic relationships are evaluated here using as molecular marker part of the mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit I (COI). Here, the hypothesis is tested that the separation between the AmF and the AtF by the arid diagonal composed by the *Caatinga*, *Cerrado* and *Chaco* domains has acted in the isolation of Euglossina populations, producing cryptic-species pairs. Male specimens from *Euglossa* (*Glossurella*) *crassipunctata* [n = 98; 579 base pairs (bp)] and other four pairs of species with strong affinity are included in this study: (i) *Euglossa* (*Euglossa*) *bidentata* (n = 10; AmF) and *Euglossa* (*Euglossa*) *marianae* (n = 45; AtF; 532 bp); (ii) *Euglossa* (*Euglossa*) *mixta* (n = 34; AmF) and *Euglossa* (*Euglossa*) *calycina* (n = 17; AtF; 533 bp); (iii) *Euglossa* (*Euglossa*) *iopyrrha* (n = 1; AmF) and *Euglossa* (*Euglossa*) *botocuda* (n = 39; AtF; 503 bp); (iv) *Eulaema* (*Eulaema*) *bombiformis* (n = 21; AmF and Central America) and *Eulaema* (*Eulaema*) *niveofasciata* (n = 52; AtF; 558 pb). Bayesian inference and haplotype networks suggest that the South American arid diagonal has acted on the isolation of *E. crassipunctata*, supporting the recent recognition of AtF populations as *E. clausi*, those from the AmF as *E. moratoi*, restricting the name *E. crassipunctata* only to Central American populations. The sequence of vicariant events herein inferred for the *E. calycina*/*E. mixta* pair is coincident with that obtained for species groups of *Geotrigona* and *Paratrigona*. Based on the previous estimation of the minimum age of *E. mixta* (5 Ma), it is possible that the arid diagonal (in one of its occurrence since the end of Miocene) is the causal factor of the separation between the populations of AtF and AmF in this group. For the *crassipunctata* group, the contrary was observed, which agrees with reported vicariant events of species groups of *Partamona* and some of *Geotrigona*. Previous estimation of the minimum age of the *crassipunctata* group (\approx 14.7 Ma) suggests that the separation between Central America and AmF is contemporary with the transgression of the Maracaibo Sea (middle Miocene) and that the break between the AmF and AtF possibly occurred in the Pleistocene. The distinction between *E. bombiformis* and *E. niveofasciata* is not supported in the results herein presented. However, it should be considered that morphological differences, albeit subtle, congruent with the geographical disjunction suggest the existence of barriers between these populations. The weak structuring of COI phylogeny found for the *E. niveofasciata*/*E. bombiformis* pair may indicate persistence of ancestral polymorphism which, in association with low interspecific divergence values, support the hypothesis of recent split between these species lineages, coincident with the formation of the xeric diagonal of South America in the Pleistocene. It is possible that *E. niveofasciata* and *E. bombiformis* are real entities, not distinguishable by the COI, and the analysis of other genes, along with morphological characters might help to elucidate this problem. Most of the taxonomic decisions proposed recently have been supported by the results of the analysis with the COI gene. In some cases (*E. marianae*, *E. bidentata* and *E. mixta*), the gene suggests the existence of a species complexes, still assigned under the same name. Data suggest that what is now called *E. mixta* may actually be a set of species, with two new species yet to be described, one of the AmF and another of Central America. The name *E. mixta* should be restricted to one of the populations from Central America. A cladistic study of the *analis* group (all species from the subgenus *Euglossa* cited above and six more species not included in this study) is needed, as well as the use of additional molecular markers so that the relationships inside this group are resolved. The importance of the *E. clausi* population from Murici (in the state of Alagoas) should be emphasized. It is herein considered as an Evolutionarily Significant Unity, geographically isolated from the other populations.

Keywords: Evolutionary history of bees; cryptic species; biogeography; mitochondrial DNA; COI.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	20
2. Objetivos	32
2.1. Objetivos específicos	32
3. Material e Métodos.....	32
3.1. Amostras	32
3.1.1. Espécies estudadas	32
3.1.2. Origem das amostras	35
3.2. Extração, amplificação e sequenciamento do DNA	49
3.2.1. Marcadores moleculares.....	50
3.3. Análise de dados.....	55
3.3.1. Alinhamento	55
3.3.2. Seleção do modelo de evolução nucleotídica	56
3.3.3. Análises filogenéticas	56
3.3.4. Análises populacionais.....	57
4. Resultados	58
4.1. “ <i>Euglossa crassipunctata</i> ”.....	58
4.2. Grupo <i> analis</i>	71
4.2.1. Par <i>Euglossa bidentata</i> e <i>Euglossa marianae</i>	73
4.2.2. Par <i>Euglossa mixta</i> e <i>Euglossa calycina</i>	85
4.3. Par <i>Eulaema niveofasciata</i> e <i>Eulaema bombiformis</i>	96
5. Discussão	112
5.1. O papel da diagonal árida da América do Sul na diferenciação de populações/especiação de Euglossina dos domínios morfoclimáticos da Amazônia e da Mata Atlântica.....	112
5.2. O grau de diferenciação entre as espécies é compatível com as hipóteses correntes sobre o tempo de isolamento das Florestas Amazônica e Atlântica?.....	115
5.3. O gene COI dá suporte às decisões taxonômicas recentes em Euglossina baseadas em estudo de caracteres morfológicos?	118
5.4. Implicações para a conservação das espécies de Euglossina nos domínios florestais estudados.....	118
6. Conclusões.....	120
7. Referências bibliográficas	121
8. Apêndices.....	133

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Lista de espécies incluídas neste estudo, número total de machos, data de coleta dos espécimes, país e localidade de origem, amostras com DNA disponível e indisponível e instituição depositária dos espécimes..... 41
- Tabela 2.** Sequências dos iniciadores para a amplificação por PCR do gene COI..... 51
- Tabela 3.** Reagentes utilizados na PCR para amplificação do gene mitocondrial COI das amostras enviadas para o *Biodiversity Institute of Ontario* (Canadá) e aquelas amplificadas no LBEM/UFMG..... 52
- Tabela 4.** Lista de haplótipos do gene COI de “*Euglossa crassipunctata*” com os 38 sítios polimórficos. Os pontos (.) indicam igualdade com o haplótipo 1..... 60
- Tabela 5.** Número de machos (n) e haplótipos de “*Euglossa crassipunctata*” das 13 localidades amostradas. Haplótipos destacados em negrito são haplótipos de cópia única. Para cada localidade, Hd = diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica. (σ = desvio-padrão; n/a = não se aplica)..... 61
- Tabela 6.** Índices de diversidade para os grupos de “*Euglossa crassipunctata*”: n = número de indivíduos, H = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica, S = número de sítios polimórficos. (σ = desvio-padrão; G = grupo)..... 68
- Tabela 7.** Testes de neutralidade seletiva para os grupos de “*Euglossa crassipunctata*”: D , teste de Tajima e F_s , teste de Fu. s: número de transições; v: número de transversões; Subst.: número de substituições. 69
- Tabela 8.** AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (PA), G2 (BA, ES e MG), G3 (AL) e G4 (Costa Rica) definidos na simulação MENCFH/Geneland como grupos e as localidades de coleta como populações de “*Euglossa crassipunctata*”..... 70
- Tabela 9.** AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (PA), G2 (AL), G3 (norte ES e BA), G4 (Costa Rica) e G5 (MG e parte ES) definidos na simulação MECFH/Geneland como grupos e as localidades de coleta como populações de “*Euglossa crassipunctata*”..... 70
- Tabela 10.** AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (BA, ES, MG e AL), G2 (PA) e G3 (Costa Rica) definidos pelo NETWORK como grupos e as localidades de coleta como populações de “*Euglossa crassipunctata*”..... 70
- Tabela 11.** AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (Amazônia) e G2 (Mata Atlântica) como grupos e as localidades de coleta como populações de “*Euglossa crassipunctata*”..... 70
- Tabela 12.** Lista de haplótipos do gene COI de *Euglossa bidentata* (H1 a H8) e *Euglossa marianae* (H9 a H22) com 16 sítios polimórficos. Os outros 17 sítios que apresentam ambiguidade (indicada por “?”) são também apresentados. Os pontos (.) indicam igualdade com o haplótipo 1..... 74
- Tabela 13.** Número de machos (n) e haplótipos de *Euglossa marianae* e *Euglossa bidentata* das 11 localidades amostradas. Haplótipos destacados em negrito são haplótipos de cópia única. Para cada localidade, Hd = diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica. (σ = desvio-padrão; n/a = não se aplica)..... 75
- Tabela 14.** Índices de diversidade para os grupos do par de espécies *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae*: n = número de indivíduos, H = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica, S = número de sítios polimórficos. (σ = desvio-padrão; G = grupo)..... 82

- Tabela 15.** Testes de neutralidade seletiva para os grupos do par de espécies *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae*: D , teste de Tajima e F_s , teste de Fu. s : número de transições; v : número de transversões; Subst.: número de substituições. 83
- Tabela 16.** AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (BA + ES) G2 (Peru + AC + RO) e G3 (PA) definidos pelo Geneland (simulação MENCFFH) como grupos e as localidades de coleta como populações de *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae*. 84
- Tabela 17.** AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (Peru + AC), G2 (RO + parte PA + BA + ES) e G3 (parte PA) definidos pelo Geneland (simulação MECFFH) como grupos e as localidades de coleta como populações de *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae*. 84
- Tabela 18.** AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (Peru + AC + RO + parte PA + parte BA + parte ES), G2 (parte Canaã dos Carajás - PA) e G3 (parte BA + parte ES) definidos pelo NETWORK como grupos e as localidades de coleta como populações de *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae*. 84
- Tabela 19.** AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (Amazônia), G2 (Mata Atlântica) como grupos e as localidades de coleta como populações de *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae*. 84
- Tabela 20.** Lista de haplótipos do gene COI de *Euglossa mixta* (H1 a H8) e *Euglossa calycina* (H9 a H11) com os 33 sítios polimórficos. Os pontos (.) indicam igualdade com o haplótipo 1. A interrogação (?) indica dado faltante. 86
- Tabela 21.** Número de machos (n) e haplótipos de *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina* das 16 localidades amostradas. Haplótipos destacados em negrito são haplótipos de cópia única. Para cada localidade, Hd = diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica. (σ = desvio-padrão; n/a = não se aplica). 87
- Tabela 22.** Índices de diversidade para os grupos do par de espécies *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina*: n = número de indivíduos, H = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica, S = número de sítios polimórficos. (σ = desvio-padrão; G = grupo) 94
- Tabela 23.** Testes de neutralidade seletiva para os grupos do par de espécies *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina*: D , teste de Tajima e F_s , teste de Fu. s : número de transições; v : número de transversões; Subst.: número de substituições. 95
- Tabela 24.** AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (BA + ES), G2 (Belize + Honduras) e G3 (RO + PA) definidos pelo Geneland (simulação MENCFFH) como grupos e as localidades de coleta como populações de *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina*. O resultado da AMOVA é idêntico quando se considera os grupos definidos pelo Geneland com a simulação MECFFH: G1 (Belize + Honduras), G2 (RO + PA) e G3 (BA + ES). 96
- Tabela 25.** AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (Belize + Gracias a Dios-Honduras), G2 (Honduras, exceto Gracias a Dios), G3 (RO + PA) e G4 (BA + ES) definidos pelo NETWORK como grupos e as localidades de coleta como populações de *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina*. 96
- Tabela 26.** AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (Amazônia) e G2 (Mata Atlântica) como grupos e as localidades de coleta como populações de *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina*. 96
- Tabela 27.** Lista de haplótipos do gene COI de *Eulaema bombiformis* (H1 a H19) e *Eulaema niveofasciata* (H20 a H33) com os 38 sítios polimórficos. Os pontos (.) indicam igualdade com o haplótipo 1. 99
- Tabela 28.** Número de machos (n) e haplótipos de *Eulaema niveofasciata* e *Eulaema bombiformis* das 20 localidades amostradas. Haplótipos destacados em negrito são haplótipos de

cópia única. Para cada localidade, Hd = diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica. (σ = desvio-padrão; n/a = não se aplica) 101

Tabela 29. Índices de diversidade para os grupos do par de espécies *Eulaema niveofasciata* e *Eulaema bombiformis*: n = número de indivíduos, H = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica, S = número de sítios polimórficos. (σ = desvio-padrão; G = grupo) 106

Tabela 30. Testes de neutralidade seletiva para os grupos do par de espécies *Eulaema niveofasciata* e *Eulaema bombiformis*: D, teste de Tajima e F_s , teste de Fu. s: número de transições; v: número de transversões; Subst.: número de substituições. 107

Tabela 31. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1: Costa Rica + RO + PA (parte) + Ubajara, CE + AL; G2: BA + ES; G3: AM + Tomé-Açu, PA + MA e G4: Guaramiranga, CE definidos pelo *Geneland* (simulação MENCFFH) como grupos e as localidades de coleta como populações de *Eulaema niveofasciata* e *Eulaema bombiformis*. .. 108

Tabela 32. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (RO + parte AM + parte PA), G2 (parte PA + MA), G3 (CE + AL), G4 (BA + ES) e G5 (Costa Rica + parte AM) definidos pelo *Geneland* (simulação MECFFH) como grupos e as localidades de coleta como populações de *Eulaema niveofasciata* e *Eulaema bombiformis*. 108

Tabela 33. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (Costa Rica) e G2 (restante das amostras) definidos pelo *NETWORK* como grupos e as localidades de coleta como populações de *Eulaema niveofasciata* e *Eulaema bombiformis*. 108

Tabela 34. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (Mata Atlântica) e G2 (Amazônia) definidos como grupos e as localidades de coleta como populações de *Eulaema niveofasciata* e *Eulaema bombiformis*. 108

Tabela 35. Divergência genética média entre os grupos de Euglossina calculada pelo modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros (K2p). Os valores acima da diagonal são os erros padrões e abaixo, as distâncias. Os nomes dos táxons estão de acordo com os cladogramas inferidos através da análise bayesiana, com exceção do par *E. bombiformis/E. niveofasciata* e do grupo externo..... 109

Tabela 36. Divergência genética média entre os grupos de Euglossina calculada pelo método de distância *p-distance*. Os valores acima da diagonal são os erros padrões e abaixo, as distâncias. Os nomes dos táxons estão de acordo com os cladogramas inferidos através da análise bayesiana, com exceção do par *E. bombiformis/E. niveofasciata* e do grupo externo. 110

Tabela 37. Divergência genética média dentro dos grupos (d) de Euglossina calculada pelo modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros (K2p). Para os grupos que continham apenas um indivíduo, não foi possível calcular esta distância. Os nomes dos táxons estão de acordo com os cladogramas inferidos através da análise bayesiana, com exceção do par *E. bombiformis/E. niveofasciata* e do grupo externo. O cálculo através do método *p-distance* gerou resultados idênticos ao K2p..... 111

Apêndice T 1. Sequências dos iniciadores para a amplificação por PCR dos genes CAD e Wingless..... 135

Apêndice T 2. Reagentes utilizados na PCR para amplificação dos genes CAD e Wingless.. 136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de parte da América do Sul com os domínios morfoclimáticos da “diagonal de áreas áridas” (Caatinga, Cerrado e Chaco) separando os de florestas úmidas (Floresta Atlântica e Amazônia). As setas de sentido duplo representam os caminhos históricos hipotéticos que conectavam a floresta atlântica e a bacia amazônica para as aves Subocines do Novo Mundo segundo Batalha-Filho *et al.*, 2012. A seta cinza escuro corresponde aos contatos antigos (Mioceno), enquanto as setas pretas indicam contatos mais recentes (Plio-Pleistoceno). A seta preta tracejada mostra um contato recente menos comumente observado e a seta preta contínua representa um caminho recente e comumente utilizado. As marcas presentes na caatinga são localidades em que se tem evidência da presença de mata de galeria durante o final do Pleistoceno (> 0,9 mya), com base na paleopalinologia e em espeleotemas (*triângulo* Oliveira *et al.*, 1999; *círculo* Auler e Smart, 2001 e Wang *et al.*, 2004). Adaptado de Batalha-Filho *et al.*, 2012..... 25

Figura 2. Representação da formação vegetacional da América do Sul durante (A) o Último Máximo Glacial (entre 25.000 e 13.000 anos atrás), com uma provável retração das florestas úmidas e expansão de um mosaico de florestas abertas e savanas; (B) o Ótimo Climático do Holoceno (entre 9.000 e 5.000 anos atrás) quando possivelmente houve a última junção das florestas Amazônica e Atlântica e (C) atualmente, com a “diagonal de áreas áridas” entre os domínios morfoclimáticos da Amazônia e Mata Atlântica. Modificado de Vivo e Carmignotto (2004). 26

Figura 3. (a) Principais componentes biogeográficos que integram a região Neotropical. Cladogramas de área de endemismo para os principais componentes: (b) conforme Amorim e Pires (*apud* Camargo e Pedro, 2003); (c) conforme Camargo (1996) e Camargo e Moure (1994, 1996) inferido a partir do cladograma biológico para as espécies de *Paratrígona* e *Geotrígona*; e (d) conforme Camargo e Pedro (2003) inferido a partir do cladograma biológico para as espécies de *Partamona*. Modificado de Camargo e Pedro (2003). 30

Figura 4. Sequência de eventos de separação e vicariância na região Neotropical proposto por Camargo (2006). A área cinza delimita a Amazônia, que sob a perspectiva da biogeografia de vicariância, não é uma unidade histórica. Modificado de Camargo e Vit, 2013. 31

Figura 5. Machos de *Euglossa bidentata* (Cruzeiro do Sul-AC, nº espécime: 36810) (a-f) e de *Euglossa marianae* (Igrapiúna-BA, nº espécime: 47365) (g-l): a, g = habitus, vista lateral; b, h = habitus, vista dorsal; c, i = cabeça, vista frontal; d, j = tíbia média, com destaque para os coxins anterior (seta branca) e posterior (seta amarela); e, k = tíbia posterior, vista lateral; f, l = T5-T7. Note que T5 em f é vermelho acobreado e em l é verde dourado, enquanto que T6-T7 em f são amarelo-avermelhados brilhantes e em l estes tergitos são verdes brilhantes. 37

Figura 6. Machos de *Euglossa mixta* (Oriximiná-PA, nº espécime: 34706) (a-f) e de *Euglossa calycina* (Conceição da Barra-ES, nº espécime: 50026) (g-l): a, g = habitus, vista lateral; b, h = habitus, vista dorsal; c, i = cabeça, vista frontal. Note que em c a cabeça é azul violeta e em i é azul; d, j = tíbia média, com destaque para o coxim anterior (seta branca). Em d a seta amarela indica um coxim posterior pequeno, enquanto que em j a seta amarela aponta para uma depressão em forma de cálice no local do coxim posterior vestigial; e, k = tíbia posterior, vista lateral; f, l = T5-T7. 38

Figura 7. Machos de “*Euglossa crassipunctata*” de Oriximiná-PA (nº espécime: 35948) (a-f) e de Sooretama-ES (nº espécime: 48784) (g-l): a, g = habitus, vista lateral; b, h = habitus, vista dorsal (em b, a seta branca indica o ângulo dorsolateral do pronoto agudo e projetado); c, i = cabeça, vista frontal. Note que em c a coloração azulada está restrita ao clípeo e à fronte superior, enquanto que em i a cabeça é toda azulada; d, j = tíbia média, com destaque para os coxins anterior (seta branca) e posterior (seta amarela); e, k = tíbia posterior, vista lateral; f, l = T5-T7. 39

Figura 8. Machos de *Eulaema bombiformis* (Oriximiná-PA, nº espécime: 36061) (a-f) e de *Eulaema niveofasciata* (Conceição da Barra-ES, nº espécime: 49684) (g-l): a, g = habitus, vista lateral (note que em a as faixas dos T1-3 são amarelo-pilosas e em g elas são branco-pilosas); b, h = habitus, vista dorsal (em h é possível notar que o integumento de T2-T3, indicado pela seta, apresenta brilho verde); c, i = cabeça, vista frontal; d, j = cabeça, vista lateral (seta indica a distância clípeo-orbital inferior que é cerca de metade da distância clípeo-orbital superior); e, k = tibia média com o coxim apontado pela seta branca; f, l = E-5 com cerdas curtas, com detalhe para as cerdas da margem distal ligeiramente maiores indicadas pela seta branca. 40

Figura 9. Mapa da América do Sul com destaque para os biomas brasileiros e os pontos de amostragem de *Euglossa marianae* e *Euglossa bidentata*. Os círculos e as cruces pretas referem-se aos pontos de amostragem cujas amostras não estão incluídas nas análises moleculares e os círculos e as cruces vermelhas referem-se às amostras incluídas nas análises moleculares. 45

Figura 10. Mapa da América do Sul com destaque para os biomas brasileiros e os pontos de amostragem de *Euglossa calycina* e *Euglossa mixta*. As cruces pretas referem-se aos pontos de amostragem cujas amostras não estão incluídas nas análises moleculares e os círculos e as cruces vermelhas referem-se às amostras incluídas nas análises moleculares. 46

Figura 11. Mapa da América do Sul com destaque para os biomas brasileiros e os pontos de amostragem de “*Euglossa crassipunctata*”. As cruces pretas referem-se aos pontos de amostragem cujas amostras não estão incluídas nas análises moleculares e as cruces vermelhas referem-se às amostras incluídas nas análises moleculares. 47

Figura 12. Mapa da América do Sul com destaque para os biomas brasileiros e os pontos de amostragem de *Eulaema niveofasciata* e *Eulaema bombiformis*. Os círculos e as cruces pretas referem-se aos pontos de amostragem cujas amostras não estão incluídas nas análises moleculares e os círculos e as cruces vermelhas referem-se às amostras incluídas nas análises moleculares. 48

Figura 13. Modelo estrutural bidimensional da cadeia polipeptídica da subunidade I da citocromo c oxidase (COI) de insetos. Há 25 regiões estruturais: 12 hélices intra-membrana (M1–M12); seis alças (*loops*) externas (E1–E6); cinco alças internas (I1–I5); extremidades carboxi (COOH) e amino (NH₂) terminais. Os resíduos de aminoácidos inscritos em quadrados tem significância funcional especial e os círculos escuros hachurados representam os resíduos variáveis entre espécies de insetos. Modificado de Lunt *et al.*, 1996. 53

Figura 14. Mapa do genoma mitocondrial circular de *Apis mellifera*. Os genes codificadores das subunidades I, II e III da citocromo c oxidase estão indicados por COI, COII e COIII, respectivamente. A direção da transcrição para cada região codificadora é indicada pelas setas. Adaptado de Crozier e Crozier (1993). 54

Figura 15. Filograma da árvore de consenso resultante da inferência Bayesiana para 579 pb do COI de “*Euglossa crassipunctata*” e duas espécies do grupo externo (*Euglossa marianae* e *Euglossa mixta*). Os valores de probabilidade posterior são apresentados nos nós da árvore. As cores destacam cada clado: *E. crassipunctata s. stricto* (América Central) em verde, *E. moratoi* (Amazônia) em amarelo e *E. clausi* (Mata Atlântica) em vermelho. O clado de Murici, AL, destaca-se como um subgrupo de *E. clausi* em roxo. 64

Figura 16. Rede de haplótipos *Median-Joining* do gene COI de “*Euglossa crassipunctata*” e seus principais agrupamentos. Cada círculo na rede de haplótipos corresponde a um haplótipo e o seu tamanho é proporcional à frequência do haplótipo. Cada traço na linha que conecta um haplótipo ao outro se refere a um passo mutacional. As cores representam as localidades das amostras e os códigos dos haplótipos estão de acordo com as Tabelas 4 e 5. O grupo destacado em vermelho (G1) é formado por haplótipos da Mata Atlântica, o destacado em amarelo (G2) possui haplótipos da Amazônia e, em verde (G3), os haplótipos da América Central. 65

Figura 17. Mapas de probabilidade posterior de designação de quatro diferentes populações [G1: PA; G2: BA + ES + MG; G3: AL; G4: Costa Rica] pelo modelo espacial não

correlacionado à frequência dos haplótipos implementado no Geneland para “*Euglossa crassipunctata*”. Nas quatro figuras inferiores os eixos horizontais e verticais representam as coordenadas longitudinais e latitudinais, respectivamente, e os pontos pretos representam as localidades amostradas, conforme apontado no mapa superior à esquerda. A cor branca indica maiores valores de probabilidade e, na medida em que a cor se aproxima do vermelho, a probabilidade decresce. O gráfico acima à direita representa o número mais provável de populações (K = 4) após a simulação MCMC. 66

Figura 18. Mapas de probabilidade posterior de designação de cinco diferentes populações [G1: PA; G2: AL; G3: ES (Conceição da Barra) + BA; G4: Costa Rica; G5: MG + ES (Linhares e Sooretama)] pelo modelo espacial correlacionado à frequência dos haplótipos implementado no Geneland para “*Euglossa crassipunctata*”. Nas três figuras superiores e nas duas à esquerda os eixos horizontais e verticais representam as coordenadas longitudinais e latitudinais, respectivamente, e os pontos pretos representam as localidades amostradas, conforme apontado no mapa inferior central. A cor branca indica maiores valores de probabilidade e, na medida em que a cor se aproxima do vermelho, a probabilidade decresce. O gráfico inferior à direita representa o número mais provável de populações (K = 5) após a simulação MCMC..... 67

Figura 19. Filograma da árvore de consenso resultante da inferência Bayesiana para 503 pb do COI do grupo *analís* e duas espécies do grupo externo, “*Euglossa crassipunctata*” e *Euglossa parvula*. Os valores de probabilidade posterior são apresentados nos nós da árvore. As cores destacam cada clado: *E. calycina* em laranja, *E. marianae* (parte 2) em rosa claro, *E. bidentata* (indivíduo Ebi17) em lilás, *E. botocuda* em vermelho claro, *E. iopyrrha* em vermelho escuro, *E. mixta* (Amazônia) em amarelo, *E. mixta* (Honduras) em verde claro, *E. mixta* (Honduras + Belize) em verde escuro, *E. marianae* (parte 1) em rosa escuro, *E. bidentata* (restante dos indivíduos) em roxo. 72

Figura 20. Filograma da árvore de consenso resultante da inferência Bayesiana para 532 pb do COI de *Euglossa* 78

Figura 21. Rede de haplótipos *Median-Joining* do gene COI de *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae* e seus principais agrupamentos. Cada círculo na rede de haplótipos corresponde a um haplótipo e o seu tamanho é proporcional à frequência do haplótipo. Cada traço na linha que conecta um haplótipo ao outro se refere a um passo mutacional. As cores representam as localidades das amostras e os códigos dos haplótipos estão de acordo com as Tabelas 12 e 13. O grupo destacado em laranja (G1) possui haplótipos da Amazônia e da Mata Atlântica, aquele destacado em amarelo (G2) contém um haplótipo da Amazônia e o vermelho (G3) possui haplótipos da Mata Atlântica..... 79

Figura 22. Mapas de probabilidade posterior de designação de três diferentes populações [G1: BA + ES; G2: Peru + AC + RO e G3: PA] pelo modelo espacial não correlacionado à frequência dos haplótipos implementado no Geneland para o par *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae*. Na coluna à esquerda os eixos horizontais e verticais representam as coordenadas longitudinais e latitudinais, respectivamente, e os pontos pretos representam as localidades amostradas, conforme apontado no mapa superior à direita. A cor branca indica maiores valores de probabilidade e, na medida em que a cor se aproxima do vermelho, a probabilidade decresce. O gráfico abaixo à direita representa o número mais provável de populações (K = 3) após a simulação MCMC. 80

Figura 23. Mapas de probabilidade posterior de designação de três diferentes populações [G1: Peru + AC; G2: RO + Oriximiná, PA + BA + ES e G3: PA (Canaã dos Carajás e Parauapebas)] pelo modelo espacial correlacionado à frequência dos haplótipos implementado no Geneland para o par *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae*. Na coluna à esquerda os eixos horizontais e verticais representam as coordenadas longitudinais e latitudinais, respectivamente, e os pontos pretos representam as localidades amostradas, conforme apontado no mapa superior à direita. A cor branca indica maiores valores de probabilidade e, na medida em que a cor se aproxima do vermelho, a probabilidade decresce. O gráfico abaixo à direita representa o número mais provável de populações (K = 3) após a simulação MCMC..... 81

Figura 24. Filograma da árvore de consenso resultante da inferência Bayesiana para 533 pb do COI de *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina* e duas espécies do grupo externo (“*Euglossa crassipunctata*” e *Euglossa parvula*). Os valores de probabilidade posterior são apresentados nos nós da árvore. As cores destacam cada clado: *E. calycina* (Mata Atlântica) em laranja, *E. “mixta 1”* (Amazônia) em amarelo e *E. mixta s. stricto* (América Central) em verde, que contém dois cladogramas—*E. “mixta 2”* [Belize + Honduras (Rio Plátano - Gracias a Dios)] em verde escuro e *E. “mixta 3”* (Honduras) em verde claro..... 90

Figura 25. Rede de haplótipos *Median-Joining* do gene COI de *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina* e seus principais agrupamentos. Cada círculo na rede de haplótipos corresponde a um haplótipo e o seu tamanho é proporcional à sua frequência. Cada traço na linha que conecta um haplótipo a outro se refere a um passo mutacional. As cores representam as localidades das amostras e os códigos dos haplótipos estão de acordo com as Tabelas 20 e 21. Os grupos destacados em verde (G1 e G2) apresentam haplótipos da América Central, aquele destacado em amarelo (G3) contém haplótipos da Amazônia e o vermelho (G4) da Mata Atlântica. 91

Figura 26. Mapas de probabilidade posterior de designação de três diferentes populações [G1: BA + ES; G2: Belize + Honduras e G3: RO + PA] pelo modelo espacial não correlacionado à frequência dos haplótipos implementado no *Geneland* para o par *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina*. Na coluna à esquerda os eixos horizontais e verticais representam as coordenadas longitudinais e latitudinais, respectivamente, e os pontos pretos representam as localidades amostradas, conforme apontado no mapa superior à direita. A cor branca indica maiores valores de probabilidade e, na medida em que a cor se aproxima do vermelho, a probabilidade decresce. O gráfico abaixo à direita representa o número mais provável de populações (K = 3) após a simulação MCMC. 92

Figura 27. Mapas de probabilidade posterior de designação de três diferentes populações [G1: Belize + Honduras; G2: RO + PA e G3: BA + ES] pelo modelo espacial correlacionado à frequência dos haplótipos implementado no *Geneland* para o par *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina*. Na coluna à esquerda os eixos horizontais e verticais representam as coordenadas longitudinais e latitudinais, respectivamente, e os pontos pretos representam as localidades amostradas, conforme apontado no mapa superior à direita. A cor branca indica maiores valores de probabilidade e, na medida em que a cor se aproxima do vermelho, a probabilidade decresce. O gráfico abaixo à direita representa o número mais provável de populações (K = 3) após a simulação MCMC. 93

Figura 28. Filograma da árvore de consenso resultante da inferência Bayesiana para 558 pb do COI de *Eulaema bombiformis* e *Eulaema niveofasciata* e duas espécies do grupo externo (*Eufriesea zhangi* e *Eulaema nigrita*). Os valores de probabilidade posterior são apresentados nos nós da árvore..... 102

Figura 29. Rede de haplótipos *Median-Joining* do gene COI de *Eulaema bombiformis* e *Eulaema niveofasciata* e seus principais agrupamentos. Cada círculo na rede de haplótipos corresponde a um haplótipo e o seu tamanho é proporcional à frequência do haplótipo. Cada traço na linha que conecta um haplótipo ao outro se refere a um passo mutacional. As cores representam as localidades das amostras e os códigos dos haplótipos estão de acordo com as Tabelas 27 e 28. O grupo destacado em verde (G1) é formado por um haplótipo da Costa Rica e aquele destacado em laranja (G2) possui haplótipos da Amazônia e da Mata Atlântica. 103

Figura 30. Mapas de probabilidade posterior de designação de quatro diferentes populações [G1: Costa Rica + RO + PA (parte) + Ubajara-CE + AL; G2: BA + ES; G3: AM + Tomé-Açu-PA + MA e G4: Guaramiranga-CE] pelo modelo espacial não correlacionado à frequência dos haplótipos implementado no *Geneland* para o par *Eulaema bombiformis* e *Eulaema niveofasciata*. Nas quatro figuras superiores os eixos horizontais e verticais representam as coordenadas longitudinais e latitudinais, respectivamente, e os pontos pretos representam as localidades amostradas, conforme apontado no mapa inferior à esquerda. A cor branca indica maiores valores de probabilidade e, na medida em que a cor se aproxima do vermelho, a

probabilidade decresce. O gráfico inferior à direita representa o número mais provável de populações (K = 4) após a simulação MCMC. 104

Figura 31. Mapas de probabilidade posterior de designação de cinco diferentes populações [**G1**: RO + Nhamundá-AM + Oriximiná-PA; **G2**: PA (Carajás e Tomé-Açu) + MA; **G3**: CE + AL; **G4**: BA + ES e **G5**: Costa Rica + Novo Aripuanã-AM.] pelo modelo espacial correlacionado à frequência dos haplótipos implementado no Geneland para o par *Eulaema bombiformis* e *Eulaema niveofasciata*. Nas três figuras superiores e nas duas à esquerda os eixos horizontais e verticais representam as coordenadas longitudinais e latitudinais, respectivamente, e os pontos pretos representam as localidades amostradas, conforme apontado no mapa inferior. A cor branca indica maiores valores de probabilidade e, na medida em que a cor se aproxima do vermelho, a probabilidade decresce. O gráfico inferior à direita representa o número mais provável de populações (K = 5) após a simulação MCMC..... 105

Apêndice F 1. Autorização para atividades com finalidade científica – IBAMA/ ICMBIO/ SISBIO (n°26425-1) obtida para este estudo. Somente a primeira página é apresentada..... 133

Apêndice F 2. Mapa do gene Wingless, com um intron (≈ 100 -1400 pb). A numeração é baseada na sequência codificadora de *Drosophila melanogaster* (GenBank Accession J03650). Fonte: Urvölglyi et al. (1988), modificado de Almeida e Danforth (2009) e neste estudo..... 134

Apêndice F 3. Mapa do gene CAD, com dois éxons (≈ 600 pb e ≈ 300 pb) e um intron (≈ 100 pb). A numeração é baseada na sequência do CAD de *Apis mellifera* do Projeto Genoma de Apis. Fonte: Danforth et al. (2006); Danforth Lab (2009); modificado neste estudo..... 134

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

ABI: *Applied Biosystems*

AMNH: *American Museum of Natural History*

AMOVA: *Analysis of molecular variance*

Amplicon: pedaço de DNA que é o produto da reação artificial de amplificação por PCR

apCADfor1: iniciador *Forward* do gene CAD

ap835rev1: iniciador *Reverse* do gene CAD

≈ : aproximadamente

A, T, C, G: nucleotídeos Adenina, Timina, Citosina e Guanina

Atl: área de endemismo do sudeste Atlântico, que corresponde à região das matas atlânticas, da Bahia até São Paulo, segundo Camargo (1996) e Amorim e Pires (1996).

B₁₀: Fator Bayesiano

Bee-wg-For2: iniciador *Forward* do gene *Wingless*

Bee-wg-Rev2: iniciador *Reverse* do gene *Wingless*

BIC: *Bayesian Information Criterion*

BOLD: *Barcode of life database*

BSA: *Bovine Serum Albumin*

°C: Graus Celsius

C1-N-2191: iniciador *Reverse* do gene COI

CAD: carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase e dihydroorotase

CECT-UFGM: Coleção Entomológica das Coleções Taxonômicas da UFGM

Chocó-CA: área de endemismo que corresponde ao noroeste dos Andes e Panamá, América Central e México, segundo Cracraft e Prum (1988).

CNC: *Canadian National Collection*

COI: subunidade I do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase

COII: subunidade II do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase

COIII: subunidade III do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase

CPATU: Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Oriental - Embrapa Amazônia Oriental.

CTAB: cetyl trimethylammonium bromide

CUIC: *Cornell University Insect Collection*

D: teste estatístico de neutralidade de Tajima (1989), usado para distinguir entre sequências de DNA que evoluem de forma neutra (aleatória) daquelas que evoluem sob influência de alguma força evolutiva.

ddH₂O: água bidestilada e autoclavada

σ: desvio-padrão

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTPs: Desoxirribonucleotídeo trifosfatado

DZUP-UFPR: Coleção Entomológica Padre Jesus Santiago Moure da Universidade Federal Paraná

Ebi: *Euglossa (Euglossa) bidentata* Dressler, 1982

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ESS: *Effective Sample Size*

ESUs: Evolutionary Significant Units (Unidades Evolutivas Significativas)

ET kit: kit de sequenciamento para o sequenciador *MegaBACE*

EUA: Estados Unidos da América

e.g.: do latim *exempli gratia*, que significa por exemplo

FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

F_s: teste estatístico de neutralidade de Fu (1997) usado para distinguir entre sequências de DNA que evoluem de forma neutra (aleatória) daquelas que evoluem sob influência de alguma força evolutiva.

F_{ST}: Índice de Fixação de Wright

Γ: distribuição gamma pela teoria de probabilidade e estatística

G1, G2, G3, G4 e G5: grupos 1, 2, 3, 4 e 5

GeneBank: banco de dados colaborativo de sequências de genes e proteínas

GTR: modelo de substituição nucleotídica *General Time Reversible*

H: número de haplótipos

H_d: diversidade haplotípica

H1, H2, H3, etc.: haplótipo 1, 2, 3, etc.

HKY: modelo de substituição nucleotídica de Hasegawa, Kishino e Yano

Km²: quilômetros quadrados

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICB: Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

K: número máximo de populações HWEL (*Hardy-Weinberg equilibrium with linkage equilibrium between loci*) estimado após a simulação MCMC no programa *Geneland*

K2p: modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros

LBEM: Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular

LepF1: iniciador *Forward* do gene COI

LepR1: iniciador *reverse* do gene COI

Ma: milhões de anos

MCMC: Cadeia de Markov Monte Carlo

MECFH: modelo espacial correlacionado à frequência dos haplótipos

MENCFH: modelo espacial não correlacionado à frequência dos haplótipos

μL: Microlitros

μM: Micromolar

mM: Milimolar

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MMA: Ministério do Meio Ambiente

mtDNA: DNA mitocondrial

NaCl: Cloreto de Sódio

NAm: área de endemismo do norte do Amazonas, que corresponde ao Cráton das Guianas-Brasil, segundo Camargo (1996) e Amorim e Pires (1996).

n: número de indivíduos

nDNA: DNA nuclear

N_{emit} : tamanho efetivo populacional do mtDNA

N_{enuc} : tamanho efetivo populacional do nDNA

ng: nanogramas

NUMT: *nuclear mitochondrial DNA* ou contaminante do DNA nuclear no DNA mitocondrial

pb: pares de bases nucleotídicas

PARNA Ubajara: Parque Nacional de Ubajara, Ceará

PCR: reação em cadeia da polimerase

***p-distance*:** algoritmo de distância nucleotídica

PEG: Polietileno Glicol

π : diversidade de nucleotídeos

PP: probabilidade posterior

PSFR: *Potential Scale Reduction Factor*

***P*:** Valores de significância

ROM: *Royal Ontario Museum*

S: número de sítios polimórficos

s: número de transições

SEAm: área de endemismo que corresponde ao sudeste da Amazônia, abrangendo toda área ao sul dos rios Madeira e Amazonas, segundo Camargo (1996) e Amorim e Pires (1996).

SWAm: área de endemismo que corresponde ao sudoeste da Amazônia, delimitado pelo alinhamento dos rios Uaupés/Negro ao norte, pelos rios Madeira/Mamoré ao sul e pelos Andes a oeste, segundo Amorim e Pires (1996).

T1-3: 1° ao 3° tergos do metassoma dos Hymenoptera

UFCE: Universidade Federal do Ceará

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFPR – DZUP: Coleção Entomológica Padre Jesus Santiago Moure do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná

UICN: União Internacional para a Conservação da Natureza

v: número de transversões

Wg: *wingless*

Siglas para os estados brasileiros: **AC:** Acre; **AL:** Alagoas; **AM:** Amazonas; **BA:** Bahia; **CE:** Ceará; **ES:** Espírito Santo; **MA:** Maranhão; **MG:** Minas Gerais; **MT:** Mato Grosso; **PA:** Pará; **PE:** Pernambuco; **RJ:** Rio de Janeiro; **RO:** Rondônia; **SP:** São Paulo.

1. Introdução

Informações geradas sobre relações filogenéticas com o uso de ferramentas da biologia molecular podem ser associadas ao conhecimento sobre a distribuição geográfica dos organismos. Isso possibilita a construção de hipóteses sobre biogeografia histórica, tornando possível a compreensão dos processos de diversificação (Patton *et al.*, 1994).

A filogeografia é uma área da biogeografia histórica que faz uso de marcadores moleculares, especialmente de DNA organelar, com o objetivo de compreender princípios e processos responsáveis pela distribuição geográfica das linhagens genealógicas que compõem as espécies ou de espécies proximamente aparentadas. Em estudos com animais, o DNA mitocondrial (*mtDNA*) possui características desejáveis para este tipo de pesquisa, particularmente uma taxa evolutiva mais alta que a de genes nucleares, grande variação intraespecífica, presença de várias cópias, além de possuir herança exclusivamente materna e não recombinante (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2000).

Estudos que utilizam a abordagem filogeográfica podem contribuir para os esforços de conservação da diversidade biológica por fornecerem evidências para o reconhecimento de espécies irmãs ou complexos de espécies a partir do que se considerava uma única espécie com distribuição ampla (Kambhampati *et al.*, 1996; Buhay e Crandall, 2005; Zayed, 2009 Frankham *et al.*, 2010). A falta de conhecimento sobre o *status* taxonômico da espécie alvo de um estudo pode, por exemplo, impedir a proteção de espécies ameaçadas de extinção ou promover o gasto de recursos e esforços na conservação de populações de espécies comuns (Frankham *et al.*, 2010). Estudos com o enfoque filogeográfico podem ainda fornecer subsídios para a proposição de áreas prioritárias para a conservação, ao apontar as unidades de conservação intraespecíficas (“filogrupos” intraespecíficos ou Unidades Evolutivas Significativas – *ESUs* da sigla inglesa) definidas por distribuição geográfica e padrões genéticos únicos (Moritz, 1994; Avise, 2000, 2004).

Os estudos com abordagem filogeográfica podem ser feitos em escala local/regional, caso o grupo de estudo possua uma capacidade dispersiva limitada, como por exemplo, peixes e golfinhos de água doce (Bermingham e Martin, 1998; Hollatz *et al.*, 2011) e salamandras (Garcia-Paris *et al.*, 2000) e, em escala continental, para aquelas espécies com maior capacidade dispersiva e de distribuição mais ampla (Ditchfield, 2000; Dick *et al.*, 2004; Pavan *et al.*, 2011). Na Região Neotropical, estudos

com espécies de ampla distribuição têm revelado, por exemplo, um grande fluxo gênico ao longo da bacia amazônica (Dick *et al.*, 2003) e a existência de pontos de contato no Panamá para populações derivadas da América Central e América do Sul (Perdices *et al.*, 2002; Dick *et al.*, 2003).

Os marcadores de *mtDNA*, especialmente a subunidade I do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase (COI), têm-se mostrado eficientes na investigação de padrões filogeográficos intraespecíficos (*e.g.* Dick *et al.*, 2004; Norgate *et al.*, 2009; Batalha-Filho *et al.*, 2010; Brito e Arias, 2010), na caracterização de limites entre espécies animais, especialmente quando os caracteres morfológicos são de difícil interpretação (*e.g.* Brunner *et al.*, 2002; Hebert *et al.*, 2003; Naeole e Haymer, 2003; Schama *et al.*, 2005; López-Urbe e Del Lama, 2007) e nos casos de detecção de espécies crípticas (*e.g.* Kambhampati *et al.*, 1996; Kuhlmann *et al.*, 2007; Gibbs, 2009).

Recentemente, os estudos filogeográficos têm utilizado também marcadores de DNA nuclear (*e.g.* Hare e Avise, 1998; Kawakita *et al.*, 2003; Harlin-Cognato *et al.*, 2007; Rosenblum *et al.*, 2007; Ingvarsson, 2008; Lee e Edwards, 2008; Peters *et al.*, 2008; Hurt *et al.*, 2009; Werneck *et al.*, 2012), visto que dados de múltiplos *loci* podem oferecer informações mais completas sobre a evolução das diversas linhagens e, com isso, as estimativas dos padrões filogeográficos do grupo de organismos estudado (Hare, 2001). A comparação de árvores de genes de grupos de ligação diferentes possibilita a detecção de separação incompleta de haplótipos ancestrais, que pode não ser percebida quando somente uma árvore de gene é analisada (Avise, 2004). Apesar disso, pelo fato do genoma mitocondrial ser haplóide e transmitido somente pelas fêmeas, estima-se que o tamanho efetivo populacional do *mtDNA* (N_{emit}) seja um quarto da dos genes nucleares (N_{enuc}) e isso os torna menos susceptíveis à separação incompleta de alelos ancestrais, e, portanto, à incongruência com a árvore de espécies (Moore, 1995).

Outro aspecto que favorece o uso de marcadores nucleares em estudos filogeográficos é a possibilidade de seleção indireta do *mtDNA* de artrópodes originária de um desequilíbrio de ligação devido à herança maternal de micro-organismos simbioses (*e.g.* *Wolbachia*), o que poderia confundir as interpretações da história genômica se tomadas somente a partir de dados de sequência de *mtDNA* (Hurst e Jiggins, 2005; Gerth *et al.*, 2011). No entanto, casos de amplificação inadvertida de sequência de bactéria com *primers* para COI de artrópodes são raras e quando ocorrem são de fácil detecção (Smith *et al.*, 2012; Stahlhut *et al.*, 2012).

Neste estudo, examina-se a filogeografia da subtribo de abelhas Euglossina (Insecta: Hymenoptera: Apidae) *sensu* Roig-Alsina e Michener (1993). As Euglossina são abelhas de tamanho médio (8,5 mm) a grande (29 mm), com a maioria apresentando um colorido metálico e a glossa muito longa, em comparação ao comprimento do corpo (Michener, 2007). Nesta subtribo são reconhecidos cinco gêneros monofiléticos bem delimitados (*Aglae*, *Eufriesea*, *Euglossa*, *Eulaema* e *Exaerete*) (Michel-Salzat *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2010), sendo dois deles (*Aglae* e *Exaerete*) exclusivamente parasitas de ninhos de *Eufriesea* e *Eulaema* (Silveira *et al.*, 2002; Michener, 2007). Euglossina é um grupo relativamente jovem. O fóssil mais antigo deste grupo (\approx 20-22 Ma) possui caracteres sinapomórficos que o colocam no gênero *Euglossa* atual (Poinar, 1998; Engel, 1999; Roubik e Hanson, 2004) e, pelas análises de datação molecular, Ramírez *et al.* (2010) estimam que todas as linhagens existentes de Euglossina compartilham um ancestral comum mais recente durante os períodos Mioceno-Eoceno (\approx 27-42 Ma). Há aproximadamente 220 espécies descritas (Nemésio, 2009), das quais a maioria é solitária, porém algumas espécies de *Euglossa* e, provavelmente, todas as espécies de *Eulaema* formam colônias parassociais com várias fêmeas (Zucchi *et al.*, 1969; Pereira-Martins e Kerr, 1991; Santos e Garófalo, 1994; Garófalo *et al.* 1998; Augusto e Garófalo, 2011). O conhecimento sobre nidificação e estrutura de ninhos é ainda relativamente escasso para o grupo (Dressler, 1982a).

As Euglossina visitam flores de pelo menos 23 famílias de plantas à procura de néctar, de pelo menos nove famílias em busca do pólen e de três famílias como fontes de resinas (Roubik, 1989). Uma característica notável dos machos de Euglossina é a coleta de substâncias aromáticas geralmente produzidas em flores de orquídeas (Orchidaceae) e de Araceae, Bignoniaceae, Euphorbiaceae, Gesneriaceae, Haemodoraceae (Roubik e Hanson, 2004) e Solanaceae (Michener, 2007). Os machos de Euglossina são os principais, e muitas vezes, os únicos polinizadores das plantas em que buscam tais fragrâncias (Dressler, 1982a; Roubik, 1989). Dentre as Orchidaceae, por exemplo, cerca de 650 espécies são sabidamente polinizadas por machos de Euglossina (Ackerman, 1983). Além disso, estas abelhas já foram vistas coletando essências de frutos, fungos, excremento de aves, madeira apodrecida e seiva elaborada de plantas (Roubik, 1989; Cameron, 2004; Michener, 2007).

Os machos de Euglossina, após coletarem essas fragrâncias, que podem ser monoterpenos (*e.g.* cineol) ou compostos aromáticos (*e.g.* eugenol) (Roubik, 1989), armazenam-nas em suas tíbias posteriores (Dressler, 1982a). Dodson *et al.* (1969)

isolaram aproximadamente 60 substâncias diferentes das essências florais coletadas pelos machos dessa subtribo, sendo que cada espécie possuía de três a dez compostos aromáticos e as misturas analisadas eram espécie-específicas. Entretanto, ainda é desconhecida a função biológica que essas substâncias desempenham na biologia dessas abelhas. Há especulações de que esses compostos sejam importantes na reprodução desse grupo (Kimsey, 1980; Williams e Whitten, 1983), participando, por exemplo, do processo de reconhecimento dos machos pelas fêmeas no ato do acasalamento (Eltz *et al.*, 1999; Eltz *et al.*, 2005b; Zimmermann *et al.*, 2006).

A partir da análise das diferentes substâncias coletadas pelos machos de *Euglossina* (Dodson *et al.*, 1969) foi possível sintetizar, em laboratório, diversos compostos aromáticos que possibilitaram a atração dessas abelhas e, conseqüentemente, a execução de estudos etológicos (*e.g.* Kimsey, 1980; Eltz *et al.*, 2005a), ecológicos (*e.g.* Janzen, 1981), de composição faunística e sazonalidade (*e.g.* Roubik e Ackerman, 1987; Rebêlo e Moure, 1995; Neves e Vianna, 1997, 1999; Nemésio e Faria Jr., 2004; Nemésio e Morato, 2006). Com isso, as descrições das espécies de *Euglossina* normalmente são baseadas em holótipos machos e as fêmeas são mais raras nas coleções entomológicas (Bonilla-Gómez e Nates-Parra, 1992). López-Uribe e Del Lama (2007) estimam que fêmeas de *Euglossa* sejam desconhecidas para cerca de 40% das espécies já descritas.

Euglossina são amplamente distribuídas na região Neotropical, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos (Minckley e Reyes, 1996; Pemberton e Wheeler, 2006) ao sul do Brasil (Wittmann *et al.*, 1988) e norte da Argentina (Roubik e Hanson 2004). Estima-se que esta tribo compreenda cerca de 25% da comunidade de abelhas em alguns ecossistemas (Roubik e Hanson, 2004), podendo ser encontradas em diferentes biomas (Silveira *et al.*, 2002), às vezes alcançando altitudes de até 2.700 m (Vergara e Pinto, *apud* Roubik, 1989), porém o grupo é mais diversificado nos ecossistemas florestais (Dressler, 1982a; Morato *et al.*, 1992; Cameron, 2004). Com isso, estudos sobre as mudanças históricas nos ecossistemas florestais desta região podem auxiliar na compreensão dos padrões de distribuição e diversificação dessas abelhas.

A América do Sul apresenta essencialmente quatro áreas de florestas úmidas—Amazônia, Mata Atlântica, Yungas andinas e Floresta Úmida Chilena (nesta última, as *Euglossina* não ocorrem) (Ojeda e Mares, 1989; Hueck, *apud* de Vivo e Carmignotto, 2004; Hueck e Seibert, *apud* de Vivo e Carmignotto, 2004; Rizinni, 1997; Eva *et al.*, 2002). Os domínios morfoclimáticos da Amazônia e da Mata Atlântica compreendem as

florestas tropicais mais diversificadas do mundo e entre estes dois domínios há uma faixa de vegetação mais aberta e seca (“diagonal de áreas áridas”), que inclui a Caatinga (nordeste do Brasil), o Cerrado (região central do Brasil) e o Chaco (partes dos territórios paraguaio, boliviano, argentino e brasileiro—ao sul do Pantanal) (Figura 1 e Figura 2C) (Ab’Saber, 1977). Esta faixa, conhecida por promover a “maior disjunção da América do Sul” (Brieger, *apud* Costa, 2003), tem sido apontada como uma barreira à dispersão de espécies entre estas duas regiões de florestas úmidas (*e.g.* Vanzolini, 1974; Moojen, *apud* Costa, 2003; Raven e Axelrod, 1974; Rizzini, *apud* Costa, 2003; Martini *et al.*, 2007; Batalha-Filho *et al.*, 2012). Contudo, esta “faixa xérica” pode não representar uma região segregante para alguns táxons e sim complementar às florestas úmidas da Amazônia e da Mata Atlântica, devido a matas de galerias e fragmentos de florestas decíduas e semi-decíduas que interconectam estes domínios florestais (Oliveira-Filho e Ratter, 1995; Silva, 1996; Silva e Bates, 2002; Costa, 2003). O estudo de Faria e Silveira (2011), no entanto, apresenta indícios de que as matas ciliares do Cerrado aparentemente não atuam como corredores méxicos para a colonização deste domínio morfoclimático pelas espécies de Euglossina dependentes de ambientes florestais.

As florestas Amazônica e Atlântica foram provavelmente contínuas no passado e, com o aumento da aridez no Terciário, houve a formação de uma faixa xeromórfica entre elas (Bigarella *et al.*, *apud* Costa, 2003). Há aproximadamente 30.000 anos, no Pleistoceno (entre 2.588.000–11.700 anos atrás), o clima se tornou mais quente e úmido (Ledru, 1993), com uma provável expansão das florestas úmidas. Ainda no Pleistoceno, entre 25.000 e 13.000 anos atrás, houve o Último Máximo Glacial, com retração das florestas úmidas e expansão de um mosaico de florestas abertas e savanas na América do Sul (Figura 2A). Em seguida, no Holoceno (desde 11.700 anos até o presente) houve um período mais quente e úmido (entre 9.000 e 5.000 anos atrás) conhecido como o Ótimo Climático do Holoceno quando possivelmente houve a última junção das florestas Amazônica e Atlântica (Figura 2B). Este período quente e úmido declinou gradualmente até aproximadamente 2.000 anos (de Vivo e Carmignotto, 2004).

Estudos botânicos realizados nos “Brejos de altitude”, que são encaves de florestas úmidas da Caatinga, e em florestas costeiras do nordeste brasileiro revelaram uma disjunção florística com a Amazônia ou com a Mata Atlântica (Rizzini, 1963; Coimbra-Filho e Câmara, 1996; Bigarella *et al.*, *apud* Costa, 2003; Wang *et al.*, 2004). Além disso, Vivo (*apud* Costa, 2003) sugeriu, com base em padrões de distribuição de

mamíferos, no registro fóssil e em fisiologia ecológica, que uma floresta úmida capaz de sustentar mamíferos arborícolas típicos de florestas úmidas existiu na área atualmente ocupada pela Caatinga, e que esta floresta conectava as florestas úmidas da Mata Atlântica com a porção leste da Amazônia. Coimbra-Filho e Câmara (1996) argumentam que, ainda no início do século XVI, havia uma continuidade das florestas na costa atlântica brasileira e que a disjunção vista hoje é resultante de um processo ininterrupto de degradação ambiental de origem antrópica.

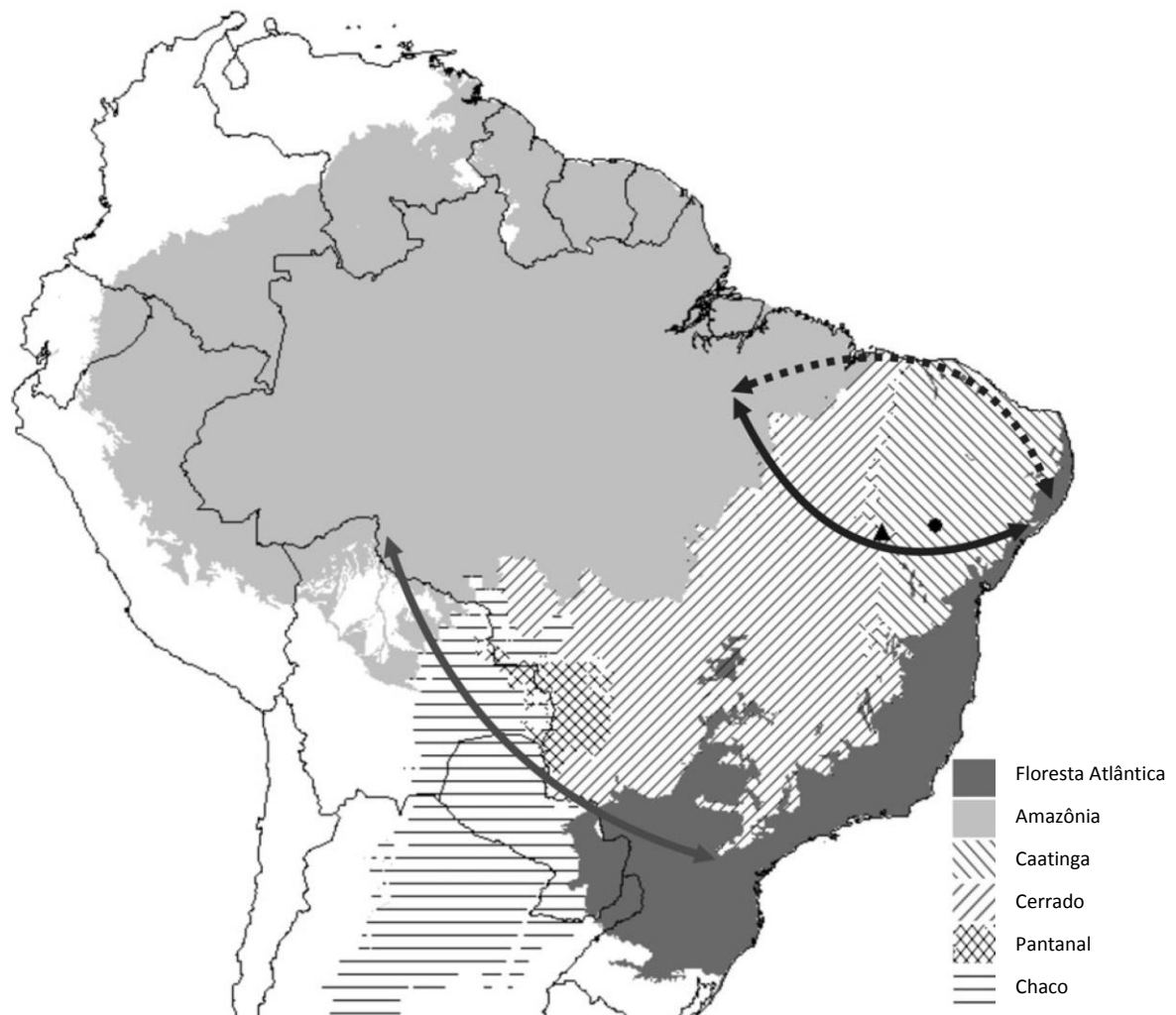


Figura 1. Mapa de parte da América do Sul com os domínios morfoclimáticos da “diagonal de áreas áridas” (Caatinga, Cerrado e Chaco) separando os de florestas úmidas (Floresta Atlântica e Amazônia). As setas de sentido duplo representam os caminhos históricos hipotéticos que conectavam a floresta atlântica e a bacia amazônica para as aves Subocines do Novo Mundo segundo Batalha-Filho *et al.*, 2012. A seta cinza escuro corresponde aos contatos antigos (Mioceno), enquanto as setas pretas indicam contatos mais recentes (Plio-Pleistoceno). A seta preta tracejada mostra um contato recente menos comumente observado e a seta preta contínua representa um caminho recente e comumente utilizado. As marcas presentes na caatinga são localidades em que se tem evidência da presença de mata de galeria durante o final do Pleistoceno (> 0,9 mya), com base na paleopalínologia e em espeleotemas (*triângulo Oliveira et al.*, 1999; *círculo Auler e Smart*, 2001 e *Wang et al.*, 2004). Adaptado de Batalha-Filho *et al.*, 2012.

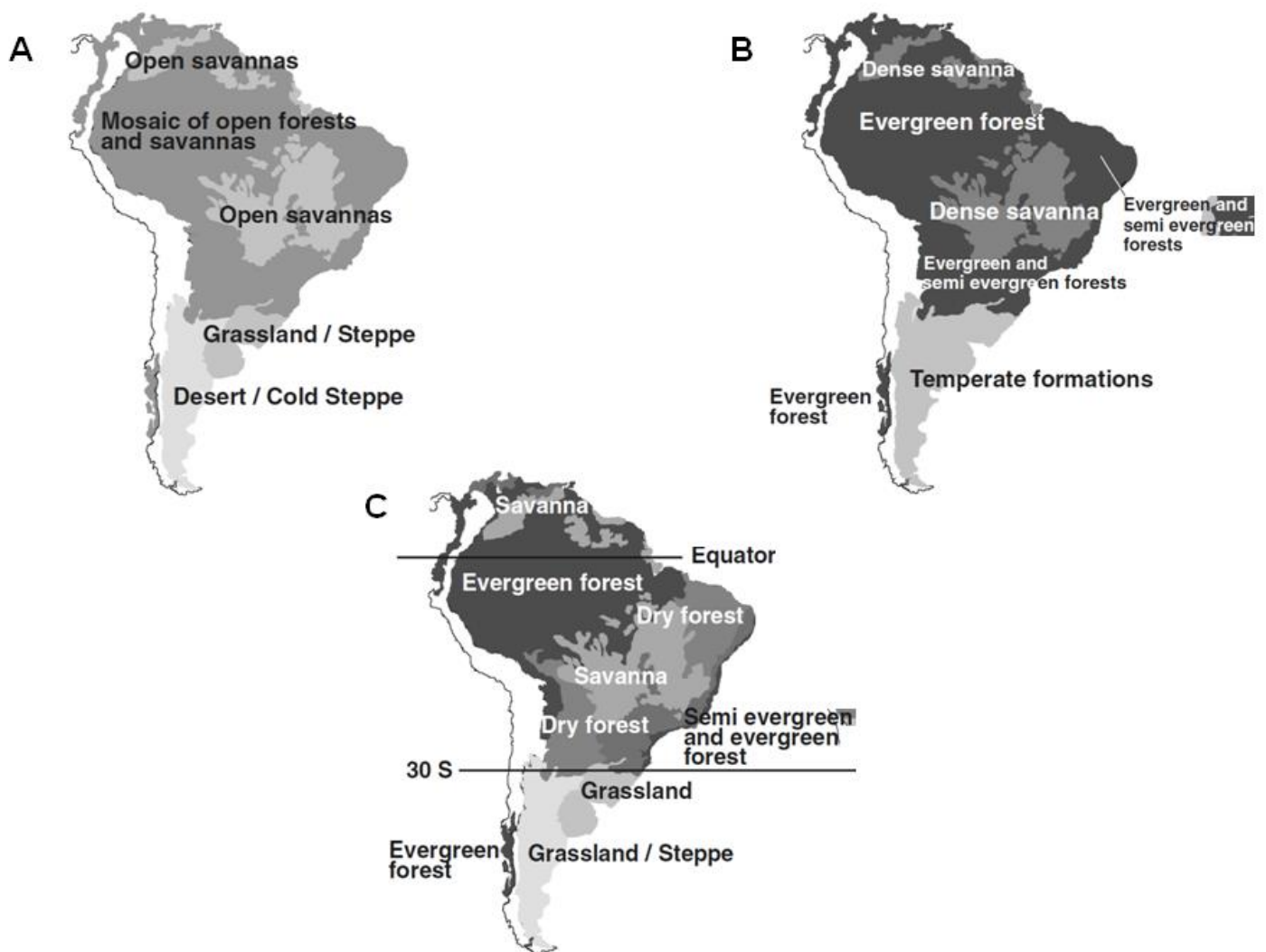


Figura 2. Representação da formação vegetacional da América do Sul durante (A) o Último Máximo Glacial (entre 25.000 e 13.000 anos atrás), com uma provável retração das florestas úmidas e expansão de um mosaico de florestas abertas e savanas; (B) o Ótimo Climático do Holoceno (entre 9.000 e 5.000 anos atrás) quando possivelmente houve a última junção das florestas Amazônica e Atlântica e (C) atualmente, com a “diagonal de áreas áridas” entre os domínios morfoclimáticos da Amazônia e Mata Atlântica. Modificado de Vivo e Carmignotto (2004).

No Brasil, a maior parte das espécies de Euglossina encontra-se nos domínios morfoclimáticos da Amazônia e da Mata Atlântica, sendo também estes os domínios mais bem amostrados no país (e.g. Morato *et al.*, 1992; Rebêlo e Garófalo, 1997; Rebêlo e Silva, 1999; Nemésio, 2003; Nemésio e Morato, 2004; Nemésio e Silveira, 2007a; Ramalho *et al.*, 2009), com relativamente poucos levantamentos realizados em matas ciliares dos domínios do Cerrado (Rebêlo e Silva, 1999; Nemésio e Faria Jr., 2004; Faria Jr., 2005; Alvarenga *et al.*, 2007; Anjos-Silva, 2008; Faria e Silveira, 2011) e da Caatinga (Neves e Viana, 1999; Neves e Viana, 2003; Rebêlo e Silva, 1999; Moura e Schlindwein, 2009). Os poucos dados disponíveis sugerem que a riqueza de Euglossina no Cerrado e na Caatinga é menor (Zanella, 2000; Alvarenga *et al.*, 2007; Faria e Silveira, 2011), com o predomínio de espécies normalmente associadas a ambientes abertos e com grande influência antrópica como, por exemplo, *Eulaema nigrita* Lepeletier, 1841 (Morato, 1998; Tonhasca *et al.*, 2002; Nemésio e Silveira, 2006), *Eulaema marcii* Nemésio, 2009 (Nemésio e Silveira, 2006) e *Euglossa carolina* Nemésio, 2009 (Nemésio e Silveira, 2007b).

Por outro lado, dentre as Euglossina registradas ao mesmo tempo nos domínios da Amazônia e da Mata Atlântica, algumas têm sido associadas aos fragmentos florestais maiores (> 10.000 ha, *sensu* Ribeiro *et al.*, 2009), com uma forte predileção pelos pontos mais internos de mata (Tonhasca Jr. *et al.*, 2002; Nemésio e Silveira, 2006; Nemésio, 2009). Nemésio (2009) lista algumas espécies com tais características (e.g. *Euglossa augaspis*, *Euglossa cognata*, *Euglossa crassipunctata*, *Euglossa ioprosopa*, *Euglossa liopoda*, *Euglossa viridis* e *Exaerete frontalis*). Dentre elas, destaca-se *Euglossa* (*Glossurella*) *crassipunctata* Moure (1968) que pertence ao grupo de espécies “*crassipunctata*”. Este grupo contém três espécies de grande semelhança morfológica: *E. crassipunctata*, *E. parvula* e *E. sapphirina*. A suspeita de que este grupo incluiria mais espécies levou a uma revisão taxonômica deste, recentemente publicada por Nemésio e Engel (2012). Estes autores utilizaram, principalmente, caracteres da genitália dos machos para o reconhecimento de três novas espécies por eles descritas no mesmo trabalho. Duas delas, *E. clausi* e *E. moratoi*, antes identificadas como *E. crassipunctata*, estão presentes na Mata Atlântica e Amazônia, respectivamente, e são tidas como muito próximas à *E. crassipunctata* e *E. sapphirina* da América Central. A terceira espécie, *E. pepeii*, aparentemente restrita ao sul da Bahia, apresentaria maior afinidade com a amazônica *E. parvula*. Segundo esses autores, ainda, *Euglossa crassipunctata* seria restrita à América Central. Apesar disto, no presente estudo, opta-

se por adotar, inicialmente, o nome *E. crassipunctata* para designar uma espécie com distribuição ampla, ocorrendo desde a América Central até a Mata Atlântica.

Nemésio (2009) e Faria e Melo (2012) apontam ainda alguns pares de espécies muito semelhantes, porém distinguíveis morfológicamente, com ocorrência nas florestas atlântica e amazônica (e.g. *Euglossa marianae* e *Eg. bidentata*; *Eg. botocuda* e *Eg. iopyrrha*; *Eg. calycina* e *E. mixta*; *Eg. roubiki* e *Eg. orellana*; *Eulaema athleticana* e *El. meriana*, *El. niveofasciata* e *El. bombiformis*; *Eufriesea atlantica* e *Ef. ornata* na Mata Atlântica e na Amazônia, respectivamente, para cada par), que apesar de serem tolerantes à borda de mata e estarem presentes também em fragmentos menores que 10.000 ha, ocorrem em fragmentos sempre associados a outros, grandes e mais bem preservados. Dentre estes pares, destacam-se aqueles pertencentes ao subgênero *Euglossa* do grupo “*analis*”: *E. calycina*/*E. mixta*, *E. botocuda*/*E. iopyrrha* e *E. marianae*/*E. bidentata*. Estas espécies são morfológicamente muito semelhantes e, embora sejam considerados pares potenciais de espécies irmãs (Faria e Melo, 2012), nenhuma análise filogenética para as espécies deste grupo foi feita até o momento.

Com base nisso, pode-se questionar se as populações de espécies de Euglossina (p. ex., *Euglossa crassipunctata*) realmente constituem espécies com distribuição disjunta ou conjuntos/complexos de espécies crípticas. Caso seja possível encontrar nas espécies não distinguíveis morfológicamente uma distinção molecular tão grande ou maior do que a encontrada nos pares de espécies com grandes afinidades, poder-se-ia inferir com maior segurança que aquelas são espécies crípticas. Por outro lado, há relatos de que as Euglossina, especialmente os machos, são capazes de voar grandes distâncias diariamente (Janzen, 1971; Kroodsmá, 1975; Dressler, 1982a; Wikelski *et al.*, 2010). Isso sugere que o fluxo de indivíduos entre fragmentos de florestas que interconectam estes domínios florestais seria possível (fluxo gênico por *stepping-stone* de Kimura e Weiss, 1964), e que estas populações indistinguíveis morfológicamente realmente constituiriam uma única espécie, tendo como base o conceito evolutivo de espécie [Wiley (1981), modificado de Simpson (1961)].

Porém não se pode descartar a hipótese vicariante de que as formas ancestrais de distribuição mais abrangente foram separadas pelo surgimento de uma barreira xérica formando espécies crípticas atuais. Alguns estudos (e.g. Powell e Powell 1987; Becker *et al.*, 1991; Morato *et al.*, 1992; Morato, 1994; Milet-Pinheiro e Schlindwein, 2005) apresentam evidências de que, para algumas espécies, uma pequena faixa aberta (100 m, segundo Powell e Powell, 1987) separando a mata contínua de fragmentos florestais é

suficiente para barrar o trânsito de machos entre os fragmentos. As altas temperaturas, a baixa umidade e a alta luminosidade das áreas mais abertas podem atuar como fatores inibitórios à movimentação dessas abelhas (Powell e Powell 1987; Morato, 1994). Isto é especialmente verdade, quando se consideram as espécies mais intimamente associadas aos grandes fragmentos florestais, e que, portanto, estariam menos propensas a deixar e/ou se afastar destes fragmentos.

Estudos sobre a biogeografia histórica de abelhas neotropicais (*e.g.* Camargo e Moure, 1994, 1996; Camargo, 1996; Camargo e Pedro, 2003) indicam a existência de cinco áreas de endemismo nesta região (Fig. 3a): (i) **sudeste Atlântica (Atl)** – região Atlântica da Bahia até o Paraná; (ii) **Sudeste da Amazônia (SEAm)** – área ao sul dos rios Madeira/Amazonas, incluindo todo o Brasil central e nordeste, até o noroeste da Argentina; (iii) **Norte da Amazônia (NAm)** – norte dos rios Negro e Amazonas (cráton Brasil/Guianas); (iv) **Sudoeste da Amazônia (SWAm)** – delimitado pelo alinhamento dos rios Uaupés/Negro ao norte, pelos rios Madeira/Mamoré ao sul e pelos Andes a oeste; e (v) **Chocó-CA** (noroeste do Peru até o México). Estas áreas foram propostas a partir da congruência em relação aos padrões de distribuição geográfica e as hipóteses filogenéticas de três gêneros de Meliponina (*Paratrigona* e *Geotrigona* – Camargo, 1996; Camargo e Moure, 1994, 1996 e *Partamona* – Camargo e Pedro, 2003) (Fig. 3c-d) e de um esquema de classificação proposto para as áreas de endemismo neotropicais (Amorim e Pires, *apud* Camargo e Pedro, 2003; Amorim, 2012) (Fig. 3b).

Além da definição das áreas de endemismo, é de interesse da biogeografia histórica compreender a relação entre estas áreas, que especificam a sequência e os momentos dos eventos de vicariância (Cracraft e Prum, 1988). Cada grupo de organismo possui uma história evolutiva única e a sua reconstrução muitas vezes pode ser limitada devido a problemas como a codificação equivocada de caracteres e a falta de táxons do grupo estudado (Camargo e Pedro, 2003). No entanto, é possível que as barreiras que supostamente afetaram estes grupos de Meliponina podem ter contribuído também para o delineamento da história biogeográfica das Euglossina (Nemésio *et al.*, 2007), desde que haja congruência espaço-temporal.

A sequência de eventos de vicariância proposta por Camargo (2006) (Fig. 4) indica que houve primeiramente a separação entre o noroeste (NW) e o sudeste (SE) da região Neotropical, ocasionada pelo alinhamento dos rios Madeira/Amazonas (mares epicontinentais relacionados às transgressões Tapajônicas no Mioceno inferior) (Fig. 4a). Em seguida, no Mioceno médio, houve a segunda quebra no compartimento NW,

aproximadamente ao longo da linha dos rios Caquetá/Japurá, provavelmente relacionado à transgressão do mar Maracaibo, separando o NAm do SWAm, o norte dos Andes e o Chocó-CA (Fig. 4b). Uma terceira quebra separou o SWAm do Chocó-CA, relacionado, possivelmente, ao soerguimento dos Andes equatoriais, que atingiu altitudes maiores que 3.000-4.000 m no Plio-Pleistoceno (Fig. 4c). No componente SE, há uma discordância em relação ao momento da separação entre as regiões Atl e SEAm que, no caso de *Paratrigona* e *Geotrigona*, ocorreu primeiramente, separando a área Atl do restante (Camargo e Moure, 1996). Apesar disso, algumas discrepâncias foram detectadas para *Geotrigona*, indicando que a separação da região Atl é posterior à separação entre NW e SE (Camargo e Moure, 1996). Além disso, Camargo e Vit (2013) indicam que a separação entre as regiões Atl e SEAm ocorreu mais recentemente, durante os eventos climáticos do Pleistoceno. Estas diferenças impõem dificuldades na proposição de uma história biogeográfica generalizada das abelhas neotropicais (Camargo e Pedro, 2003).

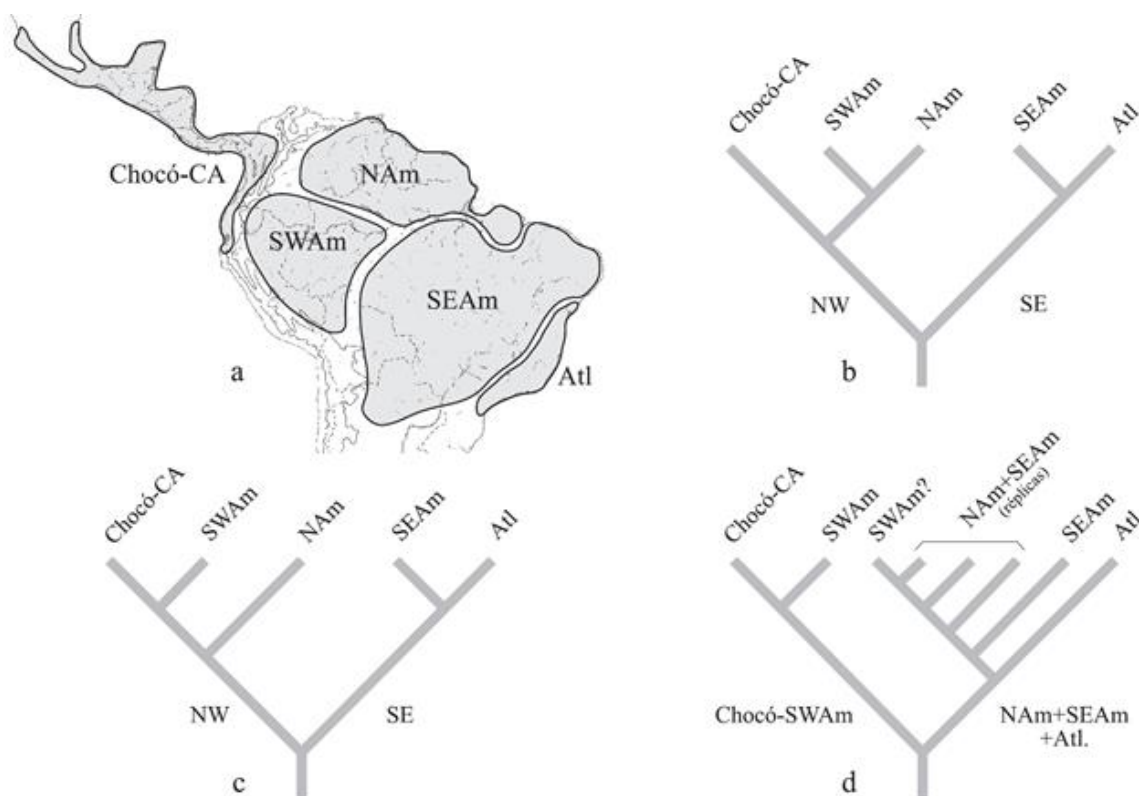


Figura 3. (a) Principais componentes biogeográficos que integram a região Neotropical. Cladogramas de área de endemismo para os principais componentes: (b) conforme Amorim e Pires (*apud* Camargo e Pedro, 2003); (c) conforme Camargo (1996) e Camargo e Moure (1994, 1996) inferido a partir do cladograma biológico para as espécies de *Paratrigona* e *Geotrigona*; e (d) conforme Camargo e Pedro (2003) inferido a partir do cladograma biológico para as espécies de *Partamona*. Modificado de Camargo e Pedro (2003).

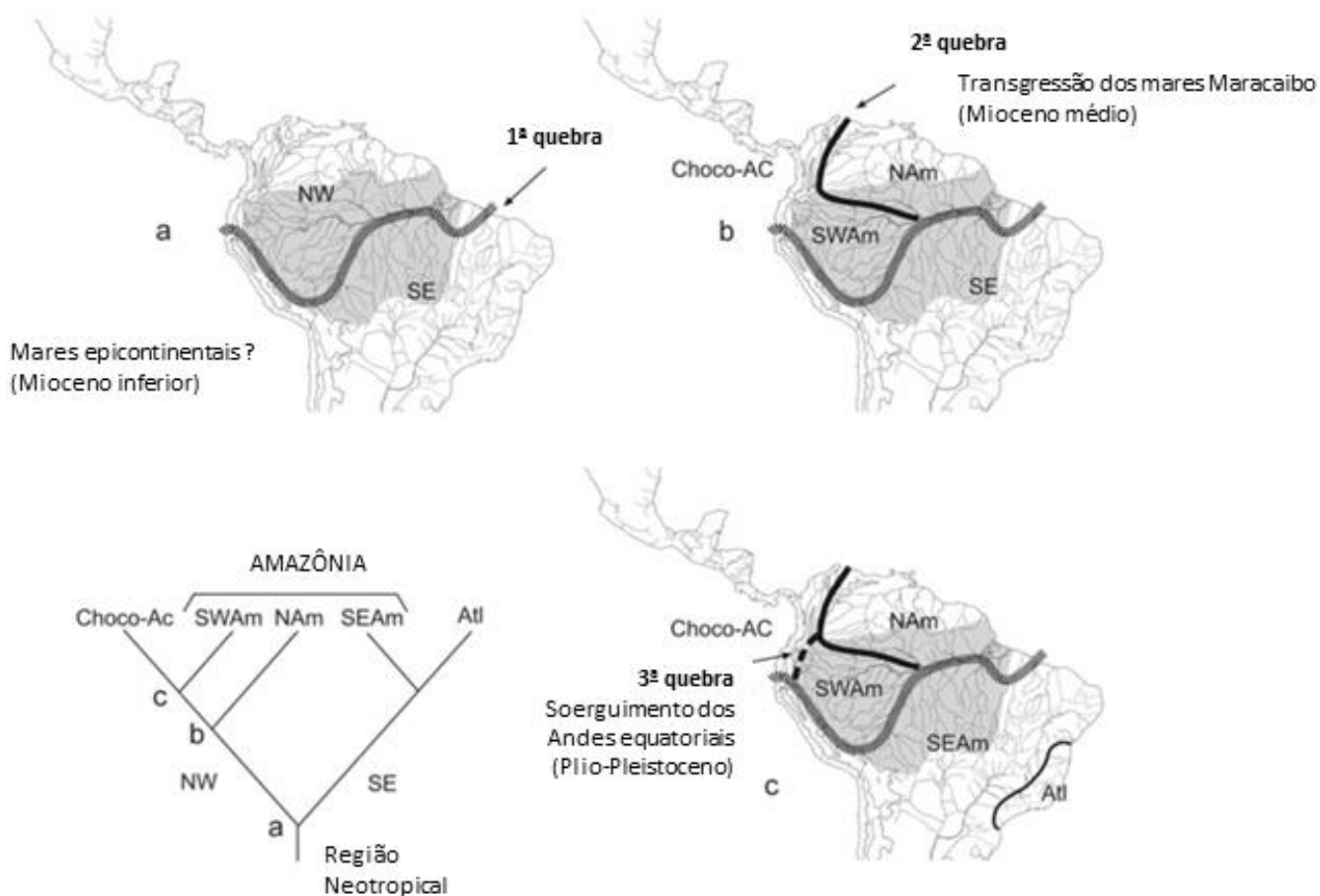


Figura 4. Sequência de eventos de separação e vicariância na região Neotropical proposto por Camargo (2006). A área cinza delimita a Amazônia, que sob a perspectiva da biogeografia de vicariância, não é uma unidade histórica. Modificado de Camargo e Vit, 2013.

Centenas de estudos empíricos de filogeografia foram publicadas nos últimos anos, porém uma pequena fração da diversidade biológica foi examinada sob a perspectiva filogeográfica (Avice, 2009). Poucos trabalhos com enfoque filogeográfico publicados até o momento envolveram as Euglossina. Destaca-se, entre eles, o de Dick *et al.* (2004) que fizeram um estudo de filogeografia comparada entre espécies de *Euglossa*, *Eulaema*, *Exaerete* e *Eufriesea* ao longo dos Andes e das florestas úmidas da Bacia Amazônica, incluindo algumas citadas por Nemésio (2009) (*Euglossa cognata*, *Eg. mixta*, *Eulaema meriana* e *Exaerete frontalis*).

Em vista das evidências recentes de declínio de várias espécies de abelhas, tanto silvestres quanto domesticadas, em diversas partes do mundo (*e.g.* Biesmeijer *et al.*, 2006; Colla e Packer, 2008; Grixti *et al.*, 2009), estudos que objetivem compreender as histórias genealógicas das espécies tornam-se fundamentais por auxiliarem na elucidação de incertezas taxonômicas que, por sua vez, tem implicações diretas na

proposição de medidas conservacionistas (Avise, 2009; Hickerson *et al.*, 2010). É neste contexto que se justifica este trabalho.

2. Objetivos

Este estudo tem como objetivo geral avaliar a estrutura filogeográfica de espécies ou pares de espécies irmãs de abelhas *Euglossina* que ocorrem tanto no domínio morfoclimático da Amazônia, quanto no da Mata Atlântica e que são dependentes de grandes remanescentes florestais. Pretende-se testar a hipótese de que a separação dos domínios morfoclimáticos da Amazônia e da Mata Atlântica pela barreira xérica representada pelos domínios da Caatinga, do Cerrado e do Chaco tem atuado no isolamento das populações de espécies de *Euglossina* dependentes dos ambientes de interior de grandes fragmentos florestais, produzindo um conjunto de pares de espécies crípticas.

2.1. Objetivos específicos

(i) determinar os graus de divergência e tempo de isolamento nos grupos estudados e verificar se eles são compatíveis com as hipóteses correntes sobre o tempo de isolamento das Florestas Amazônica e Atlântica.

(ii) verificar se o gene COI dá suporte às decisões taxonômicas recentes em *Euglossina* baseadas em estudo de caracteres morfológicos.

(iii) gerar dados relevantes para a conservação das espécies de *Euglossina* nos domínios florestais estudados.

3. Material e Métodos

3.1. Amostras

3.1.1. Espécies estudadas

Inicialmente, machos de seis espécies de *Euglossina* foram incluídos neste estudo: *Euglossa (Euglossa) analis* Westwood, 1840; *Euglossa (Euglossa) mixta* Friese,

1899; *Euglossa (Glossurella) crassipunctata* Moure, 1968 e o par de espécies próximas, *Eulaema (Eulaema) niveofasciata* (Friese, 1899) e *Eulaema (Eulaema) bombiformis* (Packard, 1869), de distribuição na Mata Atlântica e Amazônia, respectivamente para este par. Essas espécies foram eleitas por ocorrerem em fragmentos florestais grandes, com forte associação a pontos mais internos na mata ou em fragmentos sempre associados a estes grandes e mais bem preservados, portanto, por serem consideradas dependentes de ambientes florestais.

Contudo, após o início deste trabalho, houve mudanças taxonômicas para os grupos *E. analis*, *E. mixta* e *E. crassipunctata*. Em 2011, Nemésio reconheceu que a população da Mata Atlântica do grupo “*E. analis*” era uma espécie distinta, que ele descreveu como *Euglossa (Euglossa) marianae* Nemésio, 2011 e que sua espécie irmã, *E. analis*, estaria restrita à Amazônia. Posteriormente, Faria e Melo (2012), sugeriram que a espécie irmã amazônica de *E. marianae* seria *Euglossa (Euglossa) bidentata* Dressler, 1982b e não *E. analis* como Nemésio (2011) havia sugerido. Por isto, as amostras da Mata Atlântica foram renomeadas para ***E. marianae*** (Fig. 5g-l) e amostras de ***E. bidentata*** (Fig. 5a-f) foram incluídas neste estudo (Tab. 1). As seis amostras de *E. analis* (Amazônia) obtidas não apresentaram sequências de boa qualidade e, com isso, esta espécie não pode ser incluída nas análises.

Além disto, Faria e Melo (2012) propuseram mudanças para as *Euglossa* do grupo *analis* da Mata Atlântica, que foi reconhecido como um complexo de cinco espécies: *Euglossa cognata* Moure, 1970; *E. marianae* Nemésio, 2011; *E. roderici* Nemésio, 2009 e, duas espécies novas, *E. botocuda* Faria e Melo, 2012 e *E. calycina* Faria e Melo, 2012. Nesta revisão, Faria e Melo (2012) afirmam que estas duas espécies novas vinham sendo erroneamente identificadas como populações da Mata Atlântica de *E. iopyrrha* Dressler, 1982b e *E. mixta*, respectivamente. Todavia, devido à grande semelhança morfológica entre as espécies deste grupo, os espécimes de *E. botocuda* e *E. calycina* estavam identificados como *E. mixta* no início deste estudo. Em 2012, o próprio Dr. Melo re-identificou os exemplares empregados no presente estudo e o par ***E. calycina*** (Mata Atlântica) (Fig. 6g-l) e ***E. mixta*** (Amazônia e América Central) (Fig. 6a-f) foi incluído nas análises. Infelizmente, somente uma amostra de ***E. iopyrrha*** da Amazônia (Pará) pode ser acrescentada às amostras analisadas, de modo a fazer par com ***E. botocuda*** (Mata Atlântica), o que limitou as inferências sobre este par de espécies.

Embora *E. calycina/E. mixta*; *E. botocuda/E. iopyrrha*; e *E. marianae/E. bidentata* sejam considerados pares potenciais de espécies irmãs (Faria e Melo, 2012),

nenhuma análise filogenética para as espécies deste grupo foi feita até o momento. Considerando que estas espécies são morfológicamente muito semelhantes e que dificuldades em se demonstrar a monofilia de *Euglossa mixta* e *Euglossa cognata* já havia sido reportada no estudo de Dick *et al.* (2004), verificou-se, ao longo deste estudo, a necessidade de se fazer uma análise das relações filogenéticas entre as espécies do grupo *analisis*, além das análises dos pares de espécies *E. calycina*/*E. mixta* e *E. marianae*/*E. bidentata*.

Euglossa crassipunctata Moure, 1968 foi descrita com base em um macho coletado no Panamá. Como não foi possível reavaliar a identidade dos indivíduos deste grupo empregados neste trabalho, utilizando os caracteres da genitália dos machos, eles foram tratados, aqui, como “*E. crassipunctata*”.

O reconhecimento de *Eulaema niveofasciata* como espécie válida não é aceito unanimemente (Moure, 2000; Oliveira, 2006, 2007; Nemésio, 2009). Em 2000, Moure publicou uma chave taxonômica para as espécies do subgênero *Eulaema* em que ele considerou *E. niveofasciata* como espécie distinta de *E. bombiformis* pelo fato delas terem uma distribuição geográfica disjunta e pela diferença nas faixas de pelos de T1-3, que são amarelo-pilosas em *E. bombiformis* (Fig. 8a-f) e branco-pilosas em *E. niveofasciata* (Fig. 8g-l). Em seguida, Oliveira (2006, 2007) considerou *E. niveofasciata* como sinônimo júnior de *E. bombiformis*. No entanto, o nome *E. niveofasciata* foi revalidado por Nemésio (2009). Aqui, utilizam-se os nomes *E. niveofasciata* para os representantes da Mata Atlântica e *E. bombiformis* para os representantes da Amazônia e América Central.

Após a consideração dessas mudanças taxonômicas, machos de nove espécies de Euglossina estão incluídos neste estudo (Tab. 1). A identificação de cada espécime foi conferida cuidadosamente, com o uso das chaves taxonômicas disponíveis (Bonilla-Gómez e Nates-Parra, 1992; Faria e Melo, 2012; Moure, 2000; Nemésio, 2009; Nemésio, 2011; Nemésio e Engel, 2012) e dos trabalhos de descrição de cada espécie (Westwood, 1840; Packard, 1869; Friese, 1899; Moure, 1968; Dressler, 1982b; Nemésio, 2011; Faria e Melo, 2012; Nemésio e Engel 2012), quando possível. As instituições depositárias do material testemunho encontram-se na Tabela 1.

Exemplares das espécies estudadas são apresentados nas Figuras 5-8: um macho de *E. bidentata* (Fig. 5a-f), *E. marianae* (Fig. 5g-l), *E. mixta* (Fig. 6a-f), *E. calycina* (Fig. 6g-l), *E. crassipunctata* (espécime da Mata Atlântica: Fig. 7a-f; espécime da Amazônia: Fig. 7g-l), *Eulaema bombiformis* (Fig. 8a-f) e *E. niveofasciata* (Fig. 8g-l).

Essas fotos foram tomadas nos Laboratórios de Aracnologia e de Herpetologia da UFMG, com câmera digital DFC295 acoplada a uma lupa (Leica M205C) e montadas em uma única imagem multi-focal pelo *software* Leica Application Suite v. 3.8.0.

3.1.2. Origem das amostras

Aproximadamente 92% dos exemplares empregados aqui já se encontravam depositadas na Coleção Entomológica das Coleções Taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CECT-UFMG). Os demais exemplares foram obtidos por empréstimo ou como doação das seguintes instituições: *American Museum of Natural History* (Nova Iorque, EUA), *Canadian National Collection* (Ottawa, Canadá), *Cornell University Insect Collection* (Cornell University, Ithaca, EUA) e *Royal Ontario Museum* (Toronto, Canadá). Estes exemplares representam populações de outros países como Belize, Costa Rica, Equador, Guiana Francesa, Honduras, e Peru, além de localidades adicionais da Amazônia brasileira e do estado do Ceará. A quantidade de exemplares de cada espécie de abelha, assim como a instituição em que eles se encontram depositados estão detalhados na Tabela 1.

Espécimes adicionais foram obtidos em expedição de coleta realizada em abril de 2012, ao Parque Nacional de Ubajara, Ceará. Este parque está localizado em uma área de Brejo de Altitude e representa um dos poucos remanescentes de Mata Atlântica do Ceará. A autorização (nº 26425-1) para as coletas de material biológico realizadas neste estudo encontra-se no Apêndice F1.

Os pontos de amostragem georreferenciados cujas amostras estão incluídas nas análises moleculares (“DNA disponível”) são apresentados nas Figuras 9-12. Quando se diz “DNA indisponível”, isto significa que a extração de DNA não foi bem sucedida ou que o DNA se encontra muito fragmentado e, por isso, as sequências não estão com boa qualidade para serem incluídas nas análises. Os mapas foram gerados no ArcGis 9.0, utilizando-se uma camada no formato *shapefile* dos biomas brasileiros (IBGE, 2011), que corresponde ao *shapefile* que mais se aproxima dos domínios morfoclimáticos brasileiros.

Para o par de espécies *E. marianae* e *E. bidentata*, obteve-se um total de 91 espécimes, sendo 73 de *E. marianae* (coletados entre 1999 e 2010) e 18 de *E. bidentata* (coletados entre 1996 e 2011) (Tab. 1). Os procedimentos de extração de DNA e sequenciamento foram aplicados às 20 amostras da localidade tipo de *E. marianae*

(Marliéria, MG, Parque Estadual do Rio Doce – Nemésio, 2011), porém sem sucesso. No caso de *E. bidentata*, um exemplar de Loreto, Peru, que é a localidade mais próxima à localidade tipo desta espécie (Peru, Huánuco, Río Pachitea, Lullapichis – Moure *et al.*, 2012), foi incluído nas análises.

Do par *E. calycina* e *E. mixta*, foram obtidos 123 espécimes, sendo 31 de *E. calycina* (coletados entre 2009 e 2010) e 92 de *E. mixta* (coletados entre 1996 e 2012) (Tab. 1). Amostras da localidade tipo de *E. calycina* (Conceição da Barra, ES – Faria e Melo, 2012) foram incluídas nas análises. Para *E. mixta*, a localidade mais próxima à localidade tipo (Panamá, Chiriquí – Moure *et al.*, 2012) da qual foi possível obterem-se amostras foi *Río Plátano Biosphere Reserve*, Honduras.

Obtiveram-se 51 espécimes de *E. botocuda* (coletados entre 2009 e 2010) e apenas um de *E. iopyrrha* (coletado em 2006) (Tab. 1). Amostras de *E. botocuda* foram coletadas em Prado e Porto Seguro, próximas à localidade tipo desta espécie (Itamarajú, Bahia). A localidade tipo de *E. iopyrrha* (Óbidos, Pará) fica a cerca de 42 Km de Oriximiná, onde a amostra empregada no presente estudo foi coletada.

Um total de 117 machos de “*E. crassipunctata*”, coletados entre 2001 e 2011, foram obtidos para este estudo (Tab. 1). Não foi possível obter amostras da localidade tipo desta espécie (Panamá, Canal Zone, Navy Reservation, Norte de Gamboa – Moure, 1968; Moure *et al.*, 2012). A localidade mais próxima da qual foi possível se obter amostras foi Boca Tapada, Costa Rica.

Um total de 125 machos foi obtido do par *E. niveofasciata* e *E. bombiformis*, sendo 72 de *E. niveofasciata* (coletados entre 2009 e 2012) e 53 de *E. bombiformis* (coletados entre 1985 e 2012) (Tab. 1). O estado de Pernambuco, Brasil, é citado por Moure *et al.* (2012) como a localidade tipo de *E. niveofasciata*. A localidade mais próxima de onde se obtiveram três exemplares desta espécie foi Murici, AL. Não foi possível obter amostras da localidade tipo de *E. bombiformis* (Quito, Equador; Moure *et al.*, 2012). A localidade mais próxima de onde foi possível obter amostras foi Porto Velho, RO.

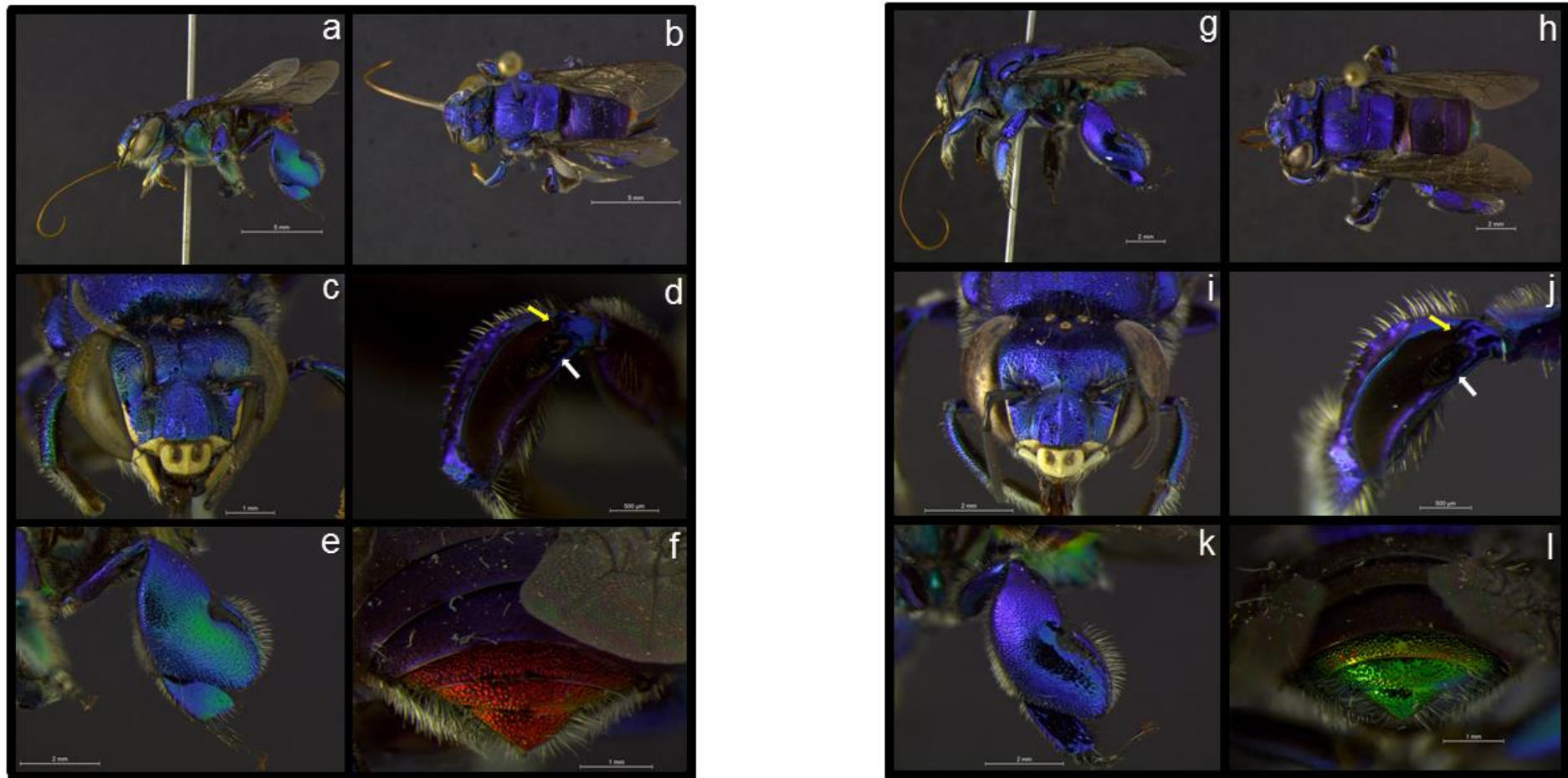


Figura 5. Machos de *Euglossa bidentata* (Cruzeiro do Sul-AC, nº espécime: 36810) (a-f) e de *Euglossa marianae* (Igrapiúna-BA, nº espécime: 47365) (g-l): a, g = habitus, vista lateral; b, h = habitus, vista dorsal; c, i = cabeça, vista frontal; d, j = tíbia média, com destaque para os coxins anterior (seta branca) e posterior (seta amarela); e, k = tíbia posterior, vista lateral; f, l = T5-T7. Note que T5 em f é vermelho acobreado e em l é verde dourado, enquanto que T6-T7 em f são amarelo-avermelhados brilhantes e em l estes tergites são verdes brilhantes.

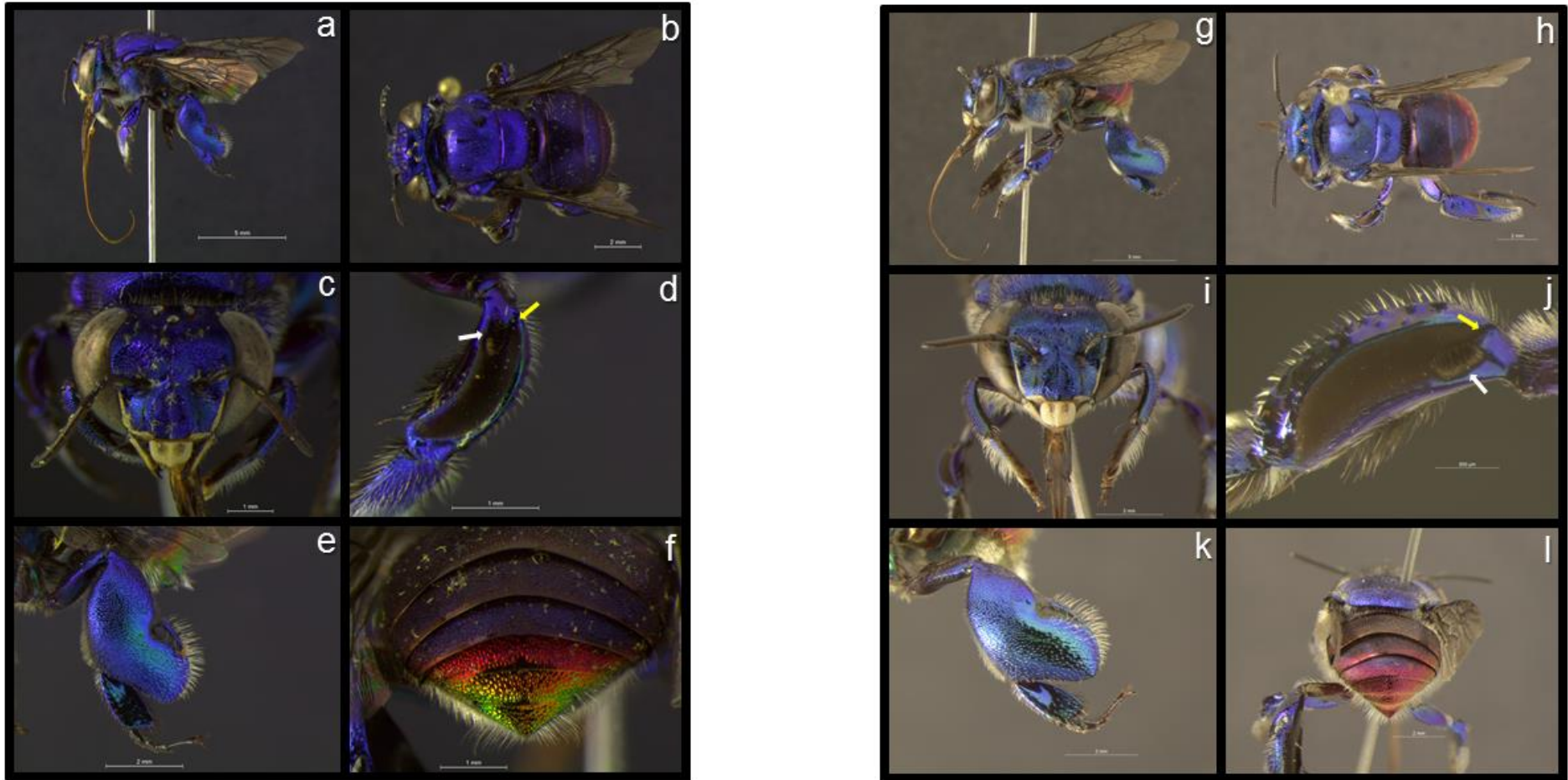


Figura 6. Machos de *Euglossa mixta* (Oriximiná-PA, nº espécime: 34706) (**a-f**) e de *Euglossa calycina* (Conceição da Barra-ES, nº espécime: 50026) (**g-l**): **a, g** = habitus, vista lateral; **b, h** = habitus, vista dorsal; **c, i** = cabeça, vista frontal. Note que em **c** a cabeça é azul violeta e em **i** é azul; **d, j** = tíbia média, com destaque para o coxim anterior (seta branca). Em **d** a seta amarela indica um coxim posterior pequeno, enquanto que em **j** a seta amarela aponta para uma depressão em forma de cálice no local do coxim posterior vestigial; **e, k** = tíbia posterior, vista lateral; **f, l** = T5-T7.

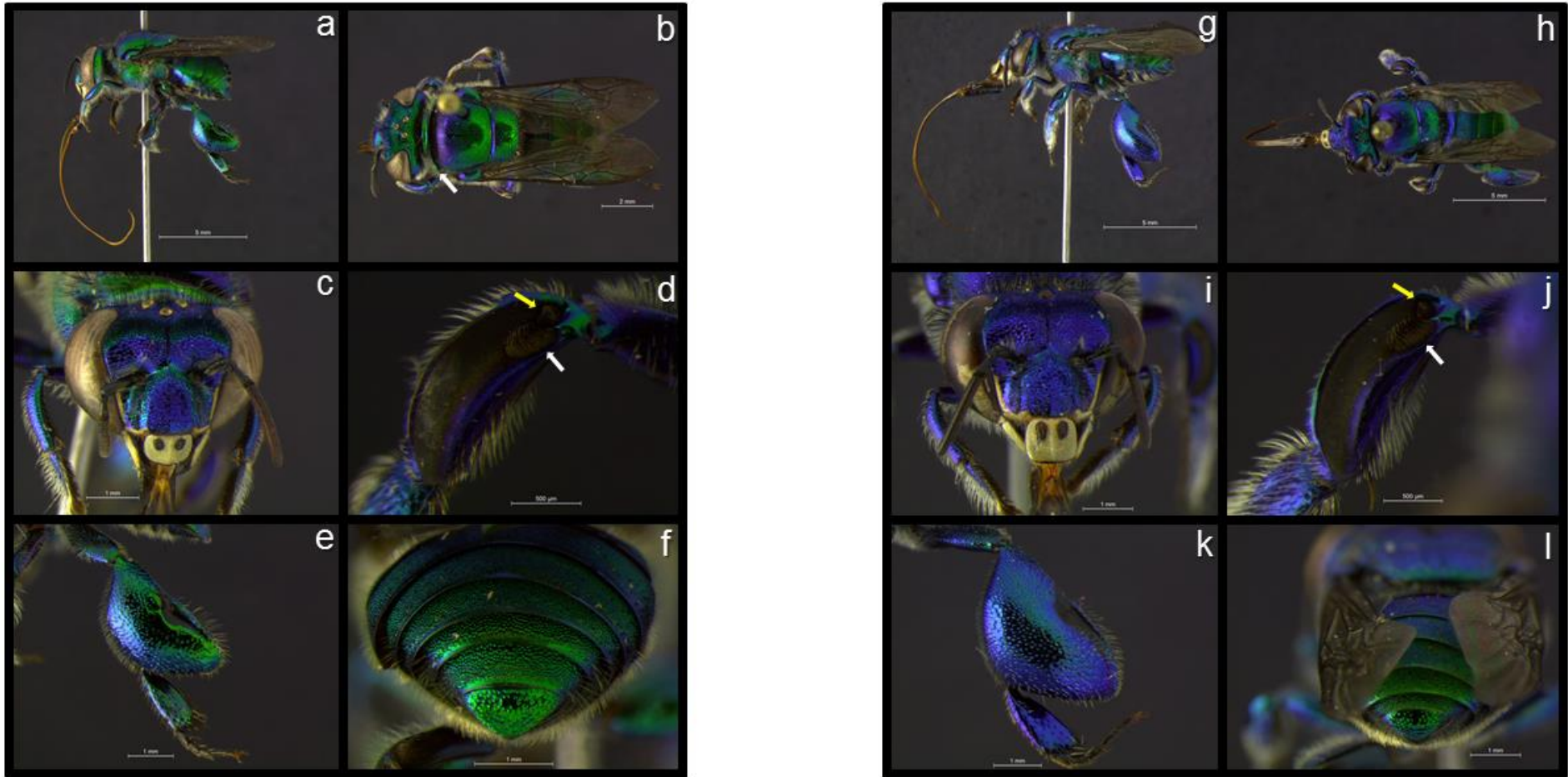


Figura 7. Machos de “*Euglossa crassipunctata*” de Oriximiná-PA (nº espécime: 35948) (**a-f**) e de Sooretama-ES (nº espécime: 48784) (**g-l**): **a, g** = habitus, vista lateral; **b, h** = habitus, vista dorsal (em **b**, a seta branca indica o ângulo dorsolateral do pronoto agudo e projetado); **c, i** = cabeça, vista frontal. Note que em **c** a coloração azulada está restrita ao clipeo e à fronte superior, enquanto que em **i** a cabeça é toda azulada; **d, j** = tíbia média, com destaque para os coxins anterior (seta branca) e posterior (seta amarela); **e, k** = tíbia posterior, vista lateral; **f, l** = T5-T7.

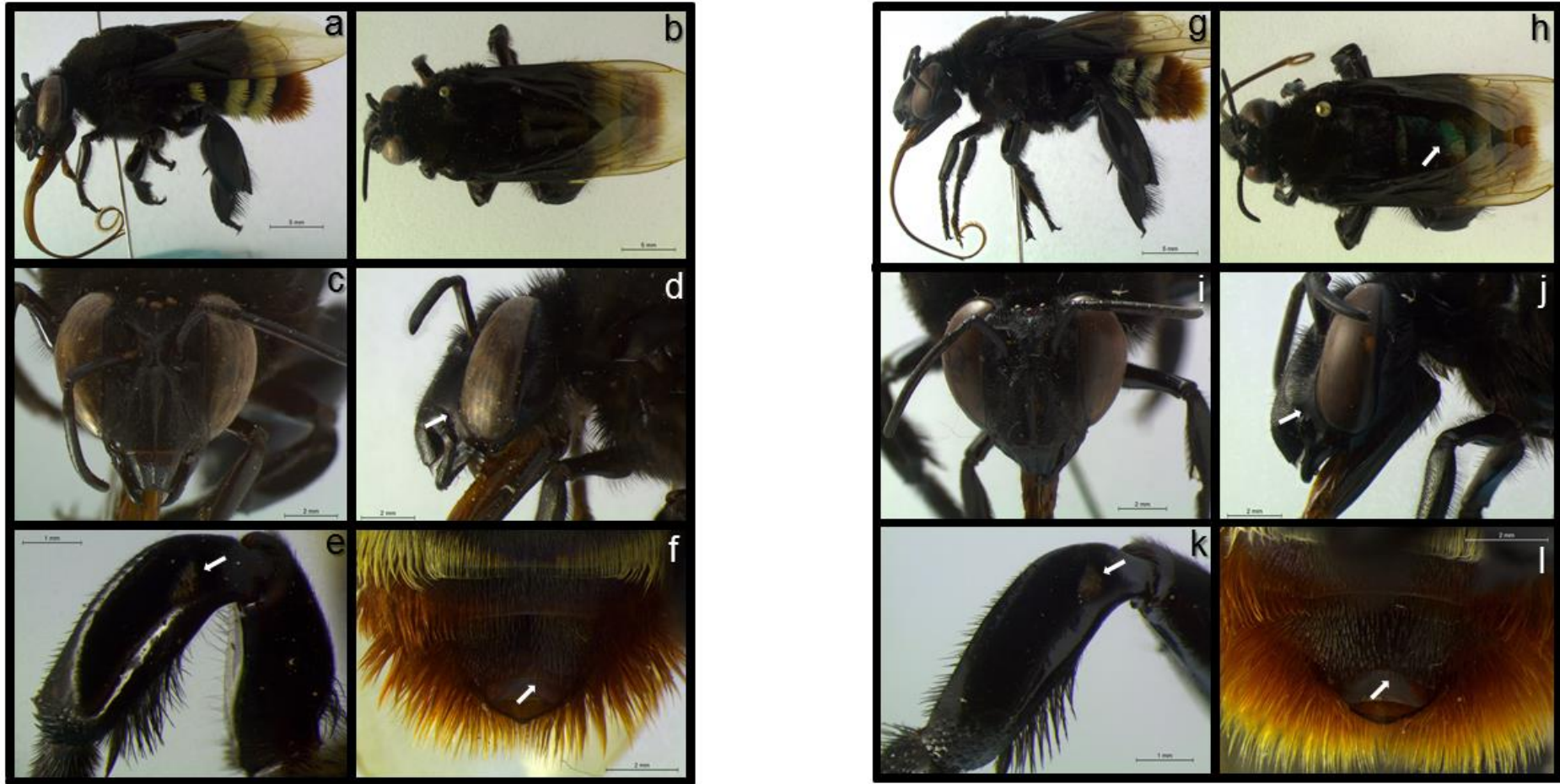


Figura 8. Machos de *Eulaema bombiformis* (Oriximiná-PA, nº espécime: 36061) (a-f) e de *Eulaema niveofasciata* (Conceição da Barra-ES, nº espécime: 49684) (g-l): a, g = habitus, vista lateral (note que em a as faixas dos T1-3 são amarelo-pilosas e em g elas são branco-pilosas); b, h = habitus, vista dorsal (em h é possível notar que o integumento de T2-T3, indicado pela seta, apresenta brilho verde); c, i = cabeça, vista frontal; d, j = cabeça, vista lateral (seta indica a distância clípeo-orbital inferior que é cerca de metade da distância clípeo-orbital superior); e, k = tíbia média com o coxim apontado pela seta branca; f, l = E-5 com cerdas curtas, com detalhe para as cerdas da margem distal ligeiramente maiores indicadas pela seta branca.

Tabela 1. Lista de espécies incluídas neste estudo, número total de machos, data de coleta dos espécimes, país e localidade de origem, amostras com DNA disponível e indisponível e instituição depositária dos espécimes.

Espécie	Número de machos	Datas de coleta	País: localidade, estado/província	DNA disponível	DNA indisponível	Instituição depositária
<i>Euglossa (Glossurella) "crassipunctata"</i>	117	2001 a 2011	Brasil: Camacan, BA	13	1*	UFMG ^g
			Brasil: Conceição da Barra, ES	13	1*	UFMG
			Brasil: Igrapiúna, BA	9	0	UFMG
			Brasil: Ilhéus, BA	0	3*	UFMG
			Brasil: Itamaraju, BA	7	0	UFMG
			Brasil: Linhares, ES	4	0	UFMG
			Brasil: Murici, AL	10	0	UFMG
			Brasil: Oriximiná, PA	7	2*	UFMG
			Brasil: Porto Seguro, BA	1	0	UFMG
			Brasil: São Gonçalo do Rio Abaixo, MG	2	1*	UFMG
			Brasil: Sooretama, ES	11	2*	UFMG
			Brasil: Una, BA	10	1*	UFMG
			Brasil: Uruçuca, BA	10	2*	UFMG
			Costa Rica: Boca Tapada, Alajuela	2	4*	ROM ^e
Guiana Francesa: Kourou	0	1*	Coleção Roubik ^b			
<i>Euglossa (Euglossa) marianae</i> ⁱ	73	1999 a 2010	Brasil: Igrapiúna, BA	5	0	UFMG
			Brasil: Linhares, ES	14	1*	UFMG
			Brasil: Marliéria, MG ^{LT}	0	20*	UFMG
			Brasil: Porto Seguro, BA	3	0	UFMG
			Brasil: Sooretama, ES	13	2*	UFMG
			Brasil: Uruçuca, BA	10	5*	UFMG
<i>Euglossa (Euglossa) bidentata</i> ⁱ	18	1996 a 2011	Brasil: Canaã dos Carajás, PA	3	4*	UFMG
			Brasil: Cruzeiro do Sul, AC	0	1*	UFMG
			Brasil: Mâncio Lima, AC	1	1*	UFMG/UFPR ^h
			Brasil: Oriximiná, PA	1	0	UFPR
			Brasil: Parauapebas, PA	2	0	UFMG
			Brasil: Porto Velho, RO	2	1*	UFMG
			Brasil: Porto Walter, AC	0	1*	UFMG

Espécie	Número de machos	Datas de coleta	País: localidade, estado/província	DNA disponível	DNA indisponível	Instituição depositária
<i>Euglossa (Euglossa) calycina</i> ⁱⁱ	31	2009 a 2010	Peru: Loreto	1	0	UFPR
			Brasil: Conceição da Barra, ES ^{LT}	8	6*	UFMG
			Brasil: Ilhéus, BA	3	0	UFMG
			Brasil: Itamaraju, BA	3	2*	UFMG
			Brasil: Porto Seguro, BA	1	0	UFMG
			Brasil: Sooretama, ES	1	3*	UFMG
<i>Euglossa (Euglossa) mixta</i> ⁱⁱ	92	1996 a 2012	Brasil: Uruçuca, BA	1	3*	UFMG
			Belize: Cockscomb Jaguar Preserve	0	1*	AMNH ^a
			Belize: duPlooy's Jungle Lodge	0	1*	AMNH
			Belize: Las Cuervas Research Station	2	1*	AMNH
			Belize: Mama Noots Backabush Resort	0	4*	AMNH
			Belize: Pine Ridge (Mahogany)	0	1*	AMNH
			Brasil: Belém, PA	0	2*	UFMG
			Brasil: Belterra, PA	0	2*	UFMG
			Brasil: Carajás, PA	10	6*	UFMG
			Brasil: Carutapera, MA	0	2*	UFMG
			Brasil: Mâncio Lima, AC	0	5*	UFMG
			Brasil: Marechal Thaumaturgo, AC	0	1*	UFMG
			Brasil: Oriximiná, PA	14	1*	UFMG
			Brasil: Paragominas, PA	1	2*	UFMG
			Brasil: Porto Velho, RO	2	3*	UFMG
			Brasil: Rio Branco, AC	0	15*	UFMG
			Brasil: Tomé-Açu, PA	0	2*	UFMG
			Equador: Napo	0	3*	ROM
			Guiana Francesa: Kourou	0	1*	Coleção Roubik
			Honduras: Bonanza Río Plátano Trail, Olancho	1	3*	AMNH
Honduras: Río Plátano (ponto 1), Colon	1	0	AMNH			
Honduras: Río Plátano (ponto 2), Colon	1	1*	AMNH			
Honduras: Río Plátano (ponto 3), Colon	1	1*	AMNH			
Honduras: Río Plátano, Gracias a Dios	1	0	AMNH			
<i>Euglossa (Euglossa) botocuda</i> ⁱⁱⁱ	39	2009 a 2010	Brasil: Linhares, ES	13	2*	UFMG
			Brasil: Porto Seguro, BA	2	0	UFMG

Espécie	Número de machos	Datas de coleta	País: localidade, estado/província	DNA disponível	DNA indisponível	Instituição depositária
			Brasil: Prado, BA	5	1*	UFMG
			Brasil: Sooretama, ES	7	3*	UFMG
			Brasil: Una, BA	10	3*	UFMG
			Brasil: Uruçuca, BA	2	3*	UFMG
<i>Euglossa (Euglossa) iopyrrha</i> ⁱⁱⁱ	1	2006	Brasil: Oriximiná, PA	1	0	UFMG
<i>Eulaema (Eulaema) niveofasciata</i> ^{iv}	72	2009 a 2012	Brasil: Conceição da Barra, ES	5	0	UFMG
			Brasil: Guaramiranga, CE	2	1*	UFCE ^f /UFMG
			Brasil: Igrapiúna, BA	6	1*	UFMG
			Brasil: Ilhéus, BA	3	0	UFMG
			Brasil: Itamaraju, BA	2	2*	UFMG
			Brasil: Linhares, ES	4	0	UFMG
			Brasil: Mulungu, CE	0	3*	UFCE/UFMG
			Brasil: Murici, AL	3	0	UFMG
			Brasil: Pacoti, CE	0	3*	UFCE/UFMG
			Brasil: Porto Seguro, BA	9	1*	UFMG
			Brasil: Sooretama, ES	4	2*	UFMG
			Brasil: Ubajara, CE	4	3*	UFMG
			Brasil: Una, BA	6	2*	UFMG
			Brasil: Uruçuca, BA	4	2*	UFMG
<i>Eulaema (Eulaema) bombiformis</i> ^{iv}	53	1985 a 2012	Brasil: Belém, PA	0	2*	CPATU ^d /UFMG
			Brasil: Belterra, PA	0	2*	CPATU/UFMG
			Brasil: Benjamin Constant, AM	0	1*	CUIC ^c
			Brasil: Carajás, PA	7	2*	UFMG
			Brasil: Carutapera, MA	1	2*	CPATU/UFMG
			Brasil: Juína, MT	0	7*	UFMG
			Brasil: Nhamundá, AM	3	0	UFMG/ CUIC
			Brasil: Nova Ipixuna, PA	0	3*	CPATU/UFMG
			Brasil: Novo Aripuanã, AM	2	1*	CUIC
			Brasil: Oriximiná, PA	4	6*	UFMG
			Brasil: Paragominas, PA	0	1*	CPATU/UFMG
			Brasil: Porto Velho, RO	2	2*	UFMG
			Brasil: Tomé-Açu, PA	1	1*	CPATU/UFMG

Espécie	Número de machos	Datas de coleta	País: localidade, estado/província	DNA disponível	DNA indisponível	Instituição depositária
			Brasil: Tonantins, AM	0	1*	CUIC
			Costa Rica: Puerto Viejo de Sarapiquí	1	0	UFMG
			Guiana Francesa: Kourou	0	1*	Coleção Roubik

^a AMNH = American Museum of National History – Nova Iorque, EUA.

^b Coleção do Dr. David W. Roubik – Smithsonian Tropical Research Institute.

^c CUIC = Cornell University Insect Collection - Cornell University – Ithaca, EUA.

^d CPATU = Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Oriental - Embrapa Amazônia Oriental. Material doado para a coleção da UFMG.

^e ROM = Royal Ontario Museum – Toronto, Canadá.

^f UFCE = Universidade Federal do Ceará. Material doado para a coleção da UFMG.

^g UFMG = Coleção Entomológica das Coleções Taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte, Brasil.

^h UFPR-DZUP = Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná – Curitiba, Brasil.

* DNA indisponível devido à qualidade ruim da molécula para o sequenciamento.

ⁱ Par de espécies: *Euglossa (Euglossa) marianae* e *Euglossa (Euglossa) bidentata* de ocorrência na Mata Atlântica e na Amazônia, respectivamente.

ⁱⁱ Par de espécies: *Euglossa (Euglossa) calycina* e *Euglossa (Euglossa) mixta* de ocorrência na Mata Atlântica e na Amazônia, respectivamente.

ⁱⁱⁱ Par de espécies: *Euglossa (Euglossa) botocuda* e *Euglossa (Euglossa) iopyrrha* de ocorrência na Mata Atlântica e na Amazônia, respectivamente. Incluído somente na análise filogenética do grupo *analis*.

^{iv} Par de espécies: *Eulaema (Eulaema) niveofasciata* e *Eulaema (Eulaema) bombiformis* de ocorrência na Mata Atlântica e na Amazônia, respectivamente.

^{LT} Localidade tipo



Figura 9. Mapa da América do Sul com destaque para os biomas brasileiros e os pontos de amostragem de *Euglossa marianae* e *Euglossa bidentata*. Os círculos e as cruzes pretas referem-se aos pontos de amostragem cujas amostras não estão incluídas nas análises moleculares e os círculos e as cruzes vermelhas referem-se às amostras incluídas nas análises moleculares.



Figura 10. Mapa da América do Sul com destaque para os biomas brasileiros e os pontos de amostragem de *Euglossa calycina* e *Euglossa mixta*. As cruces pretas referem-se aos pontos de amostragem cujas amostras não estão incluídas nas análises moleculares e os círculos e as cruces vermelhas referem-se às amostras incluídas nas análises moleculares.



Figura 11. Mapa da América do Sul com destaque para os biomas brasileiros e os pontos de amostragem de *Euglossa crassipunctata*. As cruzes pretas referem-se aos pontos de amostragem cujas amostras não estão incluídas nas análises moleculares e as cruzes vermelhas referem-se às amostras incluídas nas análises moleculares.



Figura 12. Mapa da América do Sul com destaque para os biomas brasileiros e os pontos de amostragem de *Eulaema niveofasciata* e *Eulaema bombiformis*. Os círculos e as cruzes pretas referem-se aos pontos de amostragem cujas amostras não estão incluídas nas análises moleculares e os círculos e as cruzes vermelhas referem-se às amostras incluídas nas análises moleculares.

3.2. Extração, amplificação e sequenciamento do DNA

A maior parte das amostras de DNA foi extraída da musculatura de uma das pernas posteriores de 409 exemplares conservados a seco. O DNA de 98 exemplares foi extraído de uma perna posterior conservada em álcool absoluto; de outros três exemplares ele foi extraído da musculatura associada às asas e de outros sete, da musculatura associada à genitália. Nos casos em que se utilizou a musculatura das asas, removia-se a cabeça do inseto, retiravam-se os músculos com uma pinça e colava-se a cabeça de volta, no tórax. A musculatura associada à genitália foi retirada de espécimes ainda frescos, quando a genitália era retirada para estudo.

Durante o estágio sanduíche na *York University* (Canadá), um total de 439 amostras foram enviadas em placas de 96 poços (*wells*) para o *Biodiversity Institute of Ontario* (Guelph, Canadá). Destas, quatro eram de *Euglossa analis*, 51 de *E. botocuda*, 31 de *E. calycina*, 113 de “*E. crassipunctata*”, uma de *E. iopyrrha*, 73 de *E. marianae*, 75 de *E. mixta*, 35 de *Eulaema bombiformis* e 56 de *E. niveofasciata*. Para todas as amostras, neste caso, o DNA foi extraído da musculatura da perna posterior.

A preparação de cada placa consistia em depositar uma gota de álcool absoluto em cada poço e, em seguida, cada fileira da placa era tampada com tampas plásticas. Após este procedimento, o tecido (parte da perna posterior seca ou conservada em álcool absoluto) de cada abelha era, então, depositado em poços individuais, tomando-se os devidos cuidados para se evitar a contaminação de uma amostra com a outra ou com qualquer outra fonte de contaminação. Estes cuidados consistiam da utilização de pinças lavadas com água e sabão, seguido de água sanitária (hipoclorito de sódio), água destilada e, por fim, álcool absoluto. O último poço da placa era deixado vazio para servir de controle negativo.

O método de extração de DNA utilizado em Guelph é conhecido como *Glass Fiber Plate DNA Extraction* (Ivanova *et al.*, 2006). Uma alíquota do DNA genômico extraído de cada exemplar foi repatriada e depositada no banco de DNA das Coleções Taxonômicas da UFMG.

Paralelamente ao sequenciamento das amostras em Guelph, quatro protocolos de extração de DNA genômico foram testados no *Stutchbury's Molecular Ecology Lab* (*York University*), como alternativa ao método de alta toxicidade do Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico (Sambrook *et al.*, 1989), usualmente empregado em estudos moleculares com tecidos animais. Os quatro protocolos testados foram: (i) *High-Salt*

proposto por Paxton *et al.* (1996); (ii) CTAB/Clorofórmio: Álcool Isoamílico modificado por Möller *et al.* (1992) e Reineke *et al.* (1998); (iii) protocolo do Acetato de Potássio de Coen *et al.* (1982) com modificações por Dorn *et al.* (2003) e Calderón *et al.* (2004); e (iv) protocolo do *Chelex 100* (BioRad) de Strange *et al.* (2009). Contudo, nenhum deles resultou em uma quantidade satisfatória de amostras de boa qualidade do DNA genômico.

Por isto, o protocolo do Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico foi utilizado para as extrações de DNA das 75 amostras (2 *E. analis*; 18 *E. bidentata*; 4 *E. crassipunctata*; 17 *E. mixta*; 27 *E. bombiformis* e 7 *E. niveofasciata*) obtidas posteriormente ao estágio sanduíche. Estas extrações foram feitas no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM/UFMG). O DNA total extraído por este método foi ressuspendido em Low TE (10 mM Tris-HCl; pH 8,0; 1 mM EDTA) e 1 µL foi utilizado para quantificação em espectrofotômetro (*NanoDrop Thermo Scientific 2000*). Todas as amostras de DNA obtidas estão depositadas no banco de DNA das Coleções Taxonômicas da UFMG.

3.2.1. Marcadores moleculares

Os dados moleculares empregados nas análises são parte da subunidade I da citocromo c oxidase (COI) obtidos com os iniciadores sugeridos por Hebert *et al.* (2004) (Tab. 2). Os reagentes e condições da PCR estão detalhados na Tabela 3. Este é um gene mitocondrial codificador de uma proteína da cadeia transportadora de elétrons que possui algumas características que o fazem adequado como marcador molecular de estudos evolutivos (Lunt *et al.*, 1996). Estas características são: (i) gene cujo produto é bem caracterizado bioquimicamente, por ser um catalizador terminal da cadeia respiratória mitocondrial; (ii) tamanho e estrutura bem conservados entre os organismos aeróbicos investigados; (iii) presença de regiões altamente conservadas e outras altamente variáveis que estão intimamente associadas dentro do gene (Saraste, 1990) (Fig. 13); (iv) é o maior dentre as três subunidades que codificam a citocromo c oxidase mitocondrial (em *Drosophila yakuba*: COI = 511 aminoácidos; COII = 228 aminoácidos e COIII = 261 aminoácidos) (Clary e Wolstenholme, 1985); e (v) é um dos maiores genes codificadores de proteína do genoma mitocondrial de Metazoa (Lunt *et al.*, 1996). O modelo estrutural bidimensional da proteína citocromo c oxidase (subunidade I) de insetos é apresentado na Figura 13 e um mapa do genoma

mitocondrial circular de *Apis mellifera* que ilustra o posicionamento do gene COI pode ser visto na Figura 14.

Além deste gene mitocondrial, tentou-se amplificar e sequenciar outros dois marcadores nucleares, parte do gene *Wingless* (Apêndices F2, T1 e T2) e parte do gene CAD (Apêndices F3, T1 e T2), cada um contendo um intron. O *Wingless* é um gene codificador de proteína e está envolvido no início da embriogênese de insetos e vertebrados. O CAD é também um gene codificador de proteína de cópia única e está envolvido na biossíntese de pirimidina. Cabe ressaltar que estes dois marcadores não foram incluídos nas análises pelos seguintes motivos: o intron do *Wingless* (≈ 100 pb) não apresentou variação intraespecífica e entre espécies próximas para os grupos analisados (4 *E. marianae*; 1 *E. mixta*; 3 *E. calycina*; 3 *E. botocuda*; 6 *E. crassipunctata*; 1 *E. bombyformis* e 4 *E. niveofasciata*) e houve problemas na amplificação e sequenciamento do CAD.

Tabela 2. Sequências dos iniciadores para a amplificação por PCR do gene COI.

Tamanho do amplicon (pb)	Iniciadores	Sequência	Referência
≈ 658	LepF1	5'- ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG - 3'	Hebert <i>et al.</i> , 2004
	LepR1	5'- TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA - 3'	Hebert <i>et al.</i> , 2004
	C1-N-2191 (R)*	5' - CCCGGTAAAATTTAAAATATAAACTTC - 3'	Simon <i>et al.</i> , 1994

* Nas poucas ocasiões em que as amplificações com os iniciadores LepF1/LepR1 falharam, utilizou-se o par de primers LepF1/C1-N-2191(R) para gerar o amplicon.

Tabela 3. Reagentes utilizados na PCR para amplificação do gene mitocondrial COI das amostras enviadas para o *Biodiversity Institute of Ontario* (Canadá) e aquelas amplificadas no LBEM/UFMG.

Reagentes	Concentração final (Canadá)*	Concentração final (LBEM)**
Trehalose	5 %	-
ddH ₂ O	-	-
Tampão	1 X	1 X
MgCl ₂	2,5 mM	2 mM
<i>Primer Forward</i> LepF1	0,1 µM	0,5 µM
<i>Primer Reverse</i> LepR1	0,1 µM	0,5 µM
<i>dNTPs</i>	0,05 mM	0,2 mM
<i>Platinum Taq DNA Polymerase</i> (Invotrogen™)	0,3 U/reacção	0,5 U/reacção
Volume para uma reacção	10,5 µL	10,5 µL
DNA genômico	≈ 50 ng/µL (1-2 µL)	≈ 50 ng/µL (1-2 µL)

Condições da PCR: Desnaturação inicial a 94 °C por 1 min; 5 ciclos de 94 °C por 30 s; temperatura de anelamento 45 - 50 °C por 40 s; extensão a 72 °C por 1 min seguido de 30 - 35 ciclos de 94 °C por 30 s; 51 - 54 °C por 40 s e 72 °C por 1 min com extensão final a 72°C por 10 min, seguido de 4°C por tempo indefinido. Fonte: Hebert *et al.*, 2004.

* Protocolo do pré-mix da PCR sugerido por Ivanova e Grainger, 2006.

** Protocolo do pré-mix da PCR sugerido por Ivanova e Grainger (2006) com modificações neste estudo. Utilizou-se o *primer reverse* C1-N-2191 (Simon *et al.*, 1994) nas poucas ocasiões em que as amplificações com o iniciador LepR1 falharam.

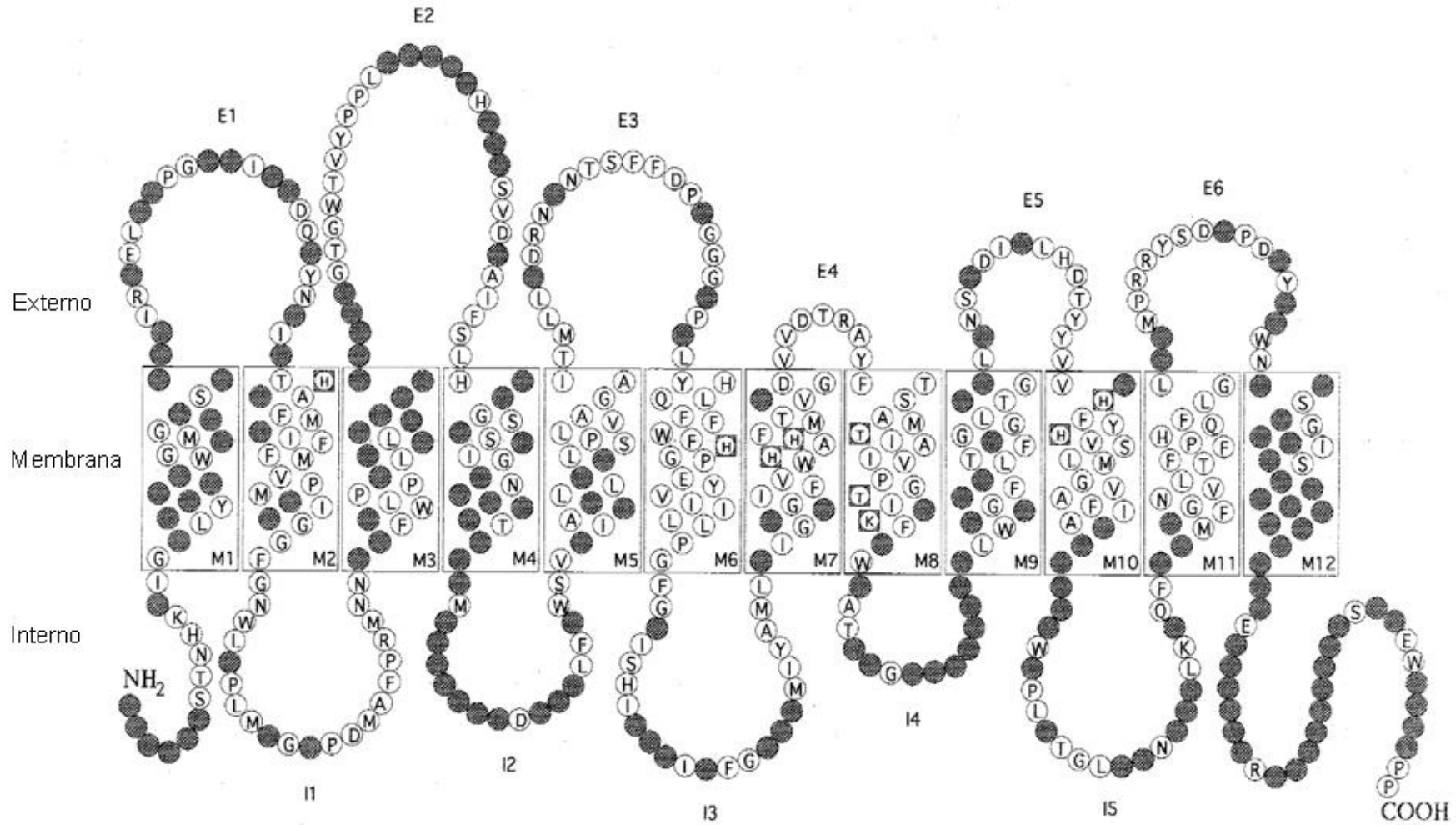


Figura 13. Modelo estrutural bidimensional da cadeia polipeptídica da subunidade I da citocromo *c* oxidase (COI) de insetos. Há 25 regiões estruturais: 12 hélices intra-membrana (M1–M12); seis alças (*loops*) externas (E1–E6); cinco alças internas (I1–I5); extremidades carboxi (COOH) e amino (NH₂) terminais. Os resíduos de aminoácidos inscritos em quadrados tem significância funcional especial e os círculos escuros hachurados representam os resíduos variáveis entre espécies de insetos. Modificado de Lunt *et al.*, 1996.

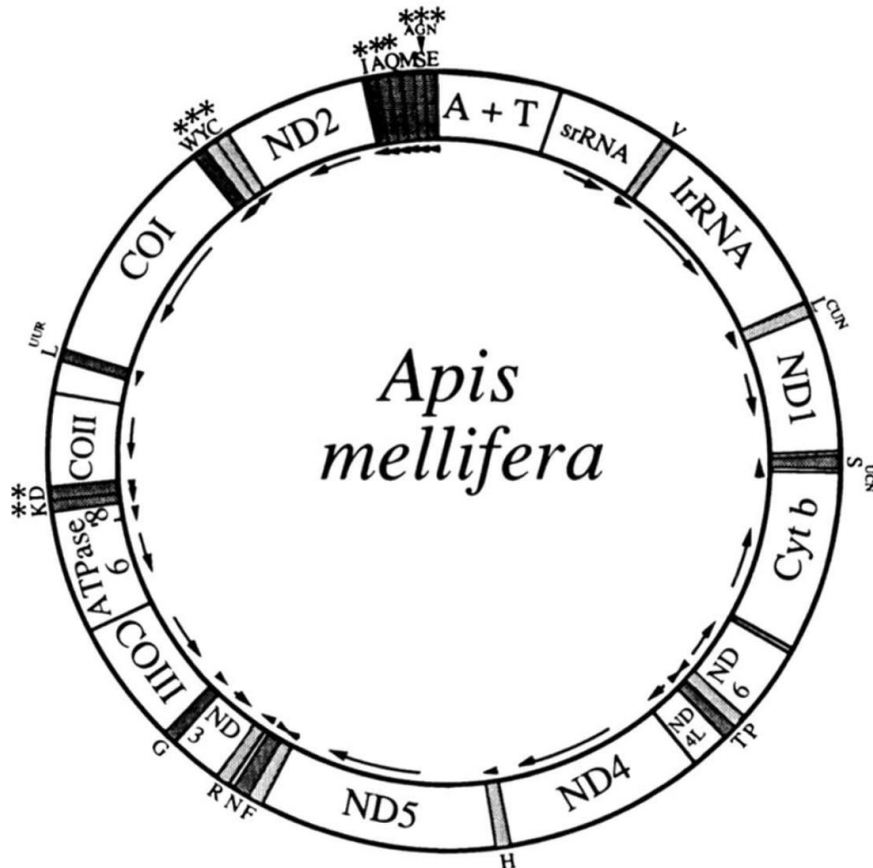


Figura 14. Mapa do genoma mitocondrial circular de *Apis mellifera*. Os genes codificadores das subunidades I, II e III da citocromo *c* oxidase estão indicados por COI, COII e COIII, respectivamente. A direção da transcrição para cada região codificadora é indicada pelas setas. Adaptado de Crozier e Crozier (1993).

O material processado em Guelph não passou por procedimentos de limpeza após a PCR. Neste caso, 2 μ L (20 – 50 ng) de produto da PCR foram utilizados na reação de sequenciamento que consiste de um ciclo de 1 min a 96°C, seguido de 30 ciclos de 10 s a 96°C, 5 s a 55°C e 4 min a 60°C. As seqüências foram analisadas em um sequenciador *ABI* (*Applied Biosystems*).

Quanto às amostras trabalhadas no LBEM/UFMG, o sucesso da PCR foi verificado através de eletroforese em gel de agarose (1%) utilizando-se 2 μ L de produto corados em *GelRed*. Os *amplicons* foram purificados por precipitação em PEG (20% polietilenoglicol 8000, 2,5 M NaCl) seguido de lavagens com etanol 80% e ressuspensos em água milliQ autoclavada.

Os produtos amplificados – aproximadamente 100 ng – foram transferidos para placas de sequenciamento de 96 poços. Cada placa foi preparada para a reação de sequenciamento (*amplicon* purificado + *primers* + água milliQ autoclavada + ET kit)

que consistiu de 25 ciclos de 95°C por 20 s, 50°C por 15 s e 60°C por 1 min. As sequências foram analisadas em sequenciador automático *MegaBACE* (Amersham Biosciences).

O sequenciamento de todas as amostras de *E. bidentata*, quatro das de *E. niveofasciata* (Ubajara, CE), uma de *E. bombiformis* e uma de *E. mixta* da Guiana Francesa, doadas pelo Dr. David Roubik e uma de *E. bombiformis* de Porto Velho, RO, foi realizado no sequenciador *ABI* do LBEM/UFMG. Neste caso, utilizou-se 2 µL de cada primer a 5 µM + 1 µL ddH₂O + 3 µL de produto de PCR precipitado (PEG) + 4 µL de Big Dye (5X) para a reação de sequenciamento que consistiu em um ciclo de 1 min a 96°C, seguido de 26 ciclos de 10 s a 96°C, 5 s a 50°C e 4 min a 60°C. Após a reação de sequenciamento, a placa foi precipitada e o material foi ressuspendido em *HiDi Formamide* (10 µL/poço). Em seguida, as sequências foram analisadas no sequenciador *ABI*.

3.3. Análise de dados

3.3.1. Alinhamento

As sequências consenso (ou *contigs*) foram obtidas a partir das sequências geradas com *primers* diretos e reversos, utilizando os programas Phred (Ewing *et al.*, 1998), Phrap (<http://www.phrap.org>) e Consed (Gordon *et al.*, 1998). Além destes programas, utilizou-se o ChromasPro v.1.7.4 para edição e análise das sequências.

Em alguns poucos casos, o *contig* foi gerado com sequências *Forward* obtidas pelo sequenciamento no *MEGABace* e pelo menos uma sequência (*Forward* ou *Reverse*) sequenciada no *ABI*. Consideraram-se somente os *contigs* que tinham pelo menos 500 pb e menos que 1% de posições ambíguas—condições de padrão de qualidade das sequências *barcode* (COI) adotadas pelo *Barcode of Life Data Systems* ou *BOLD Systems* (Ratnasingham e Hebert, 2007). No entanto, em alguns poucos casos, para as sequências de *E. bidentata*, considerou-se o máximo de 1,24% de posições ambíguas, pois caso contrário esta espécie não poderia ser incluída nas análises.

O alinhamento das matrizes de cada gene individual foi feito através do programa MUSCLE (Edgar, 2004), executado no programa MEGA v.5.10 (Tamura *et al.*, 2011), seguido de edição manual.

3.3.2. Seleção do modelo de evolução nucleotídica

Os programas MEGA v.5.10 e jModelTest v.0.1.1 (Posada, 2008) foram utilizados para selecionar o modelo de evolução nucleotídica que melhor se ajustava ao conjunto de dados, baseando-se no BIC (*Bayesian Information Criterion*). Neste caso, a análise foi feita primeiramente com os dados não particionados e, em seguida, com os dados particionados: sem as 1^a e 2^a posições do códon e, depois, sem a 3^a posição do códon. Este procedimento é importante pelo fato do código genético ser degenerado. Com isso, as alterações que ocorrem nas sequências de aminoácidos são menos frequentes do que aquelas consideradas silenciosas e, por isso, as mutações nas primeiras bases dos códons recebem maior peso do que as que ocorrem nas segundas bases do códon, que por sua vez recebem um peso maior do que aquelas que ocorrem na terceira base do códon.

3.3.3. Análises filogenéticas

As relações filogenéticas entre os haplótipos foram inferidas pelo método bayesiano. Para isso, duas espécies próximas filogeneticamente—*Euglossa (Euglossa) marianae* Nemésio, 2011 e *Euglossa (Euglossa) mixta* Friese, 1899—foram utilizadas como grupo externo de “*E. crassipunctata*”. Para as análises dos dois pares *E. marianae*/*E. bidentata* e *E. calycina*/*E. mixta* utilizou-se como grupo externo “*Euglossa (Glossurella) crassipunctata*” Moure, 1968 e *Euglossa (Glossurella) parvula* Dressler, 1982c. No caso do par *Eulaema niveofasciata*/*Eulaema bombiformis* o grupo externo foi constituído por *Eufriesea zhangi* Nemésio e Santos Júnior, 2013 e *Eulaema (Apeulaema) nigrita* Lepeletier, 1841.

Uma análise incluindo amostras das espécies do grupo *analis* (*E. calycina*, *E. mixta*, *E. botocuda*, *E. iopyrrha*, *E. marianae* e *E. bidentata*) e do grupo externo (*E. crassipunctata* e *E. parvula*) foi conduzida de forma a testar a hipótese de monofilia destas espécies e a relação entre elas dentro do grupo.

Dois arquivos (dados não-particionados e particionados) no formato NEXUS foram preparados para realizar a análise no MrBayes v.3.2.1. (Huelsenbeck e Ronquist, 2001; Ronquist e Huelsenbeck, 2003). Durante cada análise, duas corridas compostas por quatro cadeias (Cadeia de Markov Monte Carlo - MCMC - Altekar *et al.*, 2004) correram simultaneamente por 10.000.000 gerações, com amostragem a cada 1.000 gerações. As primeiras 2.500 árvores (25%) foram descartadas como *burn-in*. Foram

checadas a estacionariedade das cadeias, a convergência das corridas e o tamanho efetivo das amostras (*ESS*) dos parâmetros no TRACER v.1.5. O valor de probabilidade posterior (PP) dos clados e os comprimentos dos ramos foram obtidos pelo consenso de maioria das árvores amostradas na fase estacionária das cadeias, com a exclusão do *burn-in*.

Depois de concluídas as análises para os dois conjuntos de dados, calculou-se o Fator Bayesiano (B_{10}) pela diferença entre as médias harmônicas das duas análises. Em consulta à tabela apresentada em Nylander *et al.* (2004), verificou-se qual análise (dados particionados *vs* dados não-particionados) deveria ser adotada para cada conjunto de dados. As árvores geradas a partir das análises foram visualizadas e editadas no programa FigTree v.1.3.1 (Rambaut, 2009).

3.3.4. Análises populacionais

O modelo de evolução nucleotídica Kimura 2-parâmetros (K2p) (Kimura, 1980) tem recebido críticas por alguns que o consideram inapropriado para distinguir sequências *barcoding* curtas e de espécies proximamente aparentadas (Meier *et al.*, 2008; Srivathsan e Meier, 2012; Tänzler *et al.*, 2012). Alguns argumentam a favor do uso do modelo *p-distance* nestes casos (Srivathsan e Meier, 2012). Por isso, optou-se pelo uso dos dois modelos, realizados no programa MEGA, para a estimativa de divergência genética entre os grupos.

O programa *Geneland* foi utilizado para estimar o número de populações e a localização de seus limites geográficos, com os cálculos realizados através da Cadeia de Markov Monte Carlo (Guillot *et al.*, 2005; Guillot *et al.*, 2008; Guillot, 2008). Duas simulações foram feitas: a primeira utilizou um modelo espacial não correlacionado à frequência de haplótipos (MENCFH) e a segunda utilizou um modelo espacial correlacionado à frequência de haplótipos (MECFH). As populações definidas pelo *Geneland* foram utilizadas nas análises populacionais no programa Arlequin v.3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) para estimar as diferenças genéticas entre as populações e grupos através de Análise da Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), com o método de distância de Tamura e Nei e 10.100 permutações. Além disso, foram calculados os seguintes parâmetros: diversidade de haplótipos (h), diversidade de nucleotídeos (π), número de sítios com substituições (S), composição de nucleotídeos e cálculo da estatística-F sobre as frequências de haplótipos. A história demográfica dos

grupos foi testada usando os testes de neutralidade seletiva de D de Tajima (Tajima, 1989) e F_s de F_u (Fu, 1997), que quando apresentam valores negativos significantes podem indicar expansão populacional (*e.g.* após o efeito gargalo).

O programa DnaSP v.5 (Rozas *et al.*, 2003) foi utilizado para determinar a lista de haplótipos e verificar (i) a quantidade de sítios parcimônio-informativos (sítios que tem o mínimo de dois nucleotídeos e que estão presentes pelo menos duas vezes); (ii) sítios não-informativos ou autapomórficos dos espécimes (*singletons*); (iii) substituições sinônimas (sem mudança de aminoácido) e (iv) substituições não-sinônimas (com mudança de aminoácido). Como não há evidências de diferenças entre os códigos genéticos de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae: Apini) e *Drosophila yakuba* (Diptera: Drosophilidae) (Clary e Wolstenholme, 1985; Crozier *et al.*, 1989), adotou-se a tabela do código genético para DNA mitocondrial de *Drosophila* presente no programa MEGA v.5.10 para fazer a correspondência entre os códon e os aminoácidos deste estudo.

O algoritmo *Median-Joining* (MJ) (Bandelt *et al.*, 1999), disponível no programa *NETWORK* v.4.6.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>), foi utilizado para identificar os principais haplogrupos. Este programa utiliza uma matriz de distância euclidiana entre as sequências para obter uma rede de haplótipos com menor distância total. Quando posições ambíguas foram detectadas nas sequências, optou-se por excluí-las das análises no *NETWORK*, assim como está sugerido no manual deste programa. O cálculo da AMOVA, dos parâmetros de diversidade genética e os testes de neutralidade também foram feitos com os haplogrupos definidos no *NETWORK*. A AMOVA foi calculada também entre os grupos da Mata Atlântica e Amazônia para cada espécie ou par de espécies deste estudo.

4. Resultados

4.1. “*Euglossa crassipunctata*”

Do total de 117 indivíduos desta espécie disponíveis para estudo, não foi possível obter o DNA de sete e, entre as demais, 12 apresentaram sequências pequenas ou de baixa qualidade. Dos 98 indivíduos empregados, foi possível obter uma sequência de 579 pb do gene COI, dos quais 38 sítios (6,6%) apresentaram polimorfismos (Tab. 4), 34 foram parcimônio-informativos e quatro foram autapomórficos. Estas sequências

não apresentaram *indels*, nem códons de parada e as substituições ocorreram sempre na 3ª posição do códon. Isto sugere que as sequências não são contaminantes nucleares ou NUMTs (Cristiano *et al.*, 2012).

Para este conjunto de dados foram identificados 24 haplótipos (Tab. 4 e 5) a partir de 42 substituições (27 transições e 15 transversões), das quais 41 são sinônimas e uma é não sinônima. A composição nucleotídica total encontrada é de T = 48,19%, C = 12,14%, A = 29,35% e G = 10,32%. A diversidade nucleotídica para todo o conjunto de dados (π) é de $0,008256 \pm 0,004508$ e a diversidade haplotípica (Hd) é $0,7294 \pm 0,0482$ (Tab. 6). Nota-se que as localidades da Mata Atlântica possuem, de forma geral, uma diversidade haplotípica alta e uma diversidade nucleotídica baixa, indicando que os haplótipos de cada localidade são proximamente relacionados (Tab. 5).

Tabela 5. Número de machos (n) e haplótipos de “*Euglossa crassipunctata*” das 13 localidades amostradas. Haplótipos destacados em negrito são haplótipos de cópia única. Para cada localidade, Hd = diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica. (σ = desvio-padrão; n/a = não se aplica)

Localidade	n	Haplótipo	$Hd \pm \sigma$	$\pi \pm \sigma$
Camacan, BA	13	H1(10), H2(1), H4(1), H17(1)	0,4231 \pm 0,1645	0,001341 \pm 0,001173
Conceição da Barra, ES	13	H1(10), H2(2), H3(1)	0,4103 \pm 0,1539	0,000758 \pm 0,000813
Igrapiúna, BA	9	H1(6), H4(1), H5(1), H21(1)	0,5833 \pm 0,1833	0,001547 \pm 0,001342
Itamaraju, BA	7	H1(5), H2(1), H4(1)	0,5238 \pm 0,2086	0,000994 \pm 0,001036
Linhares, ES	4	H1(1), H17(2), H22(1)	0,8333 \pm 0,2224	0,004086 \pm 0,003322
Murici, AL	10	H9(6), H10(1) , H11(2), H12(1)	0,6444 \pm 0,1518	0,002125 \pm 0,001660
Oriximiná, PA	6	H7(5), H8(1)	0,3333 \pm 0,2152	0,003502 \pm 0,002629
Porto Seguro, BA	1	H2(1)	n/a	n/a
São Gonçalo do Rio Abaixo, MG	2	H1(1), H6(1)	1,0000 \pm 0,5000	0,007004 \pm 0,007823
Sooretama, ES	11	H1(5), H13(2), H14(1) , H15(1) , H16(1) , H17(1)	0,8000 \pm 0,1138	0,004065 \pm 0,002706
Una, BA	10	H1(7), H2(1), H4(1), H5(1)	0,5333 \pm 0,1801	0,001043 \pm 0,001019
Uruçuca, BA	10	H1(5), H4(1), H5(1), H18(1) , H19(1) , H20(1)	0,7778 \pm 0,1374	0,002013 \pm 0,001596
Boca Tapada, Costa Rica	2	H23(1) , H24(1)	1,0000 \pm 0,5000	0,001738 \pm 0,002455
Total de espécimes	98			

A diferença entre as médias harmônicas dos valores de verossimilhança das análises com dados não-particionados (modelo: HKY+I) e particionados (modelo para 1ª e 2ª posições do códon: HKY; modelo para 3ª posição do códon: HKY+ Γ) é de 66,83, o que sugere uma melhor adequação dos dados particionados neste caso.

A dicotomia basal da árvore de consenso obtida através da inferência bayesiana (Figura 15) entre os terminais de *E. crassipunctata* sugere a ocorrência de um evento vicariante que teria separado a população ancestral em duas outras, o clado da Costa Rica (PP = 0,99) e outro que inclui os indivíduos da Amazônia e da Mata Atlântica. Em seguida, outro evento vicariante teria separado a população ancestral deste segundo clado em duas linhagens: a primeira, com representantes da Amazônia, e, outra, da Mata Atlântica, ambas recebendo alto suporte (PP = 1). Estes três cladogramas coincidem geograficamente, com as espécies reconhecidas recentemente por Nemésio e Engel (2012)—*E. crassipunctata s. strito* para as populações da América Central, *E. moratoi* para as populações da Amazônia e *E. clausi* para as populações da Mata Atlântica. Há estruturação dentro de *E. moratoi*, apesar de todos os indivíduos serem provenientes de Oriximiná, PA. *Euglossa clausi*, por outro lado, é representada por uma grande politomia, dentro da qual há um ramo bem suportado (PP = 0,95), formado pelos indivíduos de Murici, AL.

A divergência genética média entre as espécies do grupo *crassipunctata* apresentaram resultados muito próximos pelos dois modelos: entre *E. clausi* e *E. moratoi* há uma divergência de 2,6% (S.E. = 0,007) pelo K2p e, de 2,5% (S.E. = 0,006), pelo *p-distance* (Tab. 35 e 36); entre *E. moratoi* e *E. crassipunctata s. str.*, K2p e *p-distance* resultaram em 3,6% (S.E. = 0,009) de divergência e para a comparação entre *E. clausi* e *E. crassipunctata s. str.*, K2p é de 3,9% (S.E. = 0,009) e *p-distance* é de 3,8% (S.E. = 0,008). A divergência entre o clado de *E. clausi* de Murici e o restante dos indivíduos de *E. clausi* é baixa (K2p e *p-distance*: 1,1%; S.E. = 0,004) se comparada à divergência entre o clado de Murici e *E. moratoi* (K2p e *p-distance*: 3%; S.E. = 0,007) e entre o clado de Murici e *E. crassipunctata s. str.* (K2p e *p-distance*: 4%; S.E. = 0,009). Quanto às distâncias médias dentro de cada grupo, os valores calculados pelos dois modelos também apresentaram resultados semelhantes (Tab. 37). Para *E. crassipunctata s. str.* este valor é de 0%, para *E. moratoi* é de 0,2808% (S.E. = 0,0014), para *E. clausi* é de 0,3646% (S.E. = 0,0013) e para o clado de Murici de *E. clausi* é de 0,2% (S.E. = 0,001).

Na rede de haplótipos verifica-se também a presença de três grupos bem divergentes ($F_{st} = 0,93637$; $P = 0,0000$), com 85,27% da variação presente entre eles (Fig. 16 e Tab. 10): **G1**, formado pelos haplótipos da Mata Atlântica (H1-H6, H9-H22); **G2**, formado pelos haplótipos da Amazônia (H7 e H8); e **G3**, formado pelos haplótipos da América Central (H23 e H24). A estatística F_s de Fu (-8,63589; $P = 0,00400$) indica que as sequências do G1 não evoluem de forma neutra e o D de Tajima (-1,36732; $P = 0,04800$) indica o mesmo para as sequências dos indivíduos de G2 (Tab. 7). Os haplótipos mais frequentes são o H1 ($n = 50$), presente em nove localidades da Mata Atlântica [excetuando Porto Seguro (BA) e Murici (AL)], seguido de H2 ($n = 6$) presente na Bahia e Espírito Santo e H9, também com seis indivíduos, todos de Murici (AL) (Tab. 5).

Os agrupamentos formados nas duas simulações do *Geneland* podem ser visualizados nas Figuras 17 e 18. Na simulação MENCFFH, o número mais provável de populações é quatro ($K = 4$) [**G1**: Oriximiná, PA; **G2**: Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais; **G3**: Murici, AL e **G4**: Costa Rica (Fig. 17)] e uma grande estruturação genética é verificada entre estes grupos ($F_{st} = 0,90847$; $P = 0,0000$), com 89,87% da variação presente entre eles (Tab. 8). A estatística F_s de Fu (-11,39440; $P = 0,00000$) indica que as sequências dos indivíduos de G2 não evoluem de forma neutra (Tab. 7).

Pela simulação MECFFH, o número de populações mais provável é cinco ($K = 5$): **G1**: Oriximiná, PA; **G2**: Minas Gerais e parte do Espírito Santo (Linhares e Sooretama); **G3**: norte do Espírito Santo (Conceição da Barra) e Bahia; **G4**: Costa Rica e **G5**: Murici, AL (Fig. 18). Estes grupos apresentam-se bem estruturados, com $F_{st} = 0,85655$ ($P = 0,0000$) e 85,99% da variação presente entre os grupos (Tab. 9). As estatísticas D de Tajima (-1,81350; $P = 0,01400$) e F_s de Fu (-6,86436; $P = 0,00000$) indicam que as sequências dos indivíduos de G3 não evoluem de forma neutra (Tab. 7).

Na comparação entre os grupos da Amazônia e Mata Atlântica, a AMOVA também indica estruturação genética ($F_{st} = 0,93207$; $P = 0,0000$), com 84,28% da variação presente entre os grupos (Tab. 11).

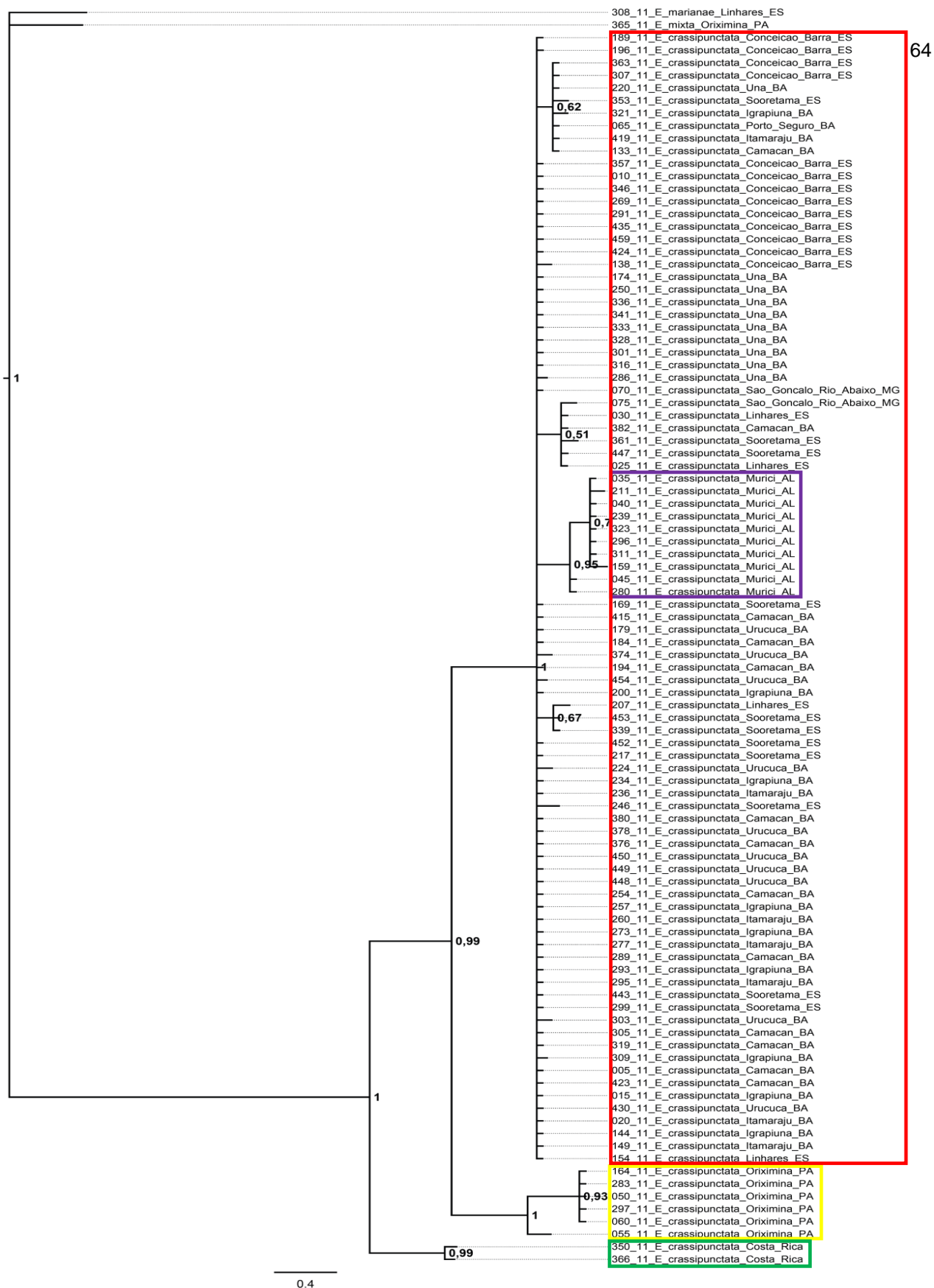


Figura 15. Filograma da árvore de consenso resultante da inferência Bayesiana para 579 pb do COI de “*Euglossa crassipunctata*” e duas espécies do grupo externo (*Euglossa marianae* e *Euglossa mixta*). Os valores de probabilidade posterior são apresentados nos nós da árvore. As cores destacam cada clado: *E. crassipunctata* s. *stricto* (América Central) em verde, *E. moratoi* (Amazônia) em amarelo e *E. clausi* (Mata Atlântica) em vermelho. O clado de Murici, AL, destaca-se como um subgrupo de *E. clausi* em roxo

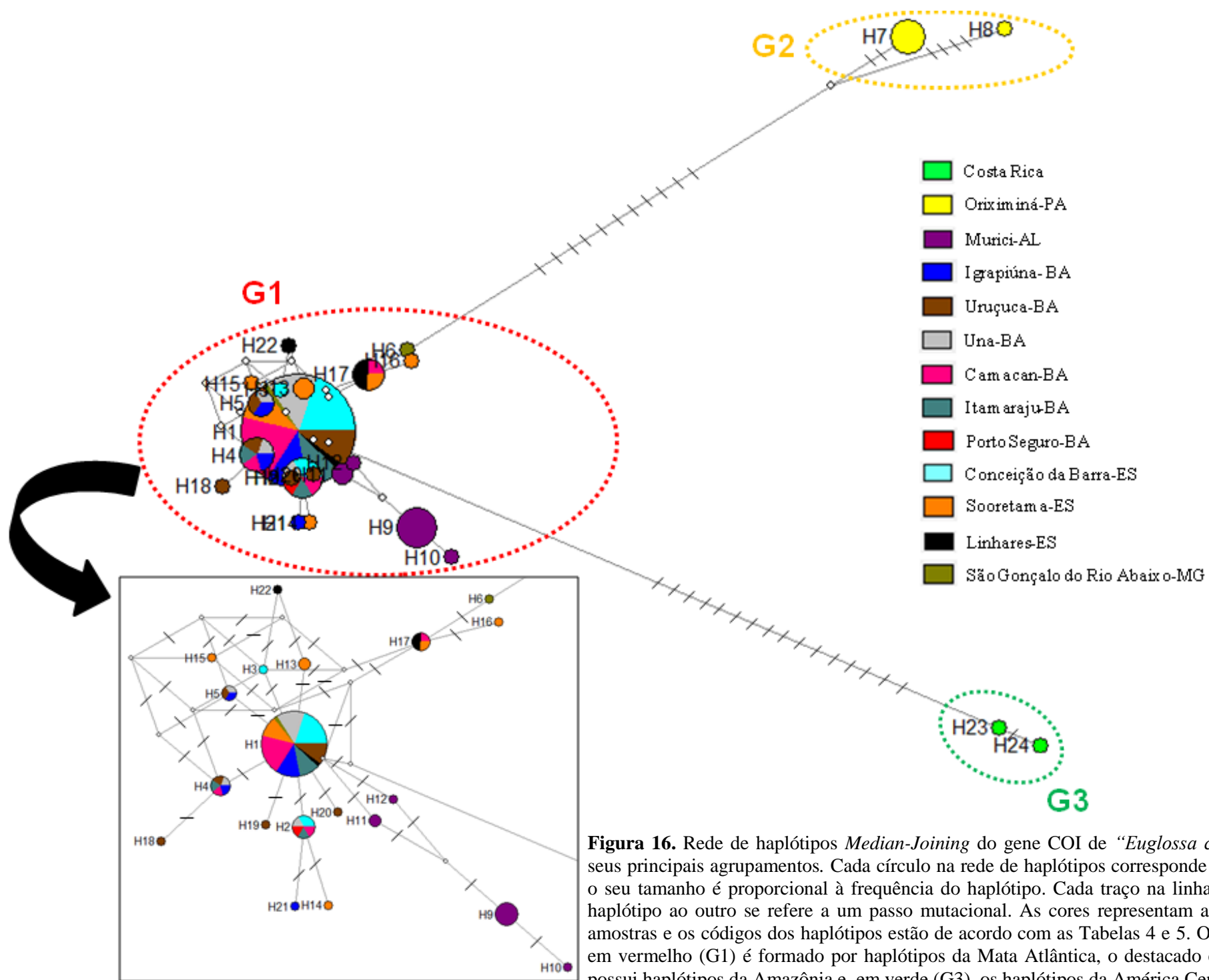


Figura 16. Rede de haplótipos *Median-Joining* do gene COI de “*Euglossa crassipunctata*” e seus principais agrupamentos. Cada círculo na rede de haplótipos corresponde a um haplótipo e o seu tamanho é proporcional à frequência do haplótipo. Cada traço na linha que conecta um haplótipo ao outro se refere a um passo mutacional. As cores representam as localidades das amostras e os códigos dos haplótipos estão de acordo com as Tabelas 4 e 5. O grupo destacado em vermelho (G1) é formado por haplótipos da Mata Atlântica, o destacado em amarelo (G2) possui haplótipos da Amazônia e, em verde (G3), os haplótipos da América Central.

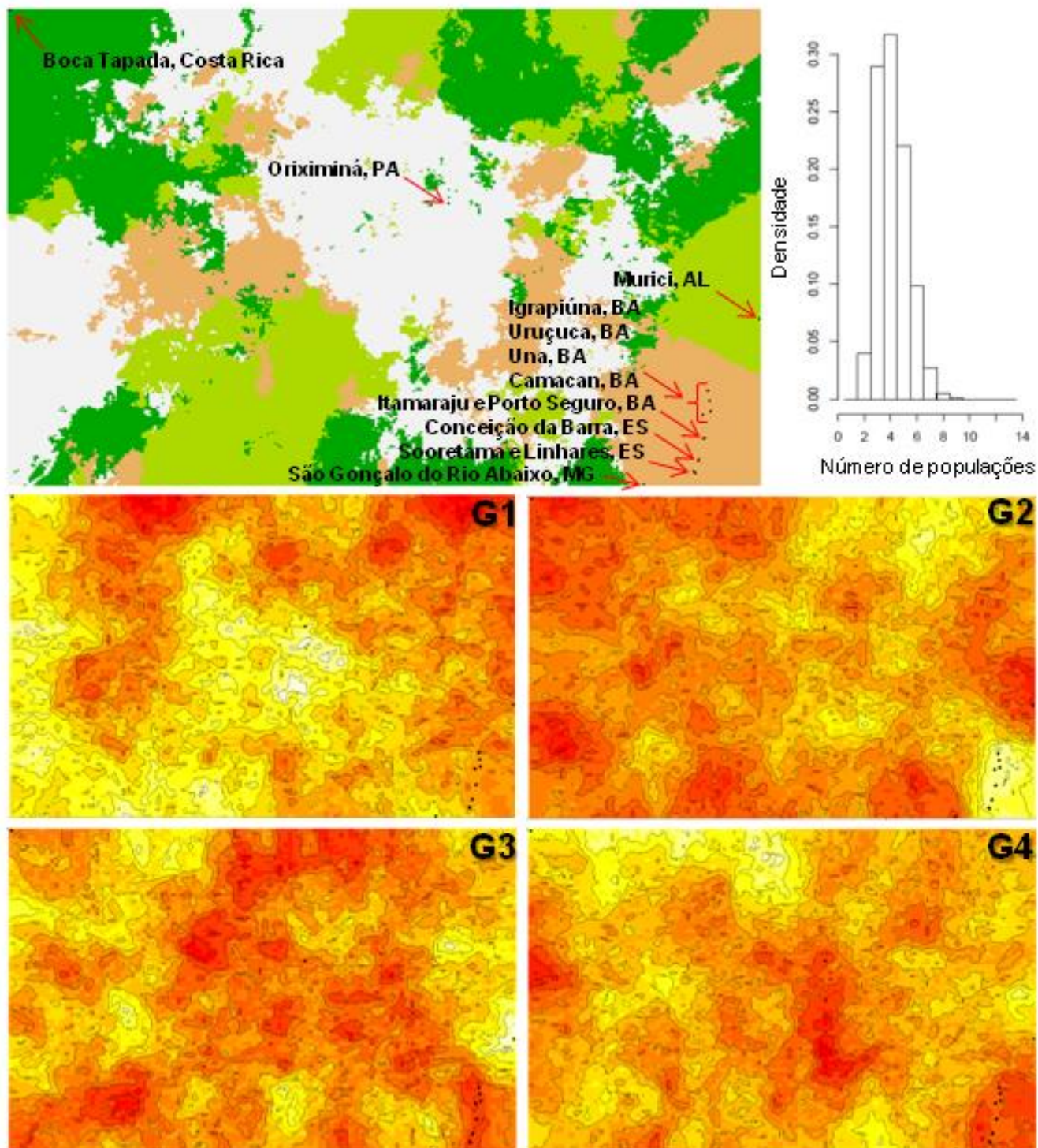


Figura 17. Mapas de probabilidade posterior de designação de quatro diferentes populações [G1: PA; G2: BA + ES + MG; G3: AL; G4: Costa Rica] pelo modelo espacial não correlacionado à frequência dos haplótipos implementado no Geneland para *Euglossa crassipunctata*. Nas quatro figuras inferiores os eixos horizontais e verticais representam as coordenadas longitudinais e latitudinais, respectivamente, e os pontos pretos representam as localidades amostradas, conforme apontado no mapa superior à esquerda. A cor branca indica maiores valores de probabilidade e, na medida em que a cor se aproxima do vermelho, a probabilidade decresce. O gráfico acima à direita representa o número mais provável de populações ($K = 4$) após a simulação MCMC.

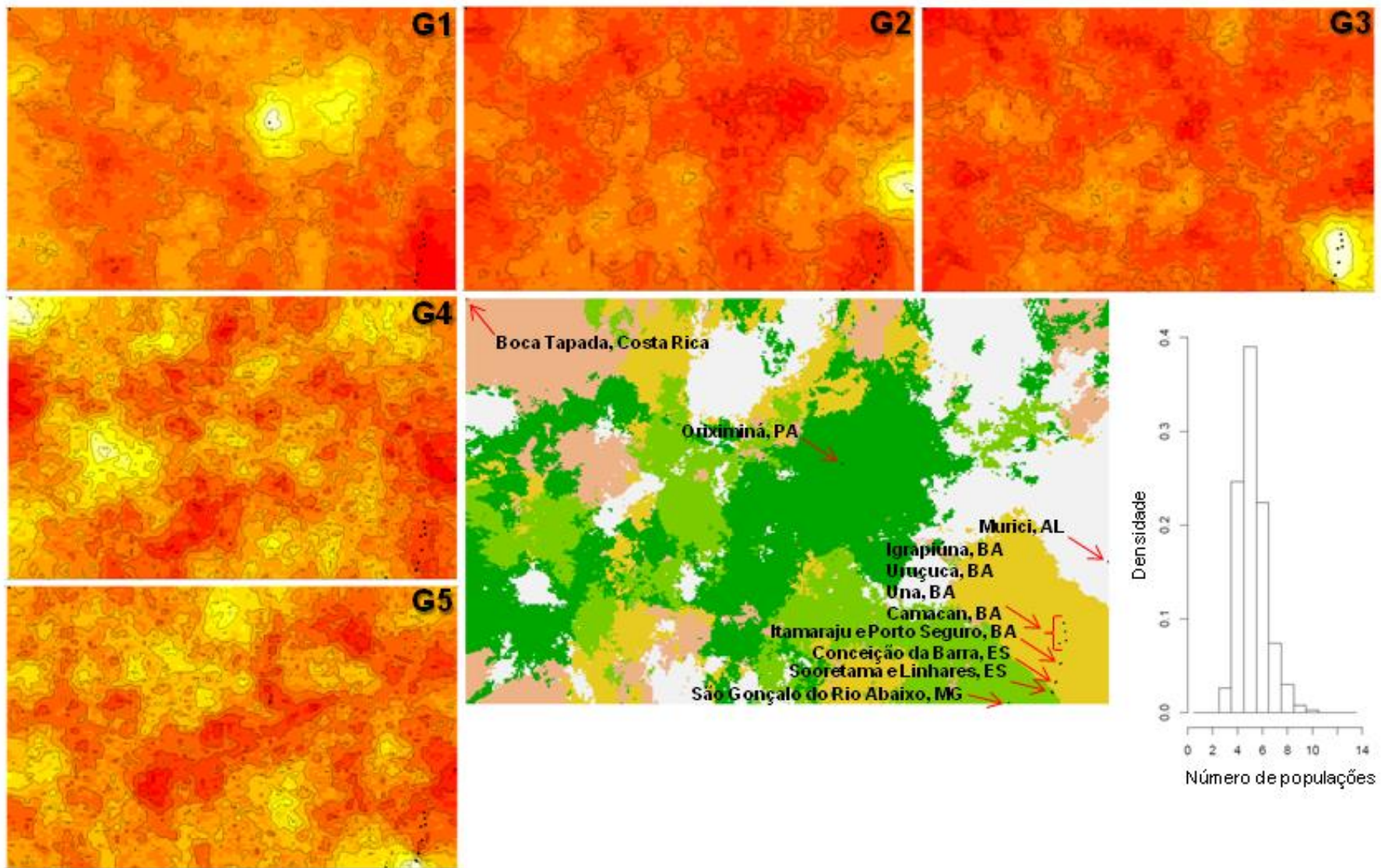


Figura 18. Mapas de probabilidade posterior de designação de cinco diferentes populações [G1: PA; G2: AL; G3: ES (Conceição da Barra) + BA; G4: Costa Rica; G5: MG + ES (Linhares e Sooretama)] pelo modelo espacial correlacionado à frequência dos haplótipos implementado no *Geneland* para “*Euglossa crassipunctata*”. Nas três figuras superiores e nas duas à esquerda os eixos horizontais e verticais representam as coordenadas longitudinais e latitudinais, respectivamente, e os pontos pretos representam as localidades amostradas, conforme apontado no mapa inferior central. A cor branca indica maiores valores de probabilidade e, na medida em que a cor se aproxima do vermelho, a probabilidade decresce. O gráfico inferior à direita representa o número mais provável de populações ($K = 5$) após a simulação MCMC.

Tabela 6. Índices de diversidade para os grupos de “*Euglossa crassipunctata*”: n = número de indivíduos, *H* = número de haplótipos, *Hd* = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica, *S* = número de sítios polimórficos. (σ = desvio-padrão; G = grupo)

Grupo	n	<i>H</i>	<i>Hd</i> ± σ	π ± σ	<i>S</i>
Simulação MENC FH					
(Geneland): 4 grupos					
G1: PA	6	2	0,3333 ± 0,2152	0,003502 ± 0,002629	6
G2: BA, ES, MG	80	16	0,6013 ± 0,0634	0,002055 ± 0,001476	12
G3: AL	10	4	0,6444 ± 0,1518	0,002125 ± 0,001660	4
G4: Costa Rica	2	2	1,0000 ± 0,5000	0,001738 ± 0,002455	1
Simulação MEC FH					
(Geneland): 5 grupos					
G1: PA	6	2	0,3333 ± 0,2152	0,003502 ± 0,002629	6
G2: AL	10	4	0,6444 ± 0,1518	0,002125 ± 0,001660	4
G3: norte ES, BA	63	10	0,5233 ± 0,0734	0,001247 ± 0,001049	10
G4: Costa Rica	2	2	1,0000 ± 0,5000	0,001738 ± 0,002455	1
G5: MG e ES (parte)	17	8	0,8162 ± 0,0815	0,004103 ± 0,002630	9
NETWORK: 3 grupos					
G1: BA, ES, MG, AL	90	20	0,6814 ± 0,0544	0,004198 ± 0,002546	17
G2: PA	6	2	0,3333 ± 0,2152	0,003502 ± 0,002629	6
G3: Costa Rica	2	2	1,0000 ± 0,5000	0,001738 ± 0,002455	1
TOTAL	98	24	0,7294 ± 0,0482	0,008256 ± 0,004508	38

Tabela 7. Testes de neutralidade seletiva para os grupos de “*Euglossa crassipunctata*”: *D*, teste de Tajima e F_s , teste de Fu. s: número de transições; v: número de transversões; Subst.: número de substituições.

Grupo	Teste de neutralidade		s	v	Subst.
	<i>D</i>	F_s de Fu			
Simulação MENCFH					
(Geneland): 4 grupos					
G1: PA	-1,36732 (P: 0,04500)*	2,99573 (P: 0,91900)	5	1	6
G2: BA, ES, MG	-1,39764 (P: 0,05700)	-11,39440 (P: 0,00000)**	12	1	13
G3: AL	-0,52059 (P: 0,32100)	-0,45855 (P: 0,27800)	4	0	4
G4: Costa Rica	0,00000 (P: 1,0000)	0,00000 (P: 0,25800)	1	0	1
Simulação MECFH					
(Geneland): 5 grupos					
G1: PA	-1,36732 (P: 0,05500)	2,99573 (P: 0,90400)	5	1	6
G2: AL	-0,52059 (P: 0,32000)	-0,45855 (P: 0,26200)	4	0	4
G3: norte ES, BA	-1,81350 (P: 0,01400)*	-6,86436 (P: 0,00000)**	10	0	10
G4: Costa Rica	0,00000 (P: 1,0000)	0,00000 (P: 0,27900)	1	0	1
G5: MG e ES (parte)	-0,39875 (P: 0,39100)	-2,07065 (P: 0,07800)	8	1	9
NETWORK: 3 grupos					
G1: BA, ES, MG, AL	-0,79087 (P: 0,25000)	-8,63589 (P: 0,00400)**	17	1	18
G2: PA	-1,36732 (P: 0,04800)*	2,99573 (P: 0,91300)	5	1	6
G3: Costa Rica	0,00000 (P: 1,0000)	0,00000 (P: 0,25900)	1	0	1
TOTAL	-1,09874 (P: 0,14100)	-5,06550 (P: 0,08400)	27	15	42

** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$

Tabela 8. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (PA), G2 (BA, ES e MG), G3 (AL) e G4 (Costa Rica) definidos na simulação MENCFFH/Geneland como grupos e as localidades de coleta como populações de “*Euglossa crassipunctata*”.

Fonte de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	89,87
Entre populações dentro dos grupos	0,97
Dentro das populações	9,15
$F_{st} = 0,90847$; $p = 0,0000 \pm 0,0000$	

Tabela 9. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (PA), G2 (AL), G3 (norte ES e BA), G4 (Costa Rica) e G5 (MG e parte ES) definidos na simulação MECFFH/Geneland como grupos e as localidades de coleta como populações de “*Euglossa crassipunctata*”.

Fonte de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	85,99
Entre populações dentro dos grupos	-0,34
Dentro das populações	14,34
$F_{st} = 0,85655$; $p = 0,0000 \pm 0,0000$	

Tabela 10. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (BA, ES, MG e AL), G2 (PA) e G3 (Costa Rica) definidos pelo NETWORK como grupos e as localidades de coleta como populações de “*Euglossa crassipunctata*”.

Fonte de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	85,27
Entre populações dentro dos grupos	8,37
Dentro das populações	6,36
$F_{st} = 0,93637$; $p = 0,0000 \pm 0,0000$	

Tabela 11. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (Amazônia) e G2 (Mata Atlântica) como grupos e as localidades de coleta como populações de “*Euglossa crassipunctata*”.

Fonte de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	84,28
Entre populações dentro dos grupos	8,93
Dentro das populações	6,79
$F_{st} = 0,93207$; $p = 0,0000 \pm 0,0000$	

4.2. Grupo *analis*

Um total de 147 amostras foi incluído na análise filogenética das espécies estudadas no grupo *analis*: 45 *E. marianae*, 9 *E. bidentata*, 17 *E. calycina*, 34 *E. mixta*, 39 *E. botocuda*, 1 *E. iopyrrha*, além de duas do grupo externo ("*E. crassipunctata*" e *E. parvula*).

A diferença entre as médias harmônicas dos valores de verossimilhança das análises com dados não-particionados (modelo: GTR+ Γ) e particionados (modelo para 1ª e 2ª posições do códon: HKY; modelo para 3ª posição do códon: HKY) é de 105,79, o que sugere uma melhor adequação dos dados particionados neste caso.

A dicotomia basal da árvore de consenso (excluindo o grupo externo) (Fig. 19) sugere um evento vicariante que teria separado a população ancestral em duas outras, *E. calycina* (Mata Atlântica) e a espécie ancestral das demais espécies do grupo *analis*. Há bom suporte à monofilia de *E. calycina* (PP = 1), porém a filogenia obtida não dá suporte à hipótese de Faria e Melo (2012) de que *E. calycina* e *E. mixta* seriam espécies irmãs. De fato, o resultado obtido sugere que não haja uma espécie irmã atual de *E. calycina*. Além disso, a relação entre o restante das espécies do segundo grupo não pôde ser resolvida. Os resultados sugerem que o que tem sido considerado como "*E. mixta*" talvez constitua um complexo de espécies, com dois clados que recebem grande suporte, um com as populações da Amazônia e outro com as de Honduras. No entanto, um indivíduo de Honduras e dois de Belize aparecem em uma politomia juntamente com indivíduos de *E. marianae*.

Portanto, a árvore do gene COI sugere relações diferentes daquelas supostas anteriormente. Entretanto, considerando a baixa resolução do cladograma obtido (Fig. 19), o fato de que apenas metade das espécies do grupo foi incluída nesta análise, e que a filogenia obtida representa a filogenia do gene COI, não necessariamente coincidente com a filogenia das espécies (Edwards e Beerli, 2000), procedeu-se à análise dos dois pares de espécies seguintes, conforme as hipóteses de relacionamento sugeridas previamente na literatura (Faria e Melo, 2012):

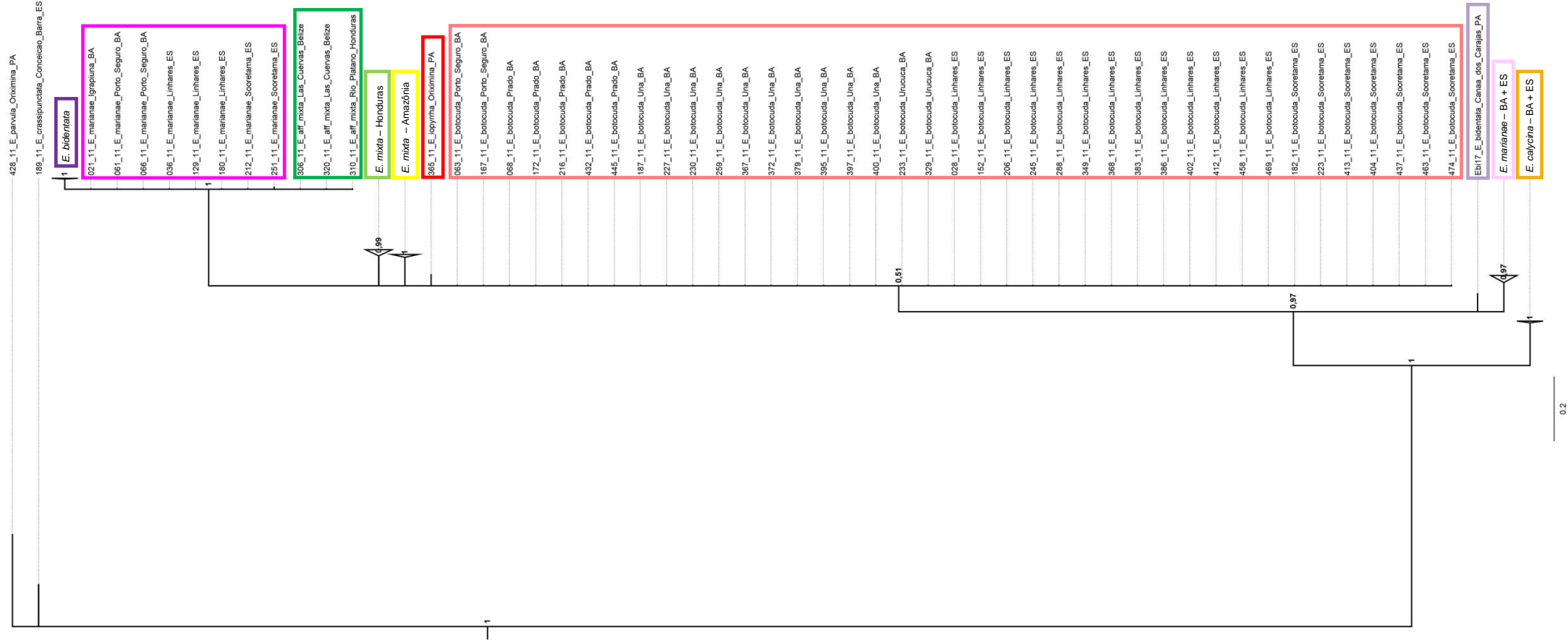


Figura 19. Filograma da árvore de consenso resultante da inferência Bayesiana para 503 pb do COI do grupo *analis* e duas espécies do grupo externo, “*Euglossa crassipunctata*” e *Euglossa parvula*. Os valores de probabilidade posterior são apresentados nos nós da árvore. As cores destacam cada clado: *E. calycina* em laranja, *E. marianae* (parte 2) em rosa claro, *E. bidentata* (indivíduo Ebi17) em lilás, *E. botocuda* em vermelho claro, *E. iopyrrha* em vermelho escuro, *E. mixta* (Amazônia) em amarelo, *E. mixta* (Honduras) em verde claro, *E. mixta* (Honduras + Belize) em verde escuro, *E. marianae* (parte 1) em rosa escuro, *E. bidentata* (restante dos indivíduos) em roxo.

4.2.1. Par *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae*

Do total de 73 amostras de *E. marianae*, foram utilizadas apenas 45, já que não foi possível obter o DNA de 10 espécimes e 18 apresentaram sequências pequenas ou de baixa qualidade. De *E. bidentata*, foram utilizadas 10 amostras do total de 18 obtidas, porque oito foram excluídas das análises por apresentarem sequências de baixa qualidade. Portanto, foram considerados nas análises 55 indivíduos das duas espécies, dos quais foi possível obter sequências de 532 pb do gene COI, com 16 (3%) sítios polimórficos (Tab. 12). Destes sítios, 12 foram parcimônio-informativos e quatro *singletons*. Os sítios com posições ambíguas (dados faltantes) são também apresentados na Tabela 12. Estas sequências não apresentaram *indels*, nem códon de parada e as substituições ocorreram na maioria das vezes (79%) na 3^a posição dos seus códon. Estes fatos aumentam a confiança em que as sequências não sejam contaminantes nucleares (Cristiano *et al.*, 2012).

Um total de 13 haplótipos foi definido para este conjunto de dados. Quando incluídos os sítios com posições ambíguas, identificou-se um total de 22 haplótipos (Tab. 12 e 13). Nestes haplótipos, observaram-se 35 substituições (22 transições e 13 transversões), das quais 26 foram sinônimas e, nove, não sinônimas. A composição nucleotídica total encontrada é de T = 47,12%, C = 11,63%, A = 31,60% e G = 9,65%. A diversidade nucleotídica (π) para todo o conjunto de dados é de $0,019336 \pm 0,009945$ e a diversidade haplotípica (Hd) é $0,8855 \pm 0,0191$ (Tab. 14). Nota-se que as localidades da Mata Atlântica possuem, de forma geral, uma diversidade haplotípica alta e uma diversidade nucleotídica baixa, indicando que os haplótipos são proximamente relacionados (Tab. 13).

Tabela 12. Lista de haplótipos do gene COI de *Euglossa bidentata* (H1 a H8) e *Euglossa marianae* (H9 a H22) com 16 sítios polimórficos. Os outros 17 sítios que apresentam ambiguidade (indicada por “?”) são também apresentados. Os pontos (.) indicam igualdade com o haplótipo 1.

Haplótipo	Sítios polimórficos																																	
	3	39	81	93	98	100	114	123	133	159	174	180	201	210	216	222	228	237	270	284	303	315	345	396	410	430	455	459	474	477	483	489	498	
H1	A	T	A	T	C	T	G	A	C	C	A	T	A	A	?	G	C	T	A	T	T	A	A	G	A	?	A	A	A	G	A	A	C	
H2	.	.	.	?	?	.	.	.	?	G	?	T
H3	.	.	.	?	?	?	?	T
H4	.	.	.	?	?	.	.	.	?	?	.	?	?	T
H5	.	.	.	?	?	G	?	?
H6	.	C	.	A	T	C	A	T	A	T	A	A	T	.	T	C	A	T	.	.	G	C	T	.	G	A	.	.	T	
H7	.	.	.	G	?	.	.	.	?	?	.	?	?	T
H8	.	.	.	?	?	.	.	.	?	?	?	T
H9	G	.	G	A	T	C	A	T	A	T	T	.	.	.	A	A	T	.	T	C	A	T	.	A	G	C	T	T	.	A	G	C	T	
H10	.	.	.	A	T	.	.	.	A	A	.	?	A	G	C
H11	G	.	G	A	T	C	A	T	A	T	T	.	.	.	A	.	T	.	T	C	A	T	.	A	G	C	T	T	.	A	G	C	T	
H12	G	.	G	A	T	C	A	T	A	T	T	.	G	.	A	A	T	.	T	C	A	T	.	A	G	C	T	T	.	A	G	C	T	
H13	.	.	.	A	T	.	.	.	A	A	.	T	A	G	C
H14	G	.	G	A	T	C	A	T	A	T	T	.	.	.	A	A	T	.	T	C	A	T	.	.	G	C	T	T	.	A	.	T	T	
H15	G	.	G	A	T	C	A	T	A	T	T	.	.	T	A	A	T	C	T	C	A	T	G	A	G	C	T	T	.	A	G	C	T	
H16	G	.	G	A	T	C	A	T	A	T	T	.	.	T	A	A	T	.	T	C	A	T	G	A	G	C	T	T	.	.	G	C	T	
H17	G	.	.	A	T	C	A	T	A	T	T	T	.	T	A	A	T	.	T	C	A	T	G	A	G	C	T	T	.	A	G	C	T	
H18	G	.	G	A	T	C	A	T	A	T	T	C	.	.	A	A	T	.	T	C	A	T	.	A	G	C	T	T	.	A	G	C	T	
H19	G	.	?	A	T	.	?	.	A	A	.	T	A	G	C	.	.	.	?	.	.	?	
H20	G	.	?	A	T	.	A	.	A	A	.	T	.	.	?	.	.	.	A	G	C	.	.	.	?	.	.	?	
H21	G	.	G	A	T	C	A	T	A	T	T	.	.	T	A	A	T	.	T	C	A	T	G	A	G	C	T	T	.	A	G	T	T	
H22	G	.	G	A	T	C	A	?	A	T	?	.	.	T	A	A	T	.	?	C	?	T	G	A	G	C	T	?	.	A	.	C	T	

Tabela 13. Número de machos (n) e haplótipos de *Euglossa marianae* e *Euglossa bidentata* das 11 localidades amostradas. Haplótipos destacados em negrito são haplótipos de cópia única. Para cada localidade, Hd = diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica. (σ = desvio-padrão; n/a = não se aplica)

Espécie	Localidade	n	Haplótipo	$Hd \pm \sigma$	$\pi \pm \sigma$
<i>Euglossa marianae</i>	Igrapiúna, BA	5	H9(3), H10(1), H11(1)	0,7000 \pm 0,2184	0,013910 \pm 0,009166
	Linhares, ES	14	H9(4), H11(1), H13(3), H16(4), H17(1), H18(1)	0,8352 \pm 0,0617	0,014686 \pm 0,008168
	Porto Seguro, BA	3	H10(1), H12(1), H13(1)	0,6667 \pm 0,3143	0,023810 \pm 0,018568
	Sooretama, ES	13	H9(3), H12(1), H14(2), H16(3), H19(1), H20(1), H21(1), H22(1)	0,8974 \pm 0,0537	0,009880 \pm 0,005740
	Uruçuca, BA	10	H9(2), H11(2), H12(4), H14(1), H15(1)	0,8222 \pm 0,0969	0,003551 \pm 0,002497
<i>Euglossa bidentata</i>	Canaã dos Carajás, PA	3	H4(1), H5 (1), H6 (1)	0,6667 \pm 0,3143	0,018797 \pm 0,014827
	Mâncio Lima, AC	1	H2(1)	n/a	n/a
	Oriximiná, PA	1	H2(1)	n/a	n/a
	Parauapebas, PA	2	H7(1), H8(1)	n/a	n/a
	Porto Velho, RO	2	H3(1) , H4(1)	n/a	n/a
	Peru: Loreto	1	H1(1)	n/a	n/a
Total de espécimes		55			

A diferença entre as médias harmônicas dos valores de verossimilhança das análises com dados não-particionados (modelo: GTR+ Γ) e particionados (modelo para 1ª e 2ª posições do códon: HKY; modelo para 3ª posição do códon: HKY) é de 43,3, o que favorece a adoção dos dados particionados.

A dicotomia basal da árvore de consenso (excluindo o grupo externo) (Fig. 20) sugere a separação da população ancestral em um clado com suporte relativamente alto (PP = 0,84) na Mata Atlântica (*E. "marianae 2"*) e outro formado por indivíduos de *E. "marianae 1"*, *E. "bidentata 1"* e *E. "bidentata 2"*. A monofilia dessas espécies, portanto, não é suportada, com o clado formado por *E. "bidentata 2"*, *E. "marianae 1"* e *E. "bidentata 1"* recebendo um suporte menor (PP = 0,67) (Fig. 20). *Euglossa "bidentata 1"* é um ramo bem suportado (PP = 1), porém a relação entre este clado e *E. "marianae 1"* não pode ser resolvida, formando uma politomia.

A divergência evolutiva média entre *E. marianae* (Mata Atlântica) e *E. bidentata* (Amazônia) pelo K2p e *p-distance* é de 1,5% (S.E. = 0,005). Entre os clados *E. "marianae 2"* e *E. "marianae 1"* verifica-se uma divergência de 1,6% (S.E. = 0,005) (Tab. 35 e 36); entre *E. "marianae 2"* e *E. "bidentata 2"* é de 1,2% (S.E. = 0,005); entre *E. "marianae 2"* e *E. "bidentata 1"* é de 1,8% (S.E. = 0,005); entre *E. "bidentata 1"* e *E. "bidentata 2"* é de 1,5% (S.E. = 0,005); entre *E. "bidentata 1"* e *E. "marianae 1"* é de 0,2% (0,002) e entre *E. "marianae 1"* e *E. "bidentata 2"* é de 1,7% (S.E. = 0,006). Quanto à divergência evolutiva média dentro dos grupos, observou-se, pelos dois modelos (K2p e *p-distance*), um valor de 0,3% (S.E. = 0,001) para *E. bidentata* e de 0,7% (S.E. = 0,002) para *E. marianae*. Em *E. "bidentata 1"* e *E. "marianae 1"* a divergência intragrupo é de 0%, e para *E. "marianae 2"* é de 0,03869% (S. E. = 0,0015) (Tab. 37).

Na rede de haplótipos, verifica-se a presença de três haplogrupos (Fig. 21) iguais aos grupos obtidos com a análise bayesiana: **G1**, formado pelos haplótipos de *E. "marianae 1"* (parte dos indivíduos da BA + ES) e de *E. "bidentata 1"* (Peru + AC + RO + parte dos indivíduos do PA); **G2**, formado por um haplótipo (H6, do indivíduo Ebi17) de *E. "bidentata 2"* de Canaã dos Carajás, PA; e **G3**, formado pelos haplótipos de *E. "marianae 2"* (restante dos indivíduos da BA + ES). Estes grupos se mostram bem estruturados e divergentes entre si (*Fst* = 0,93126; P = 0,0000), com a maior variação presente entre eles (88,51%) (Tab. 18). Os haplótipos mais frequentes são: H9 (n = 12) presente na Bahia e Espírito Santo, seguido de H16 (n = 7) com representação em duas localidades do Espírito Santo e H12 (n = 6) presente na Bahia e Espírito Santo

(Fig. 21 e Tab. 13). O procedimento de retirada dos sítios ambíguos (dados faltantes) na preparação do arquivo para análise no *NETWORK* fez com que o programa reunisse os haplótipos H2, H3, H4, H5, H7 e H8 com o H1; o H13 com o H10; o H20 com o H19 e o H17 com o H16. Por isso, estes haplótipos não são visualizados na Figura 21.

Para as duas simulações do *Geneland* o número mais provável de populações é três ($K = 3$) (Figs. 22 e 23). Na primeira simulação, em que é utilizado um MENCFFH, os três grupos [**G1**: BA + ES; **G2**: Peru + AC + RO e **G3**: PA] (Fig. 22) encontram-se bem estruturados ($F_{st} = 0,69695$; $P = 0,0000$), com 69,09% da variação presente entre eles (Tab. 16). A estatística D de Tajima ($D = -1,48926$; $P = 0,01000$) (Tab. 15) indica que as sequências dos indivíduos de G3 não evoluem de forma neutra.

Pela simulação MECFFH, os grupos [**G1**: Peru + AC; **G2**: RO + Oriximiná, PA + BA + ES e **G3**: PA (Canaã dos Carajás e Parauapebas)] (Fig. 23) não estão tão claramente delimitados, apesar da AMOVA ter indicado grande estruturação genética ($F_{st} = 0,67679$; $P = 0,0000$), com 54,10% da variação presente entre eles (Tab. 17). A estatística D de Tajima ($D = -1,22992$; $P = 0,02500$) (Tab. 15) indica que as sequências dos indivíduos de G3 não evoluem de forma neutra.

Na comparação entre as amostras da Amazônia e da Mata Atlântica, a AMOVA indica estruturação genética, com $F_{st} = 0,69590$ ($P = 0,0000$) e 69,10% da variação presente entre grupos (Tab. 19).

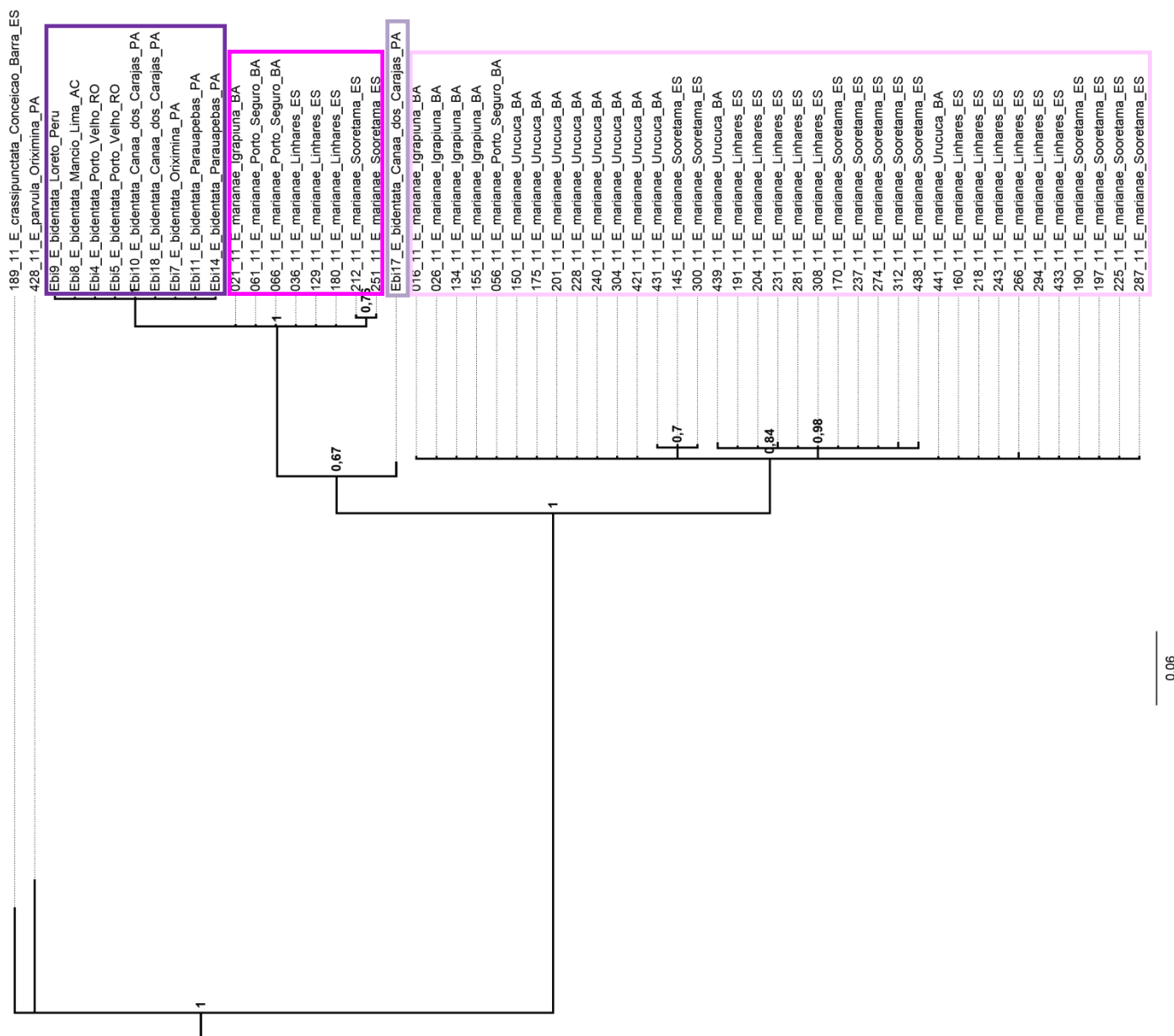


Figura 20. Filograma da árvore de consenso resultante da inferência Bayesiana para 532 pb do COI de *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae* e duas espécies do grupo externo (*Euglossa crassipunctata* e *Euglossa parvula*). As cores destacam cada clado: *E. “bidentata 1”* em roxo, *E. “marianae 1”* em rosa escuro, *E. “bidentata 2”* em lilás e *E. “marianae 2”* em rosa claro. Os valores de probabilidade posterior são apresentados nos nós da árvore.

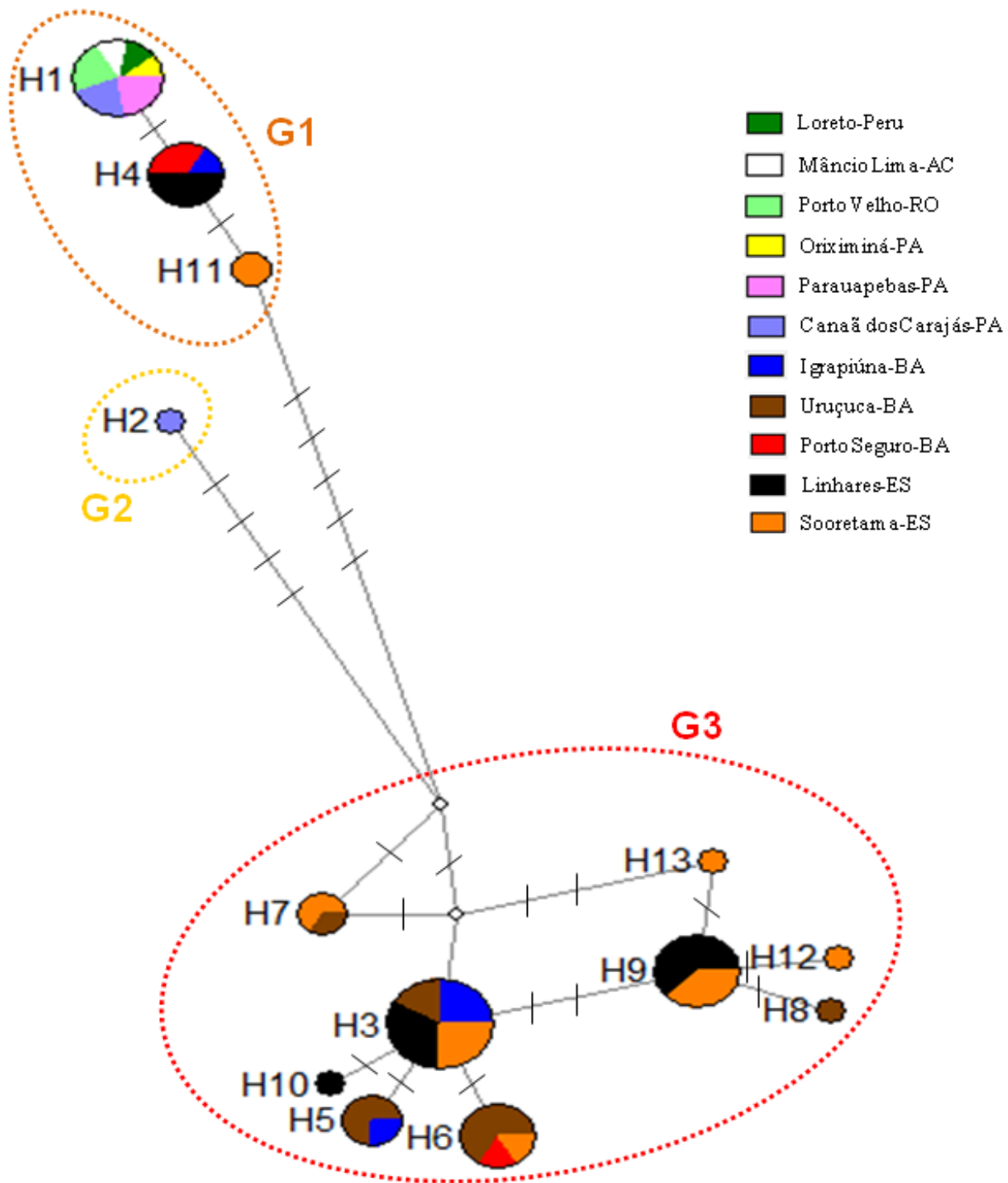


Figura 21. Rede de haplótipos *Median-Joining* do gene COI de *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae* e seus principais agrupamentos. Cada círculo na rede de haplótipos corresponde a um haplótipo e o seu tamanho é proporcional à frequência do haplótipo. Cada traço na linha que conecta um haplótipo ao outro se refere a um passo mutacional. As cores representam as localidades das amostras e os códigos dos haplótipos estão de acordo com as Tabelas 12 e 13. O grupo destacado em laranja (G1) possui haplótipos da Amazônia e da Mata Atlântica, aquele destacado em amarelo (G2) contém um haplótipo da Amazônia e o vermelho (G3) possui haplótipos da Mata Atlântica.

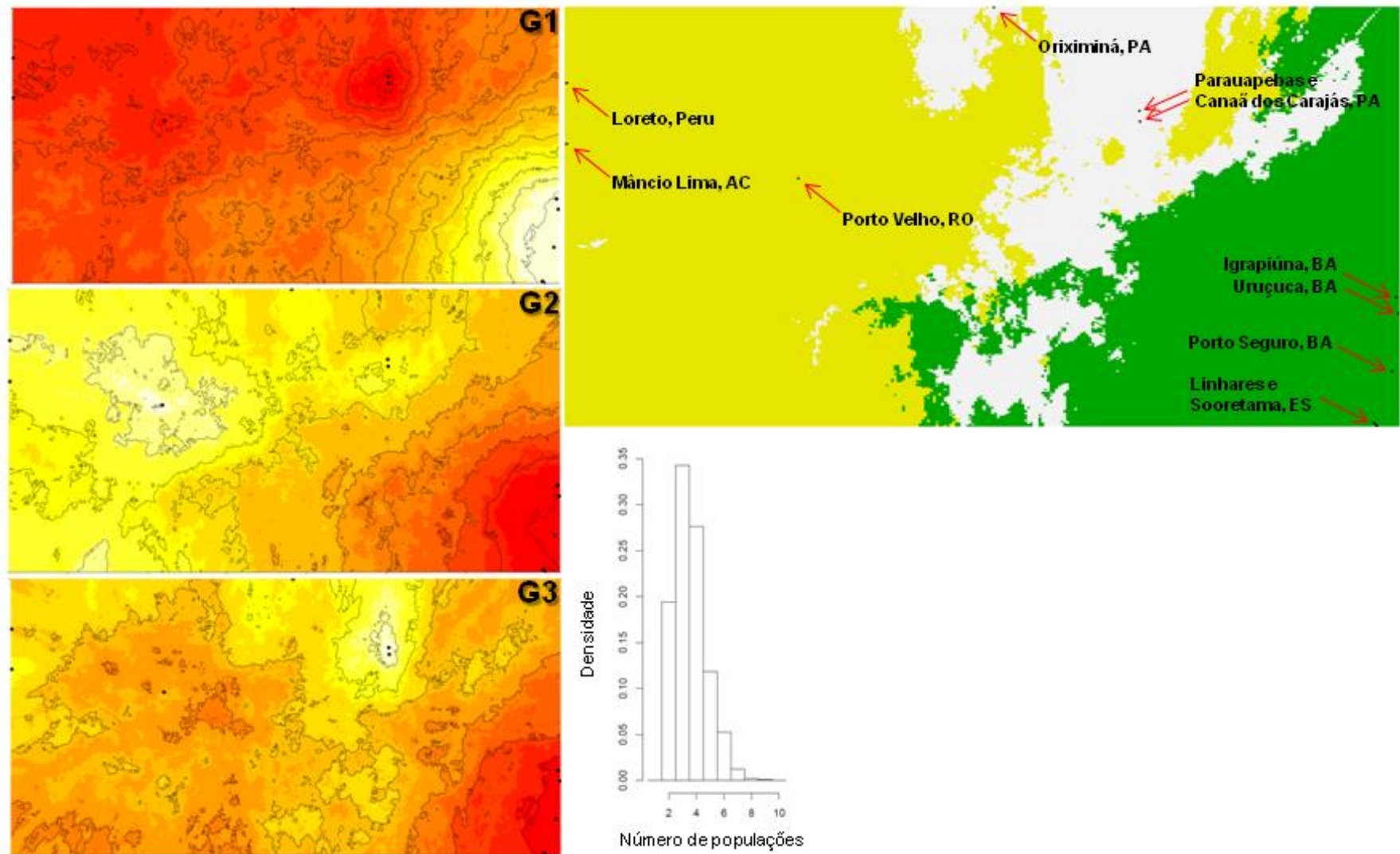


Figura 22. Mapas de probabilidade posterior de designação de três diferentes populações [G1: BA + ES; G2: Peru + AC + RO e G3: PA] pelo modelo espacial não correlacionado à frequência dos haplótipos implementado no Geneland para o par *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae*. Na coluna à esquerda os eixos horizontais e verticais representam as coordenadas longitudinais e latitudinais, respectivamente, e os pontos pretos representam as localidades amostradas, conforme apontado no mapa superior à direita. A cor branca indica maiores valores de probabilidade e, na medida em que a cor se aproxima do vermelho, a probabilidade decresce. O gráfico abaixo à direita representa o número mais provável de populações ($K = 3$) após a simulação MCMC.

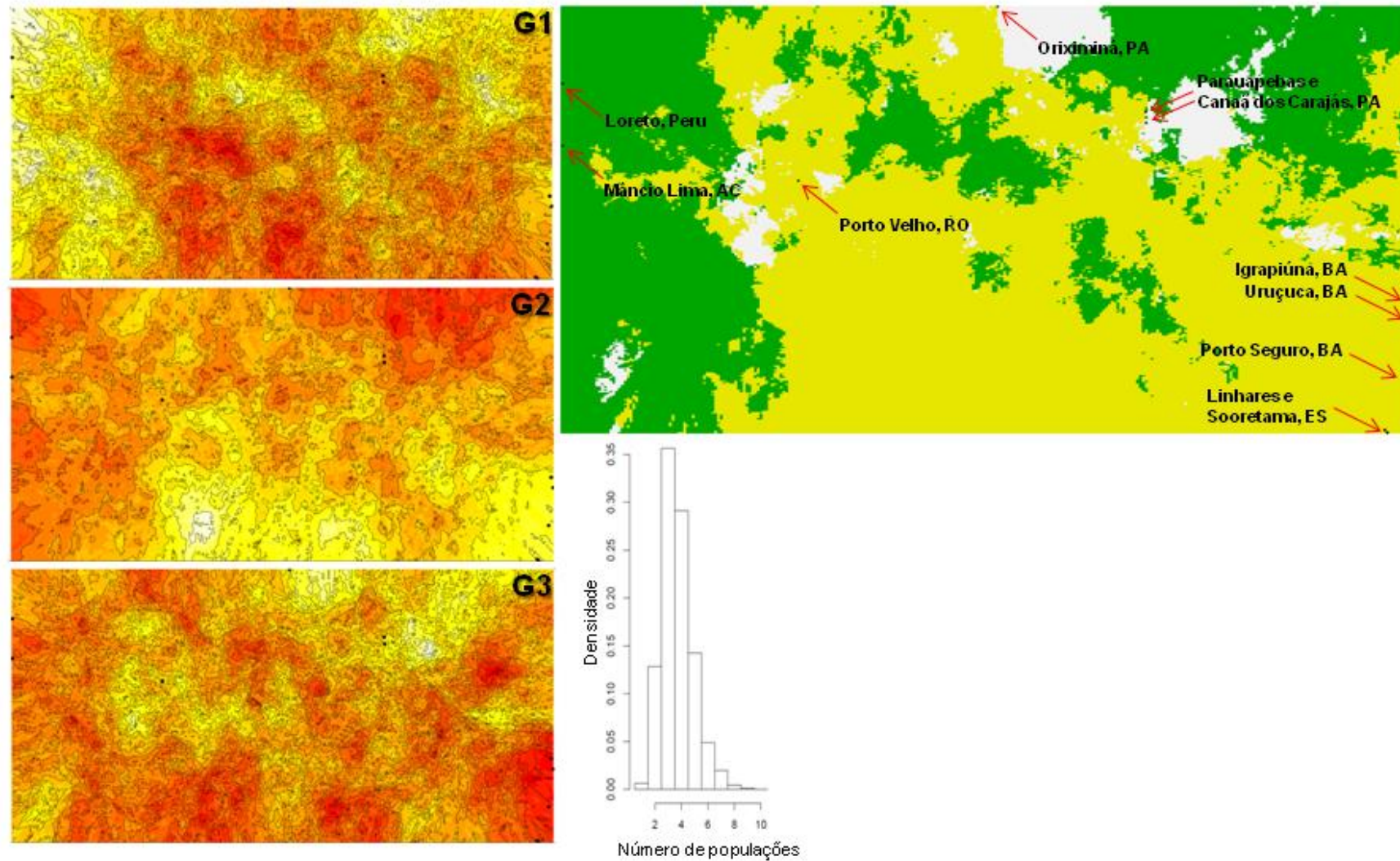


Figura 23. Mapas de probabilidade posterior de designação de três diferentes populações [G1: Peru + AC; G2: RO + Oriximiná, PA + BA + ES e G3: PA (Canaã dos Carajás e Parauapebas)] pelo modelo espacial correlacionado à frequência dos haplótipos implementado no Geneland para o par *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae*. Na coluna à esquerda os eixos horizontais e verticais representam as coordenadas longitudinais e latitudinais, respectivamente, e os pontos pretos representam as localidades amostradas, conforme apontado no mapa superior à direita. A cor branca indica maiores valores de probabilidade e, na medida em que a cor se aproxima do vermelho, a probabilidade decresce. O gráfico abaixo à direita representa o número mais provável de populações ($K = 3$) após a simulação MCMC.

Tabela 14. Índices de diversidade para os grupos do par de espécies *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae*: n = número de indivíduos, *H* = número de haplótipos, *Hd* = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica, *S* = número de sítios polimórficos. (σ = desvio-padrão; G = grupo)

Grupo	n	<i>H</i>	<i>Hd</i> ± σ	π ± σ	<i>S</i>
Simulação MENCFH (Geneland): 3 grupos					
G1: BA, ES	45	11	0,8646 ± 0,0265	0,012045 ± 0,006454	23
G2: Peru, AC, RO	4	1	0	0	0
G3: PA	6	2	0,3333 ± 0,2152	0,011995 ± 0,007653	19
Simulação MECFH (Geneland): 3 grupos					
G1: Peru, AC	2	1	0	0	0
G2: RO, Oriximiná-PA, BA, ES	48	12	0,8785 ± 0,0241	0,015215 ± 0,007982	28
G3: PA (Canaã dos Carajás e Parauapebas)	5	2	0,4000 ± 0,2373	0,014394 ± 0,009466	19
NETWORK: 3 grupos					
G1: Peru, AC, RO, PA (parte), BA (parte), ES (parte)	17	3	0,6176 ± 0,0769	0,005473 ± 0,003388	6
G2: PA (Canaã dos Carajás)	1	1	1,0000 ± 0,0000	0	0
G3: BA (parte), ES (parte)	37	9	0,8228 ± 0,0368	0,003460 ± 0,002259	8
TOTAL	55	13	0,8855 ± 0,0191	0,019336 ± 0,009945	30

Tabela 15. Testes de neutralidade seletiva para os grupos do par de espécies *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae*: *D*, teste de Tajima e *F_s*, teste de Fu. s: número de transições; v: número de transversões; Subst.: número de substituições.

Grupo	Teste de neutralidade		s	v	Subst.
	<i>D</i>	<i>F_s</i> de Fu			
Simulação MENC FH (Geneland): 3 grupos					
G1: BA, ES	0,71160 (P: 0,79800)	2,03691 (P: 0,81000)	15	9	24
G2: Peru, AC, RO	0,00000 (P: 1,0000)	-	-	-	-
G3: PA	-1,48926 (P: 0,01000)*	6,32012 (P: 0,99300)	12	7	19
Simulação MEC FH (Geneland): 3 grupos					
G1: Peru, AC	0,00000 (P: 1,0000)	-	-	-	-
G2: RO, Oriximiná-PA, BA, ES	0,90922 (P: 0,84700)	2,80307 (P: 0,84200)	17	11	28
G3: PA (Canaã dos Carajás e Parauapebas)	-1,22992 (P: 0,02500)*	-6,04496 (P: 0,99400)	12	7	19
NETWORK: 3 grupos					
G1: Peru, AC, RO, PA (parte), BA (parte), ES (parte)	2,06539 (P: 0,98300)	4,26356 (P: 0,97000)	4	2	6
G2: PA (Canaã dos Carajás)	0,00000 (P: 1,0000)	-	-	-	-
G3: BA (parte), ES (parte)	-0,11427 (P: 0,49200)	-2,04530 (P: 0,14600)	7	1	8
TOTAL	1,82850 (P: 0,97700)	4,31253 (P: 0,90600)	20	11	31

** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$

Tabela 16. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (BA + ES) G2 (Peru + AC + RO) e G3 (PA) definidos pelo Geneland (simulação MENCFFH) como grupos e as localidades de coleta como populações de *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae*.

Fonte de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	69,09
Entre populações dentro dos grupos	0,61
Dentro das populações	30,31
$F_{st} = 0,69695$; $p = 0,0000 \pm 0,0000$	

Tabela 17. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (Peru + AC), G2 (RO + parte PA + BA + ES) e G3 (parte PA) definidos pelo Geneland (simulação MECFFH) como grupos e as localidades de coleta como populações de *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae*.

Fonte de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	54,10
Entre populações dentro dos grupos	13,58
Dentro das populações	32,32
$F_{st} = 0,67679$; $p = 0,0000 \pm 0,0000$	

Tabela 18. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (Peru + AC + RO + parte PA + parte BA + parte ES), G2 (parte Canaã dos Carajás - PA) e G3 (parte BA + parte ES) definidos pelo NETWORK como grupos e as localidades de coleta como populações de *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae*.

Fonte de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	88,51
Entre populações dentro dos grupos	4,61
Dentro das populações	6,87
$F_{st} = 0,93126$; $p = 0,0000 \pm 0,0000$	

Tabela 19. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (Amazônia), G2 (Mata Atlântica) como grupos e as localidades de coleta como populações de *Euglossa bidentata* e *Euglossa marianae*.

Fonte de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	69,10
Entre populações dentro dos grupos	0,49
Dentro das populações	30,41
$F_{st} = 0,69590$; $p = 0,0000 \pm 0,0000$	

4.2.2. Par *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina*

Do total de 31 amostras de *E. calycina* disponíveis para estudo, 14 apresentaram sequência de baixa qualidade e, por isto, apenas 17 foram incluídas nas análises. Dos 92 espécimes disponíveis de *E. mixta*, não foi possível obter o DNA de 19 e outros 39 apresentaram sequências pequenas ou de baixa qualidade. Portanto, para *E. mixta*, apenas 34 amostras foram incluídas nas análises. Dos 51 indivíduos das duas espécies incluídos nas análises foi possível obter sequências de 533 pb do gene COI, com 33 (6,2 %) sítios polimórficos (Tab. 20), 29 sítios parcimônio-informativos e quatro *singletons*. O sítio 501, com uma posição ambígua, é apresentado na Tabela 20, porém não foi incluído no total de sítios polimórficos. Estas sequências não apresentaram *indels*, nem códons de parada e as substituições ocorreram, em sua maioria (85,3%), na 3ª posição do códon. Estes fatos aumentam a segurança de que as sequências não são contaminantes nucleares (Cristiano *et al.*, 2012).

Para estas espécies, foram identificados 10 haplótipos. Ao incluir o único sítio com ambiguidade, 11 haplótipos foram definidos pelo DNAsp (Tab. 20 e 21). Das 37 substituições (23 transições e 14 transversões), 30 são sinônimas e seis não-sinônimas. A composição nucleotídica total encontrada é de T = 47,25%, C = 11,64%, A = 31,10% e G = 10,01%. A diversidade nucleotídica (π) para todo o conjunto de dados é de $0,018044 \pm 0,009334$ e a diversidade haplotípica (Hd) é $0,6604 \pm 0,0528$ (Tab. 22).

Tabela 20. Lista de haplótipos do gene COI de *Euglossa mixta* (H1 a H8) e *Euglossa calycina* (H9 a H11) com os 33 sítios polimórficos. Os pontos (.) indicam igualdade com o haplótipo 1. A interrogação (?) indica dado faltante.

Haplótipo	Sítios polimórficos																																	
	6	9	16	24	45	61	84	103	117	126	153	162	168	177	201	216	225	258	264	270	279	285	287	297	306	318	339	366	384	387	458	462	480	501
H1	A	A	A	A	A	A	A	T	G	A	A	C	A	A	A	A	G	A	T	A	A	A	T	T	T	A	A	A	A	T	A	A	G	C
H2	.	G	.	G	G	.	.	C	A	T	.	T	T	.	.	G	A	G	A	.	.	.	C	.	.	T	T	T	A	T
H3	.	G	.	G	G	.	.	C	A	T	.	T	T	G	.	G	A	G	A	.	.	.	C	.	.	T	T	T	A	T
H4	.	G	.	.	G	.	.	C	.	T	.	T	T	.	.	.	A	G	A	.	G	.	C	.	.	T	T	T	A	T
H5	.	G	.	G	G	.	.	C	A	T	C	T	T	.	.	G	A	G	A	.	.	.	C	.	.	T	T	T	A	T
H6	G	C	A	T	T	T	T	.	G	.	A	.	.	T	.	.	C	.	A	T	T	T	A	T
H7	G	C	A	T	T	T	T	.	G	.	A	.	.	T	.	.	C	.	A	T	T	T	A	?
H8	C	A	T	T	T	T	.	G	.	A	.	.	T	.	.	C	.	A	T	T	T	A	T
H9	T	G	G	T	.	G	G	C	.	T	.	T	A	T	.	G	.	.	C	A	A	T	.	G	G	A	T	T	A	T
H10	T	G	G	T	.	G	G	C	.	T	.	T	A	T	.	G	.	G	C	A	A	T	.	G	G	A	T	T	A	T
H11	T	G	G	T	.	G	G	C	.	T	.	T	A	T	.	G	.	.	C	A	A	T	G	G	G	A	T	T	A	T

Tabela 21. Número de machos (n) e haplótipos de *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina* das 16 localidades amostradas. Haplótipos destacados em negrito são haplótipos de cópia única. Para cada localidade, Hd = diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica. (σ = desvio-padrão; n/a = não se aplica)

Espécie	Localidade	n	Haplótipo	$Hd \pm \sigma$	$\pi \pm \sigma$
<i>Euglossa calycina</i>	Conceição da Barra, ES	8	H9(7), H11(1)	0,2500 \pm 0,1802	0,000469 \pm 0,000665
	Ilhéus, BA	3	H9(3)	0	0
	Itamaraju, BA	3	H9(3)	0	0
	Porto Seguro, BA	1	H9(1)	n/a	n/a
	Sooretama, ES	1	H9(1)	n/a	n/a
	Uruçuca, BA	1	H10(1)	n/a	n/a
<i>Euglossa mixta</i>	Belize: Las Cuervas Research Station	2	H1(2)	0	0
	Carajás, PA	10	H6(10)	0	0
	Oriximiná, PA	14	H6(12), H7(1) , H8(1)	0,1429 \pm 0,1188	0,000268 \pm 0,000461
	Paragominas, PA	1	H6(1)	n/a	n/a
	Porto Velho, RO	2	H6(2)	0	0
	Honduras: Bonanza Río Plátano Trail	1	H5(1)	n/a	n/a
	Honduras: Río Plátano, Gracias a Dios	1	H1(1)	n/a	n/a
	Honduras: Río Plátano (ponto 1)	1	H2(1)	n/a	n/a
	Honduras: Río Plátano (ponto 2)	1	H3(1)	n/a	n/a
	Honduras: Río Plátano (ponto 3)	1	H4(1)	n/a	n/a
Total de espécimes		51			

A diferença entre as médias harmônicas dos valores de verossimilhança das análises com dados não-particionados (modelo: GTR+I) e particionados (modelo para 1ª e 2ª posições do códon: HKY; modelo para 3ª posição do códon: HKY) é de 60,38, o que sugere uma melhor adequação dos dados particionados neste caso.

A dicotomia basal da árvore de consenso obtida (excluindo o grupo externo) (Fig. 24) sugere a ocorrência de um evento vicariante que teria separado a população ancestral em duas outras, *E. calycina* (Mata Atlântica; PP = 0,96) e a espécie ancestral dos clados amazônicos e centro-americanos (atualmente considerados como *E. mixta*). Este clado teria se dividido, em seguida, em um clado com representantes da Amazônia (*E. “mixta 1”*; PP = 0,96), e outro com populações da América Central (*E. mixta s. stricto*; PP = 0,59). Há dois clados bem suportados dentro de *E. mixta s. stricto*, um com indivíduos de Belize e Honduras (*E. “mixta 2”*; PP = 1) e outro com indivíduos somente de Honduras (*E. “mixta 3”*; PP = 0,85).

As divergências genéticas médias entre os clados *E. calycina*, *E. “mixta 1”*, *E. “mixta 2”* e *E. “mixta 3”* pelo K2p e *p-distance* encontram-se nas Tabelas 35 e 36 e as distâncias dentro de cada clado estão na Tabela 37. Nota-se que a maior divergência encontrada na análise deste grupo é de 3,2% (S.E. = 0,008) entre *E. calycina* e *E. “mixta 2”*, e a menor é de \approx 1,9% (S.E. = 0,006) verificada entre *E. “mixta 1”* e *E. “mixta 2”* e entre *E. “mixta 1”* e *E. “mixta 3”*. A divergência entre *E. “mixta 1”* e *E. mixta s.s.* pelo K2p é de 2,7% (S.E. = 0,006) e entre *E. calycina* e *E. mixta s.s.* pelo K2p é de 3,8% (S.E. = 0,008). Uma divergência relativamente alta (2,6%; S.E. = 0,007) foi verificada entre os dois clados da América Central (*E. “mixta 2”* e *E. “mixta 3”*). Observa-se uma divergência evolutiva média dentro de *E. “mixta 1”*, tanto pelo K2p quanto pelo *p-distance*, de 0% e dentro de *E. calycina* de 0,0493% (S.E. = 0,0003) (Tab. 37); a divergência dentro de *E. mixta s.s.* é de 2,2% (S.E. = 0,005), dentro de *Euglossa “mixta 2”* é de 0% e dentro de *E. “mixta 3”* é de 0,4208% (S.E. = 0,002).

Na rede de haplótipos (Fig. 25), verifica-se a presença de quatro haplogrupos bem estruturados [$F_{st} = 0,99355$; $P = 0,0000$ e 97,41% da variação presente entre os grupos (Tab. 25)]: **G1**, formado pelos indivíduos de *E. “mixta 2”* de Belize e Honduras (Gracias a Dios); **G2**, formado pelos indivíduos de *E. “mixta 3”* de Honduras; **G3**, formado pelos indivíduos de *E. “mixta 1”* da Amazônia (RO + PA); e **G4**, constituído pelos indivíduos de *E. calycina* (Mata Atlântica). Não há compartilhamento de haplótipos entre estes grupos e os haplótipos mais frequentes são o H6 (n = 25), presente nas quatro localidades da Amazônia, e o H9 (n = 15), que está presente em

todas as localidades amostradas da Mata Atlântica, com exceção de Uruçuca, BA. O procedimento de retirada do sítio ambíguo na preparação do arquivo para análise no *NETWORK* levou o programa a reunir o haplótipo H7 com o H6 e, por isso, o H7 não é visualizado na Figura 25. Este resultado concorda em grande parte com a reconstrução filogenética, mas dá suporte para a separação entre os dois grupos da América Central, indicando que além do grupo amazônico, há mais dois grupos da América Central dentro de “*E. mixta*”.

As simulações MENC FH e MEC FH do *Geneland* indicaram que o número mais provável de populações é três ($K = 3$), que seriam as mesmas nas duas simulações. No entanto, elas receberam denominações diferentes [MENC FH: **G1**: BA + ES; **G2**: Belize + Honduras e **G3**: RO + PA (Fig. 26); MEC FH: **G1**: Belize + Honduras; **G2**: RO + PA e **G3**: BA + ES (Fig. 27)]. A AMOVA indica grande estruturação genética ($F_{st} = 0,99333$; $P = 0,0000$) para este arranjo de três grupos, com 85,88% da variação entre eles (Tab. 24). Estes resultados dão suporte à monofilia de *E. calycina* e indicam a existência de dois grupos dentro da “*E. mixta*”, um da América Central e outro amazônico.

Ao considerar somente os grupos da Amazônia e da Mata Atlântica, verifica-se a maior variação entre grupos (99,04%) e grande estruturação genética ($F_{st} = 0,99321$; $P = 0,0000$) (Tab. 26), indicando que *E. calycina* e *E. “mixta 1”* da Amazônia estão separados. A estatística F_s de Fu (Tab. 23) indica que as sequências dos indivíduos de *E. calycina* (BA e ES) não evoluem de forma neutra.

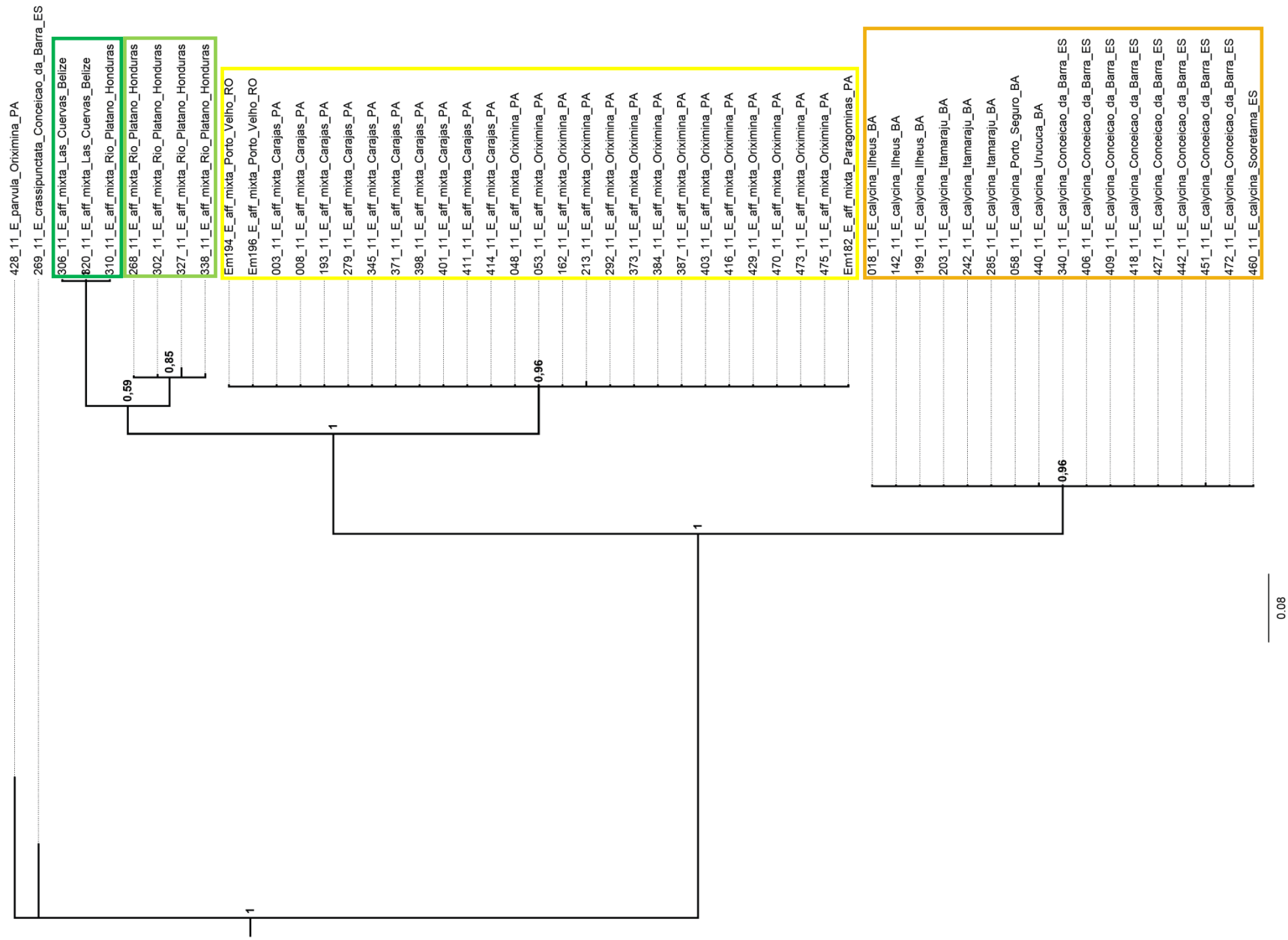


Figura 24. Filograma da árvore de consenso resultante da inferência Bayesiana para 533 pb do COI de *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina* e duas espécies do grupo externo (*Euglossa crassipunctata* e *Euglossa parvula*). Os valores de probabilidade posterior são apresentados nos nós da árvore. As cores destacam cada clado: *E. calycina* (Mata Atlântica) em laranja, *E. “mixta 1”* (Amazônia) em amarelo e *E. mixta s. stricto* (América Central) em verde, que contém dois clados—*E. “mixta 2”* [Belize + Honduras (Río Plátano - Gracias a Dios)] em verde escuro e *E. “mixta 3”* (Honduras) em verde claro.

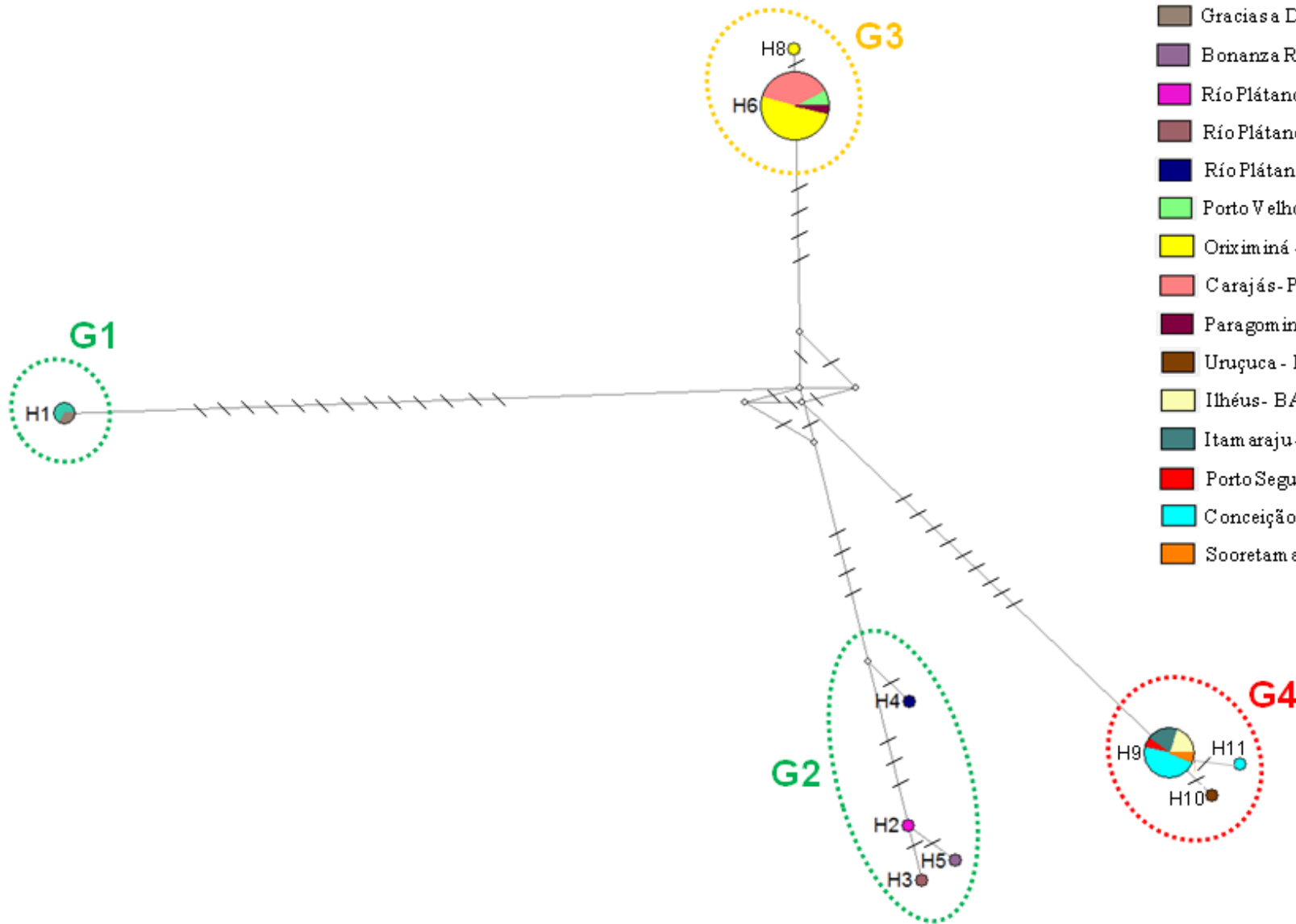


Figura 25. Rede de haplótipos *Median-Joining* do gene COI de *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina* e seus principais agrupamentos. Cada círculo na rede de haplótipos corresponde a um haplótipo e o seu tamanho é proporcional à sua frequência. Cada traço na linha que conecta um haplótipo a outro se refere a um passo mutacional. As cores representam as localidades das amostras e os códigos dos haplótipos estão de acordo com as Tabelas 20 e 21. Os grupos destacados em verde (G1 e G2) apresentam haplótipos da América Central, aquele destacado em amarelo (G3) contém haplótipos da Amazônia e o vermelho (G4) da Mata Atlântica.

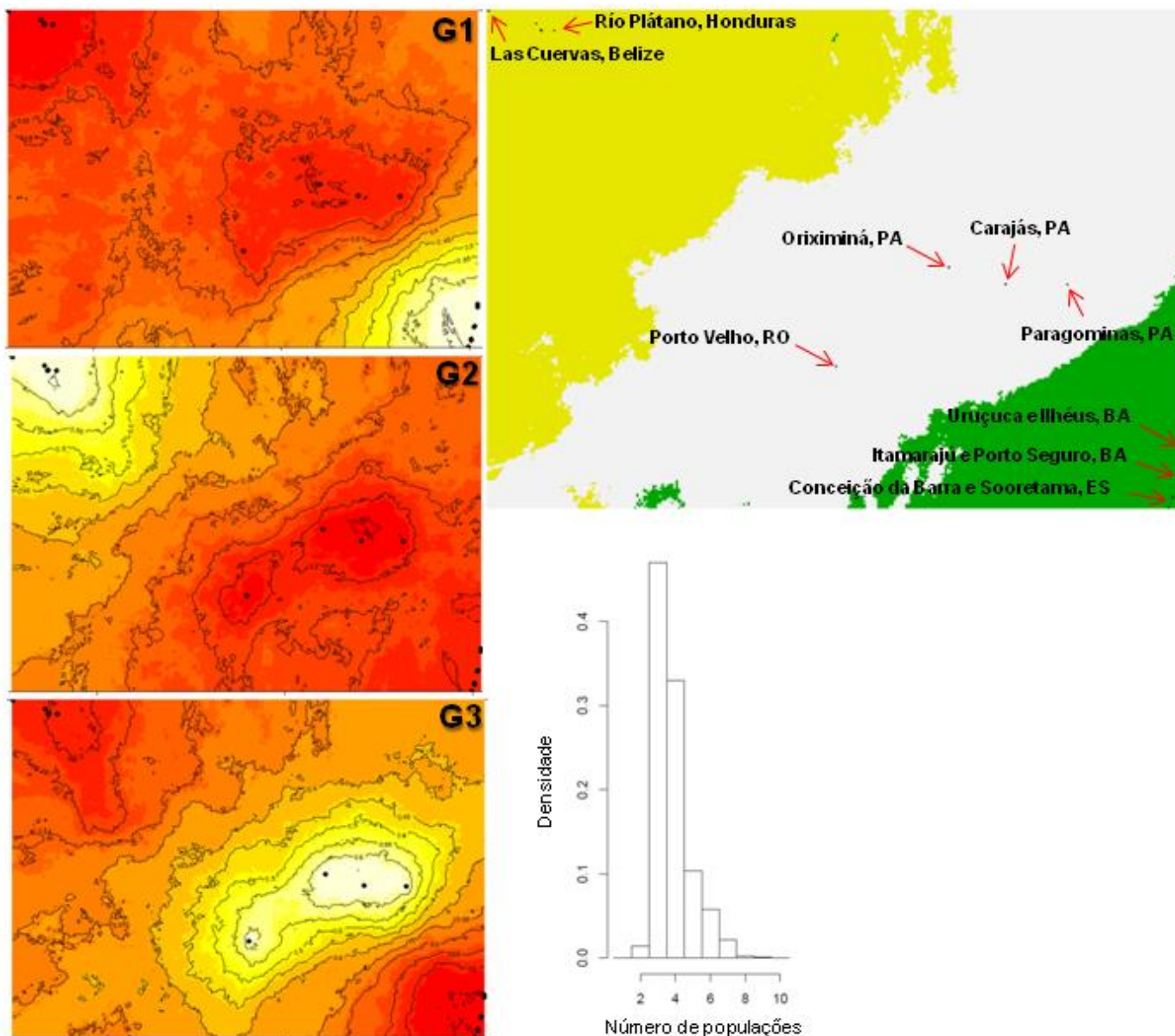


Figura 26. Mapas de probabilidade posterior de designação de três diferentes populações [G1: BA + ES; G2: Belize + Honduras e G3: RO + PA] pelo modelo espacial não correlacionado à frequência dos haplótipos implementado no *Geneland* para o par *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina*. Na coluna à esquerda os eixos horizontais e verticais representam as coordenadas longitudinais e latitudinais, respectivamente, e os pontos pretos representam as localidades amostradas, conforme apontado no mapa superior à direita. A cor branca indica maiores valores de probabilidade e, na medida em que a cor se aproxima do vermelho, a probabilidade decresce. O gráfico abaixo à direita representa o número mais provável de populações ($K = 3$) após a simulação MCMC.

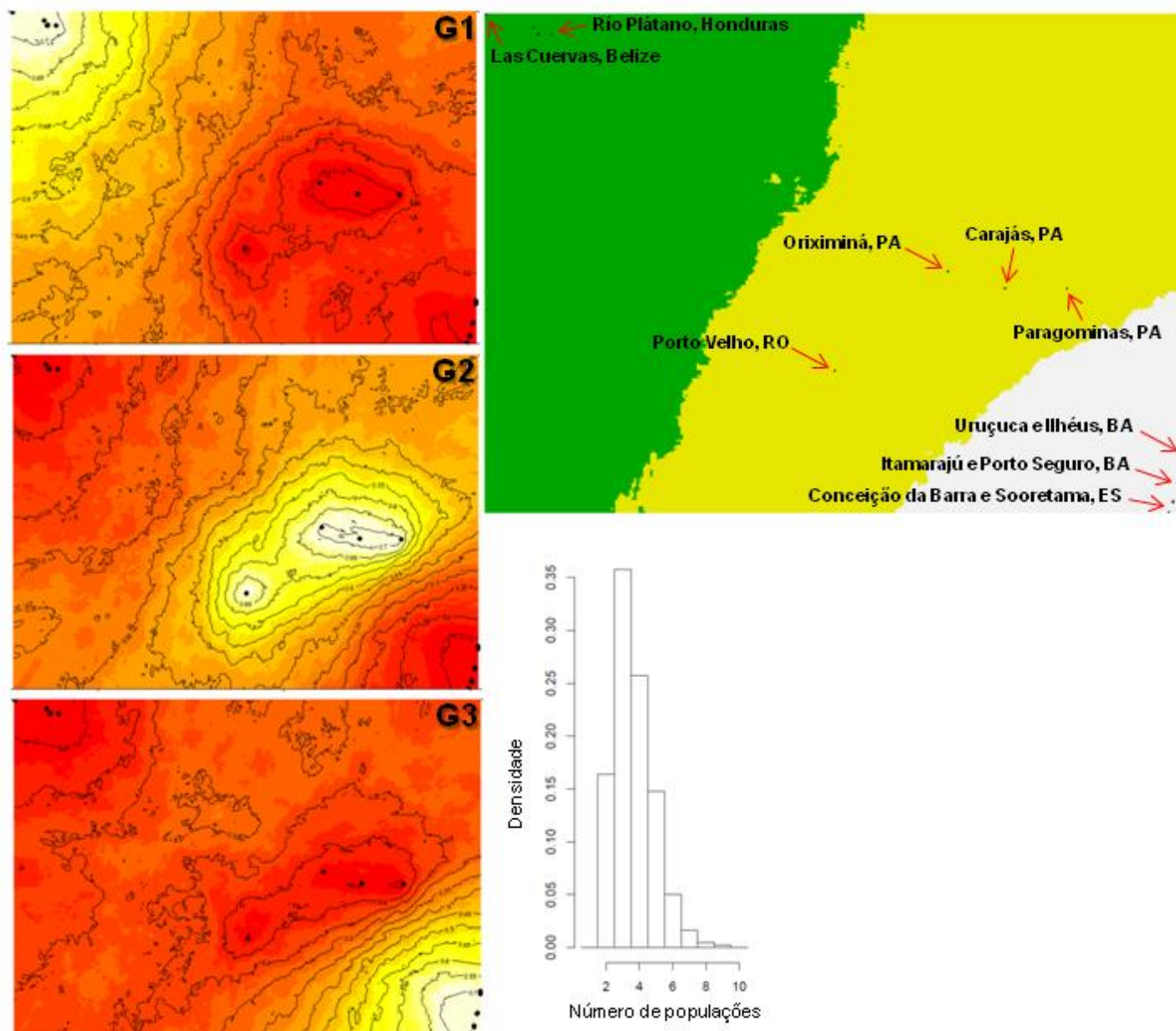


Figura 27. Mapas de probabilidade posterior de designação de três diferentes populações [G1: Belize + Honduras; G2: RO + PA e G3: BA + ES] pelo modelo espacial correlacionado à frequência dos haplótipos implementado no *Geneland* para o par *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina*. Na coluna à esquerda os eixos horizontais e verticais representam as coordenadas longitudinais e latitudinais, respectivamente, e os pontos pretos representam as localidades amostradas, conforme apontado no mapa superior à direita. A cor branca indica maiores valores de probabilidade e, na medida em que a cor se aproxima do vermelho, a probabilidade decresce. O gráfico abaixo à direita representa o número mais provável de populações ($K = 3$) após a simulação MCMC.

Tabela 22. Índices de diversidade para os grupos do par de espécies *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina*: n = número de indivíduos, *H* = número de haplótipos, *Hd* = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica, *S* = número de sítios polimórficos. (σ = desvio-padrão; G = grupo)

Grupo	n	<i>H</i>	<i>Hd</i> ± σ	π ± σ	<i>S</i>
Simulação MENC FH					
(Geneland): 3 grupos					
G1: BA, ES	17	3	0,2279 ± 0,1295	0,000441 ± 0,0006	2
G2: Belize, Honduras	7	5	0,8571 ± 0,1371	0,021024 ± 0,12475	21
G3: RO, PA	27	2	0,0741 ± 0,0674	0,000139 ± 0,000313	1
Simulação MEC FH					
(Geneland): 3 grupos					
G1: Belize, Honduras	7	5	0,8571 ± 0,1371	0,021024 ± 0,12475	21
G2: RO, PA	27	2	0,0741 ± 0,0674	0,000139 ± 0,000313	1
G3: BA, ES	17	3	0,2279 ± 0,1295	0,000441 ± 0,0006	2
NETWORK: 4 grupos					
G1: Belize, Honduras (Gracias a Dios)	3	1	0	0	0
G2: Honduras (parte)	4	4	1,0000 ± 0,1768	0,005629 ± 0,004400	6
G3: RO, PA	27	2	0,0741 ± 0,0674	0,000139 ± 0,000313	1
G4: BA, ES	17	3	0,2279 ± 0,1295	0,000441 ± 0,000600	2
TOTAL	51	10	0,6604 ± 0,0528	0,018044 ± 0,009334	34

Tabela 23. Testes de neutralidade seletiva para os grupos do par de espécies *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina*: *D*, teste de Tajima e F_s , teste de Fu. s: número de transições; v: número de transversões; Subst.: número de substituições.

Grupo	Teste de neutralidade		s	v	Subst.
	<i>D</i>	F_s de Fu			
Simulação MENC FH					
(Geneland): 3 grupos					
G1: BA, ES	-1,50358 (P: 0,05800)	-1,68032 (P: 0,01300)*	2	0	2
G2: Belize, Honduras	1,68816 (P: 0,96600)	1,89228 (P: 0,79300)	14	7	21
G3: RO, PA	-1,15354 (P: 0,13100)	-1,12456 (P: 0,07900)	1	0	1
Simulação MEC FH					
(Geneland): 3 grupos					
G1: Belize, Honduras	1,68816 (P: 0,97300)	1,89228 (P: 0,79800)	14	7	21
G2: RO, PA	-1,15354 (P: 0,13700)	-1,12456 (P: 0,07400)	1	0	1
G3: BA, ES	-1,50358 (P: 0,06300)	-1,68032 (P: 0,02200)*	2	0	2
NETWORK: 4 grupos					
G1: Belize, Honduras (Gracias a Dios)	0,00000 (P: 1,0000)	-	0	0	0
G2: Honduras (parte)	-0,80861 (P: 0,16700)	-1,23676 (P: 0,08400)	5	1	6
G3: RO, PA	-1,15354 (P: 0,13500)	-1,12456 (P: 0,07200)	1	0	1
G4: BA, ES	-1,50358 (P: 0,05800)	-1,68032 (P: 0,01200)*	2	0	2
TOTAL	0,89017 (P: 0,84900)	6,41255 (P: 0,96200)	23	14	37

** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$

Tabela 24. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (BA + ES), G2 (Belize + Honduras) e G3 (RO + PA) definidos pelo Geneland (simulação MENCFFH) como grupos e as localidades de coleta como populações de *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina*. O resultado da AMOVA é idêntico quando se considera os grupos definidos pelo Geneland com a simulação MECFFH: G1 (Belize + Honduras), G2 (RO + PA) e G3 (BA + ES).

Fonte de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	85,88
Entre populações dentro dos grupos	13,45
Dentro das populações	0,67
$F_{st} = 0,99333$; $p = 0,0000 \pm 0,0000$	

Tabela 25. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (Belize + Gracias a Dios-Honduras), G2 (Honduras, exceto Gracias a Dios), G3 (RO + PA) e G4 (BA + ES) definidos pelo NETWORK como grupos e as localidades de coleta como populações de *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina*.

Fonte de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	97,41
Entre populações dentro dos grupos	1,94
Dentro das populações	0,64
$F_{st} = 0,99355$; $p = 0,0000 \pm 0,0000$	

Tabela 26. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando G1 (Amazônia) e G2 (Mata Atlântica) como grupos e as localidades de coleta como populações de *Euglossa mixta* e *Euglossa calycina*.

Fonte de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	99,04
Entre populações dentro dos grupos	0,28
Dentro das populações	0,68
$F_{st} = 0,99321$; $p = 0,0000 \pm 0,0000$	

4.3. Par *Eulaema niveofasciata* e *Eulaema bombiformis*

Do total de 72 amostras de *E. niveofasciata*, 20 apresentaram sequências pequenas ou de baixa qualidade e não foram incluídas nas análises. Para *E. bombiformis*, do total de 53 amostras obtidas, não foi possível obter o DNA de quatro e 28 apresentaram sequências de baixa qualidade. Portanto, foram empregados 73 indivíduos das duas espécies nas análises, dos quais foi possível obter sequências de 558 pb do gene COI, em que 38 sítios (6,8%) apresentaram polimorfismos (Tab. 27), dos quais 21 foram parcimônio-informativos e 17, *singletons*. Estas sequências não apresentaram *indels*, nem códons de parada e as substituições ocorreram em sua maioria

(92,1%) na 3ª posição do códon. Isto aumenta a segurança de que as sequências não sejam contaminantes nucleares (Cristiano *et al.*, 2012).

Para este conjunto de dados foram identificados 33 haplótipos (Tab. 27 e 28) a partir de 38 substituições (37 transições e uma transversão), das quais 36 são sinônimas e duas não. A composição nucleotídica total encontrada para as amostras deste par é de T = 44,05%, C = 11,86%, A = 34,26% e G = 9,83%. A diversidade nucleotídica (π) para todo o conjunto de dados é de $0,008380 \pm 0,004604$ e a diversidade haplotípica (Hd) é $0,9372 \pm 0,0151$ (Tab. 29).

A diferença entre as médias harmônicas dos valores de verossimilhança das análises com dados não-particionados (modelo: HKY+ Γ) e particionados (modelo para 1ª e 2ª posições do códon: HKY; modelo para 3ª posição do códon: HKY) foi de 146,96, o que sugere uma melhor adequação dos dados particionados neste caso.

Na árvore de consenso obtida através da inferência bayesiana (Figura 28), a monofilia de *E. niveofasciata* e *E. bombiformis* não foi suportada e indivíduos das duas espécies estão presentes em um único clado bem suportado (PP = 1) e sem estruturação evidente. Este resultado favorece, inicialmente, a hipótese de que a diagonal árida da América do Sul não tem atuado no isolamento das populações das duas espécies de *Eulaema*.

A divergência evolutiva média entre grupos medida pelo K2p e *p-distance* apresentaram os mesmos valores (Tab. 35 e 36). Ao se considerar em um mesmo grupo as amostras da Amazônia e da Costa Rica (*E. bombiformis*), verifica-se que este grupo diverge em apenas 1,2% (S.E. = 0,003) do grupo da Mata Atlântica (*E. niveofasciata*). Na comparação entre os grupos da Mata Atlântica e Amazônia, observa-se uma divergência baixa também, de apenas 1,1% (S.E. = 0,003); entre os grupos da Mata Atlântica e Costa Rica observa-se 2,1% (S.E. = 0,005); e entre os grupos da Amazônia e Costa Rica, 2,4% (S.E. = 0,006). Quanto à divergência média dentro de cada grupo, observa-se um valor de 0,8% (S.E. = 0,002169) para o grupo da Amazônia e 0,5459% (S.E. = 0,0019) para o grupo da Mata Atlântica. Quando a amostra da Costa Rica é incluída no grupo da Amazônia, a divergência dentro deste grupo é de 0,977% (S.E. = 0,0025) (Tab 37).

Na rede de haplótipos, verifica-se a presença de dois haplogrupos estruturados ($F_{st} = 0,78801$; $P = 0,0000$), com 63,09% da variação presente entre eles (Fig. 29 e Tab. 33): **G1**, formado pelo único indivíduo da Costa Rica (H1) e **G2**, formado pelo restante das amostras (Amazônia + Mata Atlântica). Não há compartilhamento de haplótipos

entre Amazônia, Mata Atlântica e Costa Rica. No entanto, os haplótipos de diferentes localidades da Amazônia e Mata Atlântica se interconectam em G2 por um ou poucos passos mutacionais. A maioria dos haplótipos de *E. bombiformis* é de cópia única e *Eulaema niveofasciata* apresenta os haplótipos mais frequentes: H24 (n = 12), H27 (n = 11) e H28 (n = 7), que estão presentes em localidades da Bahia e Espírito Santo (Tab. 28). A estatística F_s de Fu (-18,27161; $P = 0,00000$) indica que as sequências dos indivíduos de G2 não evoluem de forma neutra (Tab. 30).

Pela simulação MENCFFH, não há uma clara delimitação dos quatro grupos definidos: **G1**: Costa Rica + RO + PA (Carajás, Parauapebas, Oriximiná) + CE (Ubajara) + AL; **G2**: BA + ES; **G3**: AM + PA (Tomé-Açu) + MA e **G4**: CE (Guaramiranga) (Fig. 30). Verifica-se estruturação genética entre estes eles ($F_{st} = 0,52933$; $P = 0,0000$), porém, a maior parte da variação (47,07%) está presente dentro dos grupos (Tab. 31). A estatística F_s de Fu indica que as sequências dos indivíduos dos grupos G1 (-7,75632; $P = 0,00300$) e G3 (-3,71383; $P = 0,00700$) não evoluem de forma neutra.

Não há uma clara delimitação das cinco populações definidas pela simulação MECFFH [**G1**: RO + AM (Nhamundá) + PA (Oriximiná); **G2**: PA (Carajás e Tomé-Açu) + MA; **G3**: CE + AL; **G4**: BA + ES e **G5**: Costa Rica + AM (Novo Aripuanã) (Fig. 31)] e estes se encontram estruturados ($F_{st} = 0,52790$; $P = 0,0000$), porém a maior parte da variação (47,21%) está dentro dos grupos (Tab. 32). A estatística F_s de Fu (-4,51784; $P = 0,00300$) indica que as sequências dos indivíduos de G1 não evoluem de forma neutra (Tab. 30).

Pela comparação entre o grupo da Mata Atlântica e Amazônia, verifica-se estruturação genética ($F_{st} = 0,55304$; $P = 0,0000$), com 38,96% da variação presente entre os grupos. Mais uma vez, a maior porcentagem de variação está presente dentro das populações (44,70%) (Tab. 34).

Na comparação entre os diferentes arranjos de grupos, aquele inferido pelo *NETWORK* é o que maximiza a diferença entre os grupos.

Tabela 27. Lista de haplótipos do gene COI de *Eulaema bombiformis* (H1 a H19) e *Eulaema niveofasciata* (H20 a H33) com os 38 sítios polimórficos. Os pontos (.) indicam igualdade com o haplótipo 1.

Haplótipo	Sítios polimórficos																																					
	9	18	36	69	72	87	102	117	132	144	150	168	183	189	195	225	240	261	270	272	282	297	303	315	327	330	333	369	375	414	415	447	453	484	504	513	522	531
H1	A	T	T	T	T	T	A	A	T	G	A	A	A	T	A	G	A	G	A	C	G	G	A	A	T	A	T	A	G	A	T	G	A	G	A	A	C	A
H2	.	C	C	.	.	A	G	.	.	A	.	G	.	.	.	A	.	A	.	.	A	A	C	.	A	.	.	A	T	.
H3	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	A	.	.	C	.	C	.	A	.	.	A	G
H4	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	A	.	.	C	.	C	.	A	.	.	A
H5	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	.	.	G	C	.	C	.	A	.	.	A
H6	.	C	.	.	.	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	A	C	.	A	.	.	A	T	.
H7	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	A	C	.	A	.	.	A
H8	.	.	C	.	.	A	.	.	.	A	.	.	.	C	.	G	G	A	.	.	A	A	.	.	C	.	C	.	A	.	.	A	T	.
H9	.	C	C	.	.	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	A	.	.	C	.	C	.	A	.	.	A	.	A	.	.	T	.
H10	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	A	.	.	C	.	C	.	A	.	.	A	.	A	.	.	T	.
H11	.	C	.	.	.	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	A	.	.	.	G	C	.	A	.	.	A	T	.
H12	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	A	G	.	C	.	C	.	A	.	.	A	T	.
H13	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	A	.	.	.	G	C	.	A	.	.	A	.	A	.	.	T	.
H14	.	C	C	.	.	A	.	.	.	A	G	A	G	A	.	.	A	A	C	.	A	G	.	A	T	.
H15	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	A	.	.	C	.	C	G	A	.	.	A	.	A	.	.	T	.
H16	.	.	C	.	.	A	.	.	C	A	A	G	A	G	.	A	A	.	.	.	G	C	.	A	.	.	A	.	A	.	.	T	.
H17	.	.	C	.	.	A	.	.	.	A	.	.	.	G	A	G	A	G	.	A	A	.	.	.	G	C	.	A	.	.	A	.	A	.	.	T	.	
H18	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	G	C	.	A	.	.	A	.	A	.	.	T	.
H19	.	.	C	.	.	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	A	.	.	C	.	C	G	A	.	.	A	T	.
H20	.	C	.	.	.	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	A	.	G	.	.	T	.	A	.	.	A	T	.
H21	.	C	.	.	.	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	A	.	.	C	.	C	.	A	.	.	A	.	A	.	.	T	.
H22	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	C	.	A	.	.	A	.	.	G	G	.	G
H23	.	.	G	.	.	A	.	.	.	A	.	G	.	.	.	A	G	A	.	.	A	C	.	A	.	.	A	.	.	G	G	.	.
H24	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	A	C	.	A	.	.	A	.	.	.	G	.	.
H25	A	.	G	.	A	A	G	A	.	.	A	C	.	A	.	.	A	.	.	G	G	.	.
H26	G	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	A	T	.	A	.	C	A	.	.	.	G	.	.

Haplótipo	Sítios polimórficos																																					
	9	18	36	69	72	87	102	117	132	144	150	168	183	189	195	225	240	261	270	272	282	297	303	315	327	330	333	369	375	414	415	447	453	484	504	513	522	531
H27	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	C	.	A	.	.	A	.	.	G	G	.	.
H28	C	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	C	.	A	.	.	A	.	.	G	G	.	.
H29	A	.	.	.	G	A	G	A	.	.	A	A	C	.	A	.	.	A	.	.	.	G	.	.
H30	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	A	C	.	A	.	.	A	.	.	G	G	.	.
H31	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	A	C	.	A	.	.	A	.	.	.	G	T	.
H32	A	.	.	.	A	G	G	A	.	T	A	C	.	A	.	.	A	.	.	G	G	.	G
H33	.	.	.	C	.	A	.	.	.	A	A	G	A	.	.	A	C	.	A	.	.	A	.	.	G	G	.	.

Tabela 28. Número de machos (n) e haplótipos de *Eulaema niveofasciata* e *Eulaema bombiformis* das 20 localidades amostradas. Haplótipos destacados em negrito são haplótipos de cópia única. Para cada localidade, Hd = diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica. (σ = desvio-padrão; n/a = não se aplica)

Espécie	Localidade	n	Haplótipo	$Hd \pm \sigma$	$\pi \pm \sigma$
<i>Eulaema niveofasciata</i>	Conceição da Barra, ES	5	H24(2), H27(2), H28(1)	0,8000 \pm 0,1640	0,002867 \pm 0,002363
	Guaramiranga, CE	2	H20(2)	0	0
	Igrapiúna, BA	6	H24(1), H25(1) , H26(1), H27(2), H28(1)	0,9333 \pm 0,1217	0,004898 \pm 0,003478
	Ilhéus, BA	3	H24(2), H29(1)	0,6667 \pm 0,3143	0,001195 \pm 0,001490
	Itamaraju, BA	2	H24(1), H30(1)	1,0000 \pm 0,5000	0,001792 \pm 0,002534
	Linhares, ES	4	H26(1), H27(1)	0,5000 \pm 0,2652	0,004480 \pm 0,003607
	Murici, AL	3	H22(1), H23(2)	0,6667 \pm 0,3143	0,002389 \pm 0,002455
	Porto Seguro, BA	9	H22(1), H24(3), H27(2), H28(3)	0,8056 \pm 0,0889	0,003086 \pm 0,002245
	Sooretama, ES	4	H24(2), H27(1), H28(1)	0,8333 \pm 0,2224	0,003286 \pm 0,002805
	Ubajara, CE	4	H20(3), H21(1)	0,5000 \pm 0,2652	0,003591 \pm 0,003012
	Una, BA	6	H22(1), H26(1), H27(1), H28(1), H31(1), H32(1)	1,0000 \pm 0,0962	0,007049 \pm 0,004739
	Uruçuca, BA	4	H22(1), H24(1), H31(1), H33(1)	1,0000 \pm 0,1768	0,005078 \pm 0,004005
<i>Eulaema bombiformis</i>	Carajás, PA	7	H9(1), H10(2), H11(1) , H12(1) , H13(1) , H14(1)	1,0000 \pm 0,5000	0,001738 \pm 0,002455
	Carutapera, MA	1	H19(1)	n/a	n/a
	Nhamundá, AM	3	H4(1) , H5(1) , H6(1)	1,0000 \pm 0,2722	0,005974 \pm 0,005193
	Novo Aripuanã, AM	2	H7(1) , H8(1)	1,0000 \pm 0,5000	0,008961 \pm 0,009816
	Oriximiná, PA	4	H15(1) , H16(1) , H17(1) , H18(1)	1,0000 \pm 0,1768	0,007766 \pm 0,005781
	Porto Velho, RO	2	H2(1) , H3(1)	1,0000 \pm 0,5000	0,014337 \pm 0,015207
	Tomé-Açu, PA	1	H9(1)	1,0000 \pm 0,0000	0
	Costa Rica	1	H1(1)	1,0000 \pm 0,0000	0
Total de espécimes		73			

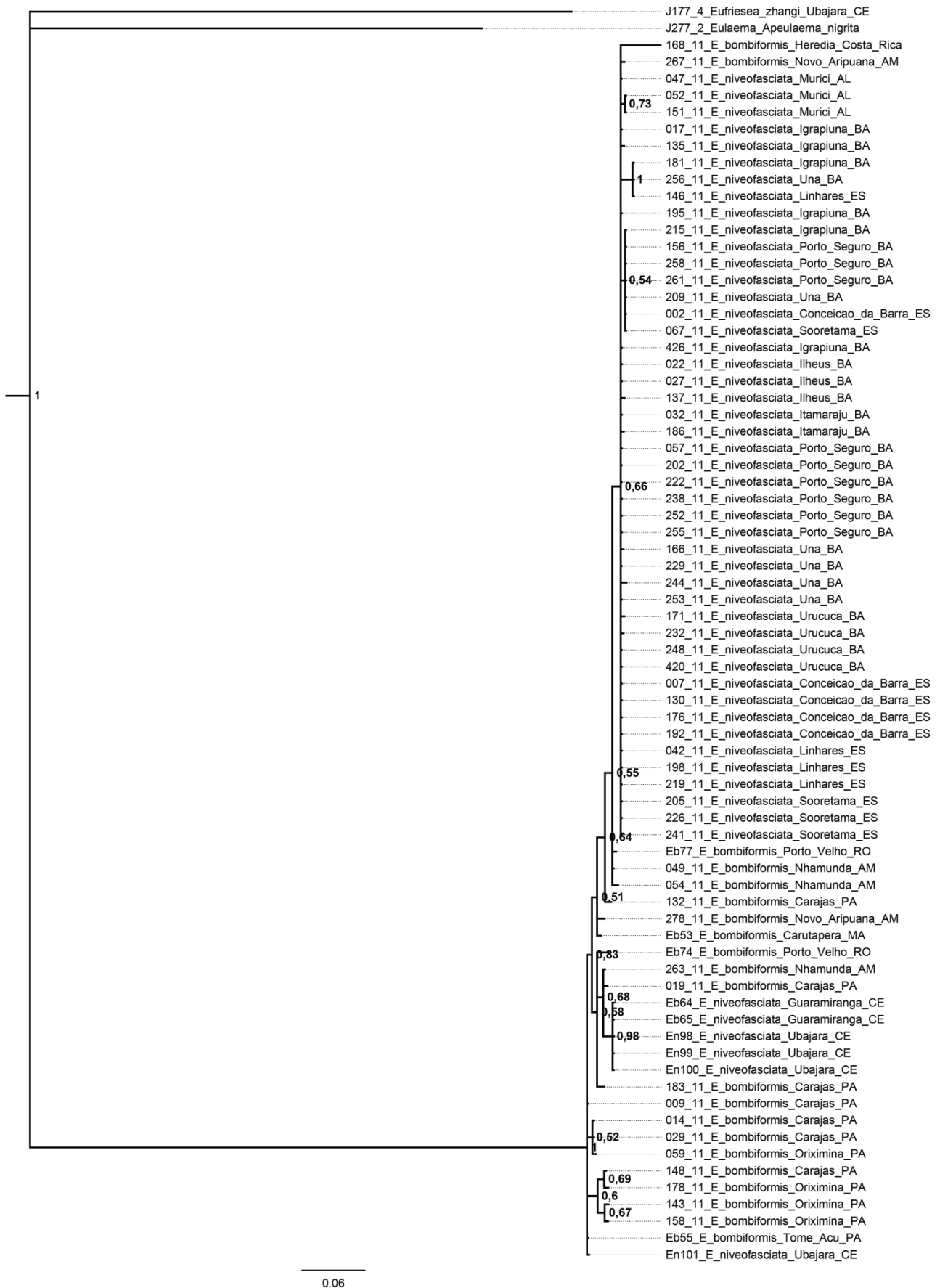


Figura 28. Filograma da árvore de consenso resultante da inferência Bayesiana para 558 pb do COI de *Eulaema bombiformis* e *Eulaema niveofasciata* e duas espécies do grupo externo (*Eufriesea zhangi* e *Eulaema nigrita*). Os valores de probabilidade posterior são apresentados nos nós da árvore.

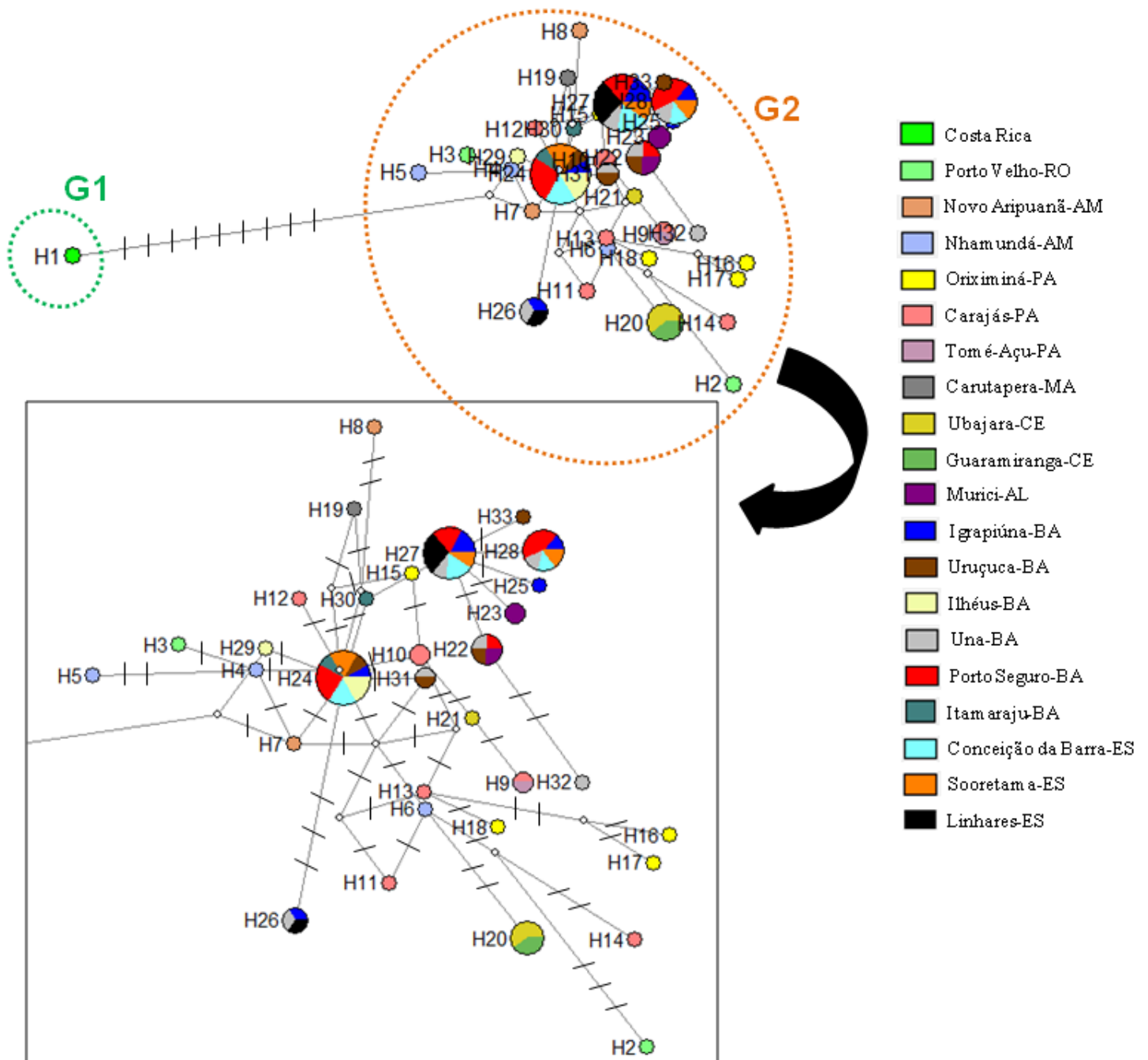


Figura 29. Rede de haplótipos *Median-Joining* do gene COI de *Eulaema bombiformis* e *Eulaema niveofasciata* e seus principais agrupamentos. Cada círculo na rede de haplótipos corresponde a um haplótipo e o seu tamanho é proporcional à frequência do haplótipo. Cada traço na linha que conecta um haplótipo ao outro se refere a um passo mutacional. As cores representam as localidades das amostras e os códigos dos haplótipos estão de acordo com as Tabelas 27 e 28. O grupo destacado em verde (G1) é formado por um haplótipo da Costa Rica e aquele destacado em laranja (G2) possui haplótipos da Amazônia e da Mata Atlântica.

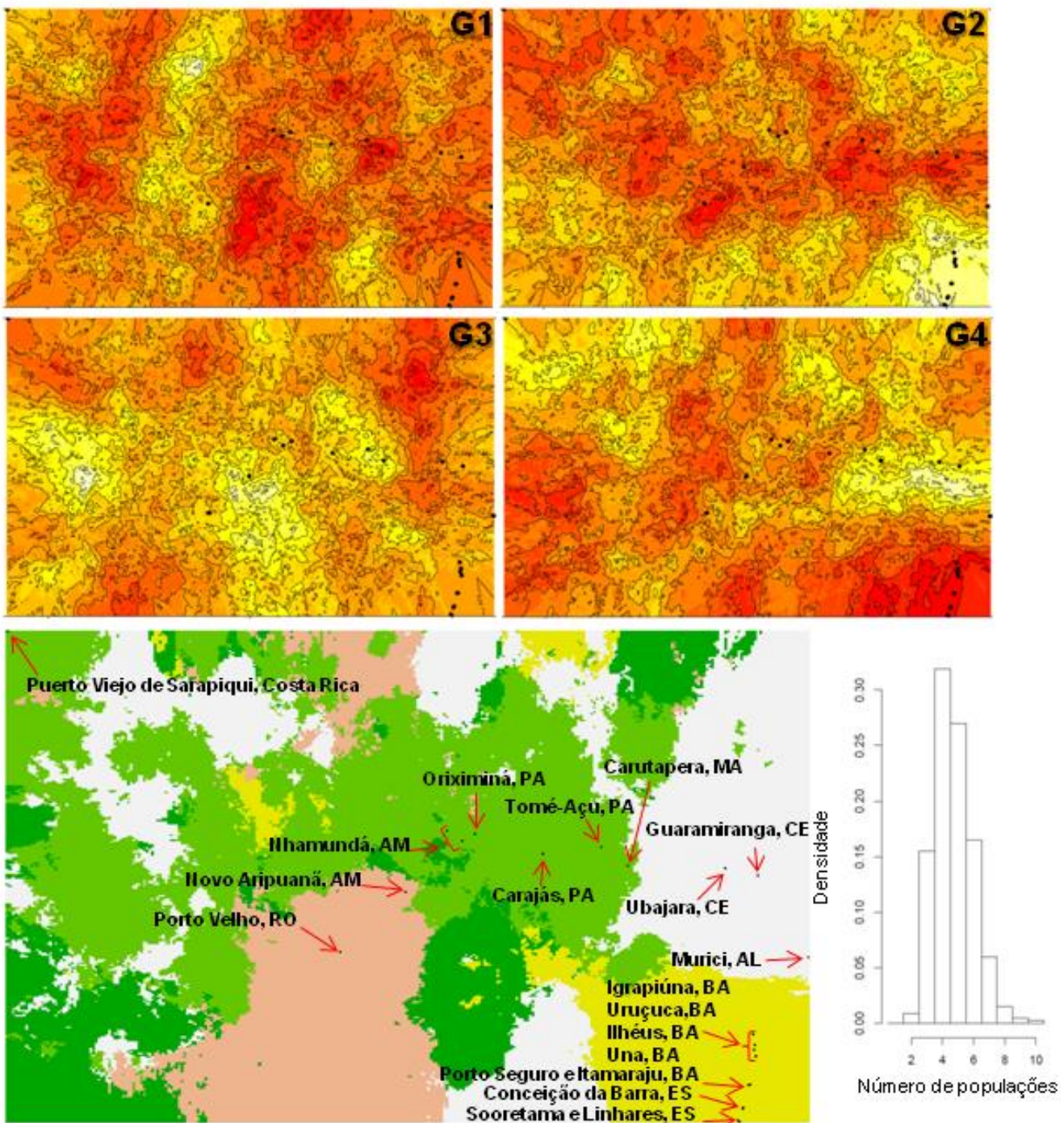


Figura 30. Mapas de probabilidade posterior de designação de quatro diferentes populações [G1: Costa Rica + RO + PA (parte) + Ubajara-CE + AL; G2: BA + ES; G3: AM + Tomé-Açu-PA + MA e G4: Guaramiranga-CE] pelo modelo espacial não correlacionado à frequência dos haplótipos implementado no Geneland para o par *Eulaema bombiformis* e *Eulaema niveofasciata*. Nas quatro figuras superiores os eixos horizontais e verticais representam as coordenadas longitudinais e latitudinais, respectivamente, e os pontos pretos representam as localidades amostradas, conforme apontado no mapa inferior à esquerda. A cor branca indica maiores valores de probabilidade e, na medida em que a cor se aproxima do vermelho, a probabilidade decresce. O gráfico inferior à direita representa o número mais provável de populações ($K = 4$) após a simulação MCMC.

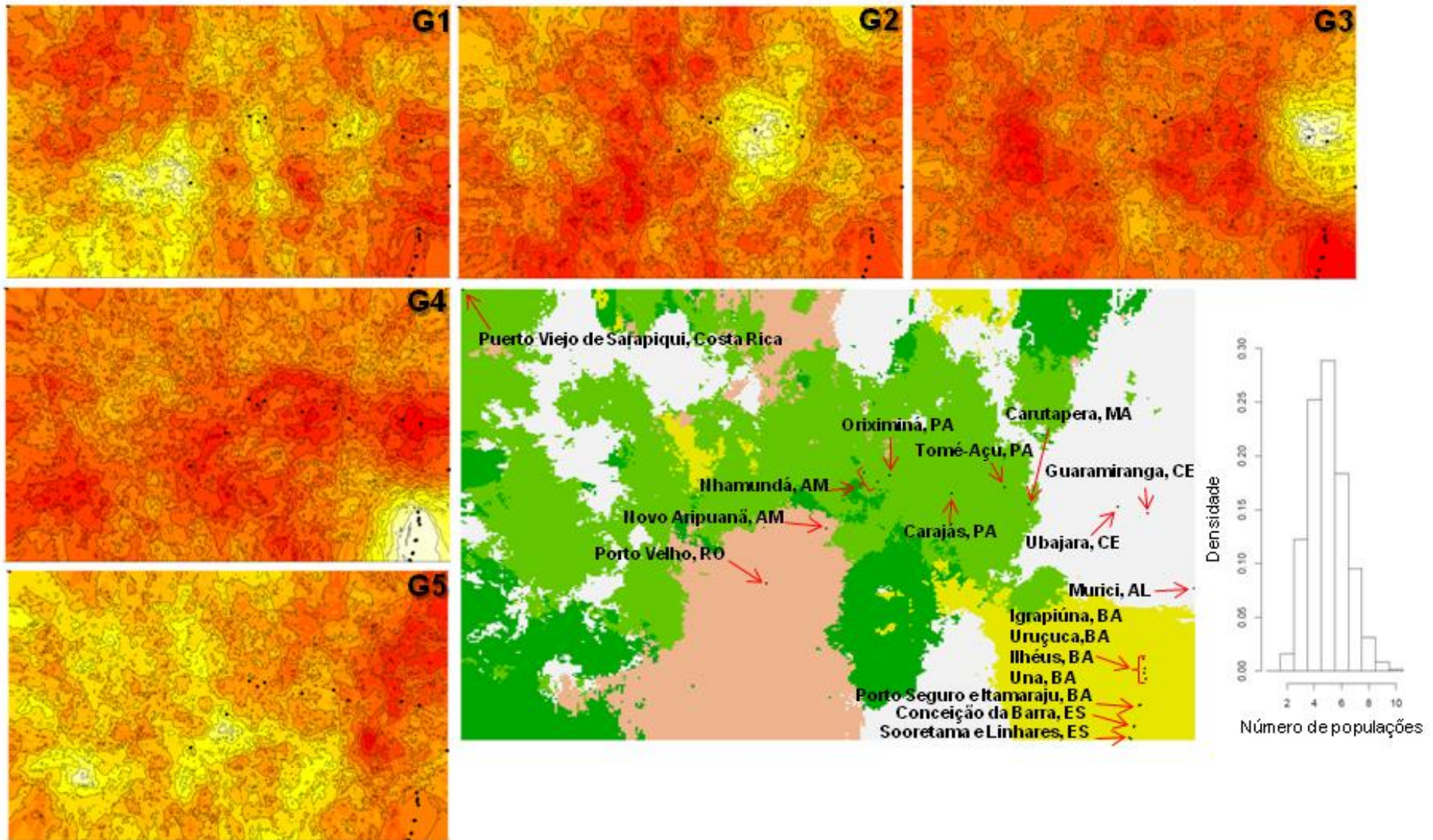


Figura 31. Mapas de probabilidade posterior de designação de cinco diferentes populações [G1: RO + Nhamundá-AM + Oriximiná-PA; G2: PA (Carajás e Tomé-Açu) + MA; G3: CE + AL; G4: BA + ES e G5: Costa Rica + Novo Aripuanã-AM.] pelo modelo espacial correlacionado à frequência dos haplótipos implementado no Geneland para o par *Eulaema bombiformis* e *Eulaema niveofasciata*. Nas três figuras superiores e nas duas à esquerda os eixos horizontais e verticais representam as coordenadas longitudinais e latitudinais, respectivamente, e os pontos pretos representam as localidades amostradas, conforme apontado no mapa inferior. A cor branca indica maiores valores de probabilidade e, na medida em que a cor se aproxima do vermelho, a probabilidade decresce. O gráfico inferior à direita representa o número mais provável de populações ($K = 5$) após a simulação MCMC.

Tabela 29. Índices de diversidade para os grupos do par de espécies *Eulaema niveofasciata* e *Eulaema bombiformis*: n = número de indivíduos, H = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica, π = diversidade nucleotídica, S = número de sítios polimórficos. (σ = desvio-padrão; G = grupo)

Grupo	n	H	Hd $\pm \sigma$	$\pi \pm \sigma$	S
Simulação MENC FH					
(Geneland): 4 grupos					
G1: Costa Rica, RO, PA (parte), Ubajara-CE, AL	21	17	0,9762 \pm 0,0230	0,011234 \pm 0,006200	31
G2: BA, ES	43	11	0,8350 \pm 0,0323	0,003902 \pm 0,002448	13
G3: AM, Tomé-Açu-PA, MA	7	7	1,0000 \pm 0,0764	0,006827 \pm 0,004471	10
G4: Guaramiranga-CE	2	1	0	0	0
Simulação MEC FH					
(Geneland): 5 grupos					
G1: RO, Nhamundá-AM, Oriximiná-PA	9	9	1,0000 \pm 0,0524	0,009956 \pm 0,005991	16
G2: PA (Carajás e Tomé-Açu), MA	9	7	0,9444 \pm 0,0702	0,006173 \pm 0,003943	9
G3: CE, AL	9	4	0,6944 \pm 0,1470	0,008378 \pm 0,005140	11
G4: BA, ES	43	11	0,8350 \pm 0,0323	0,003902 \pm 0,002448	13
G5: Costa Rica + Novo Aripuanã-AM	3	3	1,0000 \pm 0,2722	0,016726 \pm 0,013244	14
NETWORK: 2 grupos					
G1: Costa Rica	1	1	1,0000 \pm 0,0000	0	0
G2: RO, AM, PA, MA, CE, AL, BA, ES	72	32	0,9354 \pm 0,0154	0,008007 \pm 0,004425	33
TOTAL	73	33	0,9372 \pm 0,0151	0,008380 \pm 0,004604	38

Tabela 30. Testes de neutralidade seletiva para os grupos do par de espécies *Eulaema niveofasciata* e *Eulaema bombiformis*: *D*, teste de Tajima e *F_s*, teste de Fu. *s*: número de transições; *v*: número de transversões; Subst.: número de substituições.

Grupo	Teste de neutralidade		<i>s</i>	<i>v</i>	Subst.
	<i>D</i>	<i>F_s</i> de Fu			
Simulação MENC FH					
(Geneland): 4 grupos					
G1: Costa Rica, RO, PA (parte), Ubajara-CE, AL	-1,06401 (P: 0,14400)	-7,75632 (P: 0,00300)**	30	1	31
G2: BA, ES	-0,84785 (P: 0,19700)	-2,74341 (P: 0,10600)	13	0	13
G3: AM, Tomé-Açu-PA, MA	-0,35772 (P: 0,38300)	-3,71383 (P: 0,00700)**	10	0	10
G4: Guaramiranga-CE	0,00000 (P: 1,0000)	-	0	0	0
Simulação MEC FH					
(Geneland): 5 grupos					
G1: RO, Nhamundá-AM, Oriximiná-PA	-0,27294 (P: 0,40100)	-4,51784 (P: 0,00300)**	16	0	16
G2: PA (Carajás e Tomé-Açu), MA	0,18487 (P: 0,57500)	-2,16546 (P: 0,07100)	9	0	9
G3: CE, AL	0,71921 (P: 0,79700)	2,41971 (P: 0,87400)	11	0	11
G4: BA, ES	-0,84785 (P: 0,21500)	-2,74341 (P: 0,09500)	13	0	13
G5: Costa Rica + Novo Aripuanã-AM	0,00000 (P: 0,69600)	1,06599 (P: 0,50300)	13	1	14
NETWORK: 2 grupos					
G1: Costa Rica	0,00000 (P: 1,0000)	-	0	0	0
G2: RO, AM, PA, MA, CE, AL, BA, ES	-1,10177 (P: 0,13600)	-18,27161 (P: 0,00000)**	33	0	33
TOTAL	-1,30046 (P: 0,07800)	-18,78343 (P: 0,00000)**	37	1	38

** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$

Tabela 31. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando **G1**: Costa Rica + RO + PA (parte) + Ubajara, CE + AL; **G2**: BA + ES; **G3**: AM + Tomé-Açu, PA + MA e **G4**: Guaramiranga, CE definidos pelo *Geneland* (simulação MENC FH) como grupos e as localidades de coleta como populações de *Eulaema niveofasciata* e *Eulaema bombiformis*.

Fonte de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	35,02
Entre populações dentro dos grupos	17,91
Dentro das populações	47,07
$F_{st} = 0,52933$; $p = 0,0000 \pm 0,0000$	

Tabela 32. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando **G1** (RO + parte AM + parte PA), **G2** (parte PA + MA), **G3** (CE + AL), **G4** (BA + ES) e **G5** (Costa Rica + parte AM) definidos pelo *Geneland* (simulação MEC FH) como grupos e as localidades de coleta como populações de *Eulaema niveofasciata* e *Eulaema bombiformis*.

Fonte de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	39,13
Entre populações dentro dos grupos	13,66
Dentro das populações	47,21
$F_{st} = 0,52790$; $p = 0,0000 \pm 0,0000$	

Tabela 33. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando **G1** (Costa Rica) e **G2** (restante das amostras) definidos pelo *NETWORK* como grupos e as localidades de coleta como populações de *Eulaema niveofasciata* e *Eulaema bombiformis*.

Fonte de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	63,09
Entre populações dentro dos grupos	15,71
Dentro das populações	21,20
$F_{st} = 0,78801$; $p = 0,0000 \pm 0,0000$	

Tabela 34. AMOVA usando o modelo de distância Tamura e Nei, considerando **G1** (Mata Atlântica) e **G2** (Amazônia) definidos como grupos e as localidades de coleta como populações de *Eulaema niveofasciata* e *Eulaema bombiformis*.

Fonte de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	38,96
Entre populações dentro dos grupos	16,35
Dentro das populações	44,70
$F_{st} = 0,55304$; $p = 0,0000 \pm 0,0000$	

Tabela 35. Divergência genética média entre os grupos de Euglossina calculada pelo modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros (K2p). Os valores acima da diagonal são os erros padrões e abaixo, as distâncias. Os nomes dos táxons estão de acordo com os clados inferidos através da análise bayesiana, com exceção do par *E. bombiformis*/*E. niveofasciata* e do grupo externo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. <i>Euglossa (Glossurella) parvula*</i>		0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,015	0,016	0,017	0,017	0,009	0,008	0,007
2. <i>Euglossa (Euglossa) "bidentata 1"</i>	0,077		0,005	0,006	0,002	0,002	0,007	0,007	0,008	0,006	0,007	0,014	0,017	0,017	0,017	0,012	0,012	0,011
3. <i>Euglossa (Euglossa) "bidentata 2"</i>	0,075	0,015		0,005	0,006	0,006	0,006	0,006	0,007	0,005	0,006	0,014	0,016	0,017	0,017	0,012	0,011	0,011
4. <i>Euglossa (Euglossa) "marianae 2"</i>	0,072	0,018	0,012		0,005	0,005	0,006	0,005	0,007	0,004	0,005	0,013	0,016	0,016	0,017	0,012	0,011	0,011
5. <i>Euglossa (Euglossa) "marianae 1"</i>	0,075	0,002	0,017	0,016		0,000	0,007	0,006	0,008	0,006	0,006	0,014	0,017	0,017	0,017	0,012	0,012	0,011
6. <i>Euglossa (Euglossa) "mixta 2"</i>	0,075	0,002	0,017	0,016	0,000		0,007	0,006	0,008	0,006	0,006	0,014	0,017	0,017	0,017	0,012	0,012	0,011
7. <i>Euglossa (Euglossa) "mixta 3"</i>	0,072	0,028	0,021	0,021	0,026	0,026		0,006	0,007	0,006	0,006	0,014	0,016	0,016	0,016	0,012	0,012	0,011
8. <i>Euglossa (Euglossa) "mixta 1"</i>	0,073	0,021	0,015	0,014	0,019	0,019	0,019		0,007	0,005	0,005	0,013	0,016	0,016	0,017	0,012	0,012	0,012
9. <i>Euglossa (Euglossa) calycina</i>	0,077	0,035	0,028	0,028	0,032	0,032	0,029	0,028		0,007	0,008	0,014	0,017	0,016	0,017	0,012	0,012	0,011
10. <i>Euglossa (Euglossa) iopyrrha</i>	0,070	0,019	0,013	0,012	0,017	0,017	0,017	0,011	0,028		0,005	0,013	0,016	0,016	0,016	0,012	0,012	0,011
11. <i>Euglossa (Euglossa) botocuda</i>	0,070	0,021	0,015	0,014	0,019	0,019	0,019	0,013	0,030	0,011		0,013	0,016	0,016	0,017	0,012	0,012	0,011
12. <i>Eufriesea zhangi*</i>	0,103	0,098	0,091	0,088	0,096	0,096	0,093	0,084	0,089	0,086	0,082		0,015	0,015	0,016	0,015	0,015	0,015
13. <i>Euleama (Apeulaema) nigrita*</i>	0,125	0,128	0,120	0,116	0,125	0,125	0,115	0,113	0,128	0,115	0,115	0,105		0,015	0,016	0,017	0,016	0,016
14. <i>Eulaema (Eulaema) bombiformis</i>	0,128	0,140	0,138	0,134	0,138	0,138	0,130	0,130	0,131	0,128	0,130	0,122	0,114		0,003	0,018	0,016	0,017
15. <i>Eulaema (Eulaema) niveofasciata</i>	0,129	0,145	0,142	0,136	0,142	0,142	0,134	0,135	0,135	0,132	0,135	0,128	0,116	0,012		0,019	0,017	0,018
16. <i>Euglossa (Glossurella) clausi</i>	0,039	0,073	0,074	0,071	0,071	0,071	0,074	0,077	0,072	0,075	0,075	0,098	0,120	0,145	0,148		0,007	0,009
17. <i>Euglossa (Glossurella) moratoi</i>	0,034	0,072	0,066	0,067	0,070	0,070	0,070	0,068	0,069	0,070	0,070	0,097	0,114	0,131	0,135	0,026		0,009
18. <i>Euglossa (Glossurella) crassipunctata s. str.</i>	0,028	0,066	0,063	0,060	0,063	0,063	0,066	0,066	0,066	0,063	0,063	0,098	0,120	0,141	0,144	0,039	0,036	

* Espécies do grupo externo incluídas nesta análise.

Tabela 36. Divergência genética média entre os grupos de Euglossina calculada pelo método de distância *p-distance*. Os valores acima da diagonal são os erros padrões e abaixo, as distâncias. Os nomes dos táxons estão de acordo com os clados inferidos através da análise bayesiana, com exceção do par *E. bombiformis*/*E. niveofasciata* e do grupo externo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. <i>Euglossa (Glossurella) parvula</i> *		0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,013	0,014	0,014	0,014	0,009	0,008	0,007
2. <i>Euglossa (Euglossa) "bidentata 1"</i>	0,073		0,005	0,006	0,002	0,002	0,007	0,006	0,008	0,006	0,006	0,013	0,014	0,015	0,015	0,011	0,011	0,010
3. <i>Euglossa (Euglossa) "bidentata 2"</i>	0,071	0,015		0,004	0,006	0,006	0,006	0,005	0,007	0,005	0,005	0,012	0,014	0,015	0,015	0,011	0,011	0,010
4. <i>Euglossa (Euglossa) "marianae 2"</i>	0,068	0,018	0,012		0,005	0,005	0,006	0,005	0,007	0,004	0,005	0,012	0,013	0,015	0,015	0,011	0,010	0,010
5. <i>Euglossa (Euglossa) "marianae 1"</i>	0,071	0,002	0,017	0,016		0,000	0,007	0,006	0,008	0,006	0,006	0,013	0,014	0,015	0,015	0,011	0,011	0,010
6. <i>Euglossa (Euglossa) "mixta 2"</i>	0,071	0,002	0,017	0,016	0,000		0,007	0,006	0,008	0,006	0,006	0,013	0,014	0,015	0,015	0,011	0,011	0,010
7. <i>Euglossa (Euglossa) "mixta 3"</i>	0,069	0,027	0,021	0,021	0,025	0,025		0,006	0,007	0,005	0,006	0,012	0,013	0,014	0,015	0,011	0,011	0,010
8. <i>Euglossa (Euglossa) "mixta 1"</i>	0,069	0,021	0,015	0,014	0,019	0,019	0,018		0,007	0,004	0,005	0,012	0,013	0,014	0,015	0,011	0,011	0,011
9. <i>Euglossa (Euglossa) calycina</i>	0,073	0,034	0,027	0,027	0,032	0,032	0,028	0,027		0,007	0,007	0,012	0,014	0,014	0,015	0,011	0,010	0,010
10. <i>Euglossa (Euglossa) iopyrrha</i>	0,067	0,019	0,013	0,011	0,017	0,017	0,017	0,010	0,027		0,004	0,012	0,013	0,014	0,014	0,011	0,011	0,010
11. <i>Euglossa (Euglossa) botocuda</i>	0,067	0,021	0,015	0,014	0,019	0,019	0,019	0,013	0,030	0,010		0,012	0,013	0,014	0,015	0,011	0,011	0,010
12. <i>Eufriesea zhangii</i> *	0,096	0,092	0,086	0,083	0,090	0,090	0,087	0,079	0,084	0,082	0,077		0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013
13. <i>Euleama (Apeulaema) nigrita</i> *	0,115	0,117	0,111	0,107	0,115	0,115	0,106	0,105	0,117	0,107	0,107	0,098		0,013	0,014	0,014	0,014	0,014
14. <i>Eulaema (Eulaema) bombiformis</i>	0,118	0,128	0,126	0,122	0,126	0,126	0,119	0,119	0,120	0,118	0,119	0,112	0,105		0,003	0,015	0,014	0,015
15. <i>Eulaema (Eulaema) niveofasciata</i>	0,119	0,132	0,130	0,124	0,130	0,130	0,123	0,123	0,124	0,121	0,123	0,117	0,107	0,012		0,015	0,015	0,015
16. <i>Euglossa (Glossurella) clausi</i>	0,038	0,070	0,071	0,068	0,067	0,067	0,071	0,073	0,069	0,071	0,071	0,092	0,111	0,131	0,134		0,006	0,008
17. <i>Euglossa (Glossurella) moratoi</i>	0,033	0,069	0,063	0,064	0,067	0,067	0,067	0,065	0,066	0,067	0,067	0,091	0,105	0,120	0,123	0,025		0,008
18. <i>Euglossa (Glossurella) crassipunctata s. str.</i>	0,027	0,063	0,061	0,058	0,061	0,061	0,063	0,063	0,063	0,061	0,061	0,092	0,111	0,128	0,131	0,038	0,036	

* Espécies do grupo externo incluídas nesta análise.

Tabela 37. Divergência genética média dentro dos grupos (d) de Euglossina calculada pelo modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros (K2p). Para os grupos que continham apenas um indivíduo, não foi possível calcular esta distância. Os nomes dos táxons estão de acordo com os clados inferidos através da análise bayesiana, com exceção do par *E. bombiformis*/*E. niveofasciata* e do grupo externo. O cálculo através do método *p-distance* gerou resultados idênticos ao K2p.

Táxon	d	Erro padrão
1. <i>Euglossa (Glossurella) parvula</i> *	-	-
2. <i>Euglossa (Euglossa) "bidentata 1"</i>	0	0
3. <i>Euglossa (Euglossa) "bidentata 2"</i>	-	-
4. <i>Euglossa (Euglossa) "marianae 2"</i>	0,003869	0,0015
5. <i>Euglossa (Euglossa) "marianae 1"</i>	0	0
6. <i>Euglossa (Euglossa) "mixta 2"</i>	0	0
7. <i>Euglossa (Euglossa) "mixta 3"</i>	0,004208	0,002
8. <i>Euglossa (Euglossa) "mixta 1"</i>	0	0
9. <i>Euglossa (Euglossa) calycina</i>	0,000493	0,0003
10. <i>Euglossa (Euglossa) iopyrrha</i>	-	-
11. <i>Euglossa (Euglossa) botocuda</i>	0	0
12. <i>Eufriesea zhangii</i> *	-	-
13. <i>Euleama (Apeulaema) nigrita</i> *	-	-
14. <i>Eulaema (Eulaema) bombiformis</i>	0,00977	0,0025
15. <i>Eulaema (Eulaema) niveofasciata</i>	0,005459	0,0019
16. <i>Euglossa (Glossurella) clausi</i>	0,003646	0,0013
17. <i>Euglossa (Glossurella) moratoi</i>	0,002808	0,0014
18. <i>Euglossa (Glossurella) crassipunctata s. str.</i>	0	0

* Espécies do grupo externo incluídas nesta análise.

5. Discussão

5.1. O papel da diagonal árida da América do Sul na diferenciação de populações/especiação de *Euglossina* dos domínios morfoclimáticos da Amazônia e da Mata Atlântica.

As evidências encontradas neste estudo indicam que não existe uma única sequência de eventos de vicariância que explique os padrões de diferenciação/especiação em todos os grupos de *Euglossina* analisados. Dos quatro casos estudados, três apresentam evidência de separação entre populações/espécies da Floresta Amazônica e da Floresta Atlântica (grupo *crassipunctata*; par *E. calycina* x *E. mixta*; par *E. marianae* x *E. bidentata*) e um (*E. bombiformis* x *E. niveofasciata*), não.

Nos três primeiros casos, a diagonal árida da América do Sul parece estar, na atualidade, isolando pares de populações/espécies. No entanto, a verificação do seu papel como fator causal das separações iniciais desses pares exigiria a estimativa da idade dessas separações. Os dados da literatura (Ramírez *et al.*, 2010) sugerem que o tempo mínimo de divergência envolvidos tenham ocorrido há no máximo 10 Ma. A idade mínima para o tempo máximo de divergência entre *E. bidentata* e sua espécie irmã, por exemplo, foi estimada em torno de 2,9 Ma (considerando os intervalos de confiança da estimativa, isto poderia significar início do Pleistoceno) e a idade mínima de *E. mixta* (considerando amostras da Mata Atlântica e, portanto, de *E. calycina*) foi estimada em aproximadamente 5,1 Ma (Plioceno). No caso de “*E. crassipunctata*” (sem amostras da Mata Atlântica, e, portanto, sem *E. clausi*), a estimativa de idade mínima, indica que os eventos de vicariância teriam ocorrido há no máximo 10 Ma neste grupo (Mioceno superior).

As filogenias obtidas sugerem áreas geográficas coincidentes com áreas de endemismo identificadas para outros grupos de insetos. Para o par *E. calycina/E. mixta*, a separação entre a região Atlântica e o restante, inicialmente, seguida da separação entre áreas da Amazônia e do Chocó-CA (a localização destas áreas e outras mencionadas a seguir é mostrada na Fig. 3) coincide com a ordem de separação entre as áreas de endemismo indicadas para alguns grupos de espécies de *Geotrigona* e *Paratrigona* (Meliponina – Camargo, 1996; Camargo e Moure, 1994, 1996). No estudo comparativo da história biogeográfica de diferentes grupos de insetos sul-americanos, Sigrist e Carvalho (2009) também identificaram uma separação basal entre as florestas Amazônica e Atlântica, sendo o aumento da aridez e a formação do Cerrado no Terciário apontados como os responsáveis por esta separação. Considerando que o Cerrado, muito similar ao

atual, já existia na América do Sul setentrional no Mioceno (Van der Hammen, *apud* Colli, 2005) e que *E. mixta* (e *E. calycina*) exista há no mínimo 5,1 Ma (Ramírez *et al.*, 2010), existe a possibilidade de que a diagonal seca da América do Sul (em uma de suas várias ocorrências, a partir do final do Mioceno) seja o fator causal das separações iniciais entre as populações amazônicas e atlânticas neste grupo.

Expandindo a discussão para além das áreas centrais deste estudo, o gene COI não indica uma separação entre os indivíduos de *E. mixta* de Rondônia e do Pará, que correspondem às áreas de endemismo SEAm e NAm [de acordo com Camargo (1996) e Amorim e Pires (1996)], respectivamente. Pela estimativa de idade mínima de *Euglossa mixta* (Plioceno) (Ramírez *et al.*, 2010), a barreira supostamente criada pela expansão dos mares epicontinentais do Mioceno inferior provavelmente ainda existia (Shephard *et al.*, 2010), porém ou esta barreira não promoveu a separação entre estas áreas de endemismo ou houve uma expansão desta espécie depois que esta barreira deixou de existir. O soerguimento dos Andes possivelmente atuou na separação entre os clados do Chocó-CA e o da Amazônia no Plio-Pleistoceno. Portanto, os dados sugerem que o que é chamado de *E. mixta*, hoje, possa, na realidade, ser um conjunto de duas (ou três) espécies, com uma espécie nova a ser descrita para a Amazônia, ficando o nome *E. mixta* restrito às populações da América Central. Além disso, há indícios de que na América Central exista outra espécie nova neste grupo. A condução de um estudo que inclua mais amostras das populações de *E. mixta* da América Central e outros marcadores moleculares seria importante neste caso.

Há indícios de que dentro de *E. marianae* e *E. bidentata* possa haver mais de uma espécie (*E. “marianae 1”*, *E. “marianae 2”*, *E. “bidentata 1”* e *E. “bidentata 2”*) e a diagonal árida da América do Sul parece estar isolando o par *E. “marianae 1”* e *E. “bidentata 1”*. Considerando a estimativa de idade mínima de *E. bidentata* há aproximadamente 2,9 Ma (Ramírez *et al.*, 2010), o evento de separação entre *E. “marianae 1”* e *E. “bidentata 1”* pode ter sido causado também pela formação da diagonal xérica da América do Sul durante o Pleistoceno.

Em relação às espécies do grupo *crassipunctata* verificou-se uma coincidência com o observado para alguns casos de *Geotrigona* (Camargo e Moure, 1996) e *Partamona* (Camargo e Pedro, 2003), com a sequência de eventos de separação no sentido contrário à do par *E. calycina/E. mixta*, com a quebra entre as áreas Atlântica e Amazônica posterior à quebra entre o Chocó-CA e o restante. Neste caso, considerando a estimativa de idade mínima de *Euglossa (Glossurella) “grupo crassipunctata”* em aproximadamente 14,7 Ma

(Mioceno médio) (Ramírez *et al.*, 2010), é possível que a transgressão do mar Maracaibo (Mioceno médio) tenha separado o SWAm+Chocó-CA do NAM+SEAm+Atl, seguido da separação entre o Chocó-CA do SWAm no Plio-Pleistoceno, com a elevação dos Andes equatoriais (Fig. 4). Posteriormente, as flutuações climáticas do Pleistoceno podem ter provocado a separação entre as áreas Atl e SEAm+NAm. As evidências encontradas neste estudo, portanto, dão suporte à hipótese de que a diagonal árida da América do Sul seja o fator causal da separação entre as populações ancestrais de *E. clausi* e *E. moratoi*.

Através das análises do gene COI não foi possível obter um detalhamento da sequência de eventos de vicariância dentro da Mata Atlântica para *E. clausi*. No entanto, o grande suporte verificado para este ramo apoia a hipótese de que as áreas endêmicas da Mata Atlântica formam um único agrupamento monofilético, como sugerido para outros grupos de insetos (Sigrist e Carvalho, 2009).

A baixa estruturação da filogenia obtida com o gene COI para o par *E. niveofasciata*/*E. bombiformis* poderia indicar que há dispersão de indivíduos por entre as florestas Atlântica e Amazônica, sugerindo que a diagonal árida não representa uma barreira para estes organismos. Alguns estudos já verificaram que o tamanho do corpo está correlacionado à capacidade de voo de várias espécies de abelhas (Greenleaf *et al.*, 2007). *Eulaema* são abelhas robustas e sua grande capacidade de vôo já foi verificada (Janzen, 1971; Dick *et al.*, 2004). Com isso, processos como o isolamento geográfico, a extinção e a especiação alopátrica neste grupo de abelhas podem ser mais difíceis de ocorrer (Ramírez *et al.*, 2010). Além disto, durante as coletas feitas no PARNA de Ubajara, Ceará, todos os indivíduos de *E. niveofasciata* foram capturados em áreas de clareiras ou de borda da mata, apesar de um esforço de coleta ter sido despendido em pontos mais internos da mata (Cardoso *et al.*, dados não publicados). Isto seria um indício de que *E. niveofasciata*, ou pelo menos os machos desta espécie, tem tolerância à borda de mata e poderiam utilizar as matas de galeria como corredores para dispersão dentro da diagonal seca e que eles talvez possam transitar entre grandes fragmentos de floresta. No entanto, *Eulaema bombiformis*, apesar de ser uma espécie de grande porte, apresentou estruturação genética entre localidades ao longo dos Andes (Dick *et al.*, 2004) e entre fragmentos florestais afastados no máximo por 14 Km na Costa Rica, resultados estes que sugerem que o fluxo gênico deve ser mais restrito nesta espécie (Suni e Brosi, 2012). Uma possível explicação levantada por Suni e Broni (2012) sugere que abelhas maiores e escuras, como *E. bombiformis*, estariam menos propensas a dispersar entre fragmentos por serem mais visíveis à predadores (*e.g.* aves) em áreas mais abertas. Além disto, o compartilhamento de

haplótipos não foi verificado em relação a este par, o que enfraquece a hipótese de fluxo gênico atual.

Embora o gene COI venha se mostrando uma ferramenta útil para distinção de espécies proximamente relacionadas, inclusive em abelhas (*e.g.* Kambhampati *et al.*, 1996; Hebert *et al.*, 2003 Kuhlmann *et al.*, 2007; Gibbs, 2009), pode ser que em casos de separações muito recentes, as populações divergentes mantenham polimorfismos ancestrais e não acumulem mutações neste gene específico (Dick *et al.*, 2004). Portanto, a separação incompleta de haplótipos ancestrais pode ser uma hipótese alternativa explicativa para este tipo de resultado, assim como foi sugerido por Dick *et al.* (2004) quando se depararam com a filogenia “reticulada” do gene COI entre duas espécies do grupo *analis* (*E. mixta* e *E. cognata*). Considerando que a estimativa de idade mínima para o tempo máximo de divergência entre *E. bombiformis* e sua espécie irmã seja entre 8,2 – 12,4 Ma (Mioceno superior), como estimado por Ramírez *et al.* (2010), os eventos de vicariância que potencialmente causaram a separação entre *E. bombiformis* e *E. niveofasciata* ocorreram há no máximo 12,4 Ma, porém considerando os dados aqui apresentados, esta separação pode ter sido muito mais recente, no Pleistoceno.

5.2. O grau de diferenciação entre as espécies é compatível com as hipóteses correntes sobre o tempo de isolamento das Florestas Amazônica e Atlântica?

Os valores de divergência genética média ($K2p$ e p -distance) encontrados entre pares de espécies de abelhas do mesmo gênero neste estudo são de aproximadamente 4% para *Euglossa* e, de 8%, para *Eulaema*, valores relativamente baixos ou coincidentes com os menores valores encontrados na grande maioria das comparações (93% de 2993 comparações) entre pares de espécies congênicas de Hymenoptera [8% e 16% de divergência (p -distance)] (Hebert *et al.*, 2003). Ao comparar pares de espécies de um mesmo subgênero, estes valores são ainda menores [3,4% ($\pm 0,005$) para *Euglossa* (*Glossurella*) e 1,9% ($\pm 0,008$) para *Euglossa* (*Euglossa*)] e, entre os quatro pares de espécies analisados, as divergências genéticas não ultrapassaram os 4%.

Embora, aparentemente, sejam raros os valores de divergência interespecífica em Hymenoptera entre 0% e 4% (Hebert *et al.*, 2003), eles têm sido encontrados entre espécies proximamente relacionadas de abelhas, como os encontrados por Gibbs (2009) entre duas espécies de Halictidae (*Lasioglossum tegulare* e *L. puteulanum*, 1,7%) e por Dick *et al.* (2004) entre espécies de Euglossina ao longo dos Andes. Assim, os valores encontrados

entre as espécies estudadas aqui, podem ser um reflexo do isolamento reprodutivo recente (Hebert *et al.*, 2003), o que é compatível com a hipótese de separação mais recente entre as florestas Atlântica e Amazônica.

Para o par *E. niveofasciata/E. bombiformis*, para o qual se encontrou a mais baixa divergência entre as espécies estudadas aqui (1,2%), sugere-se que a separação seja ainda mais recente que a dos outros pares, com a possibilidade de ter ocorrido com a separação entre as florestas Atlântica e Amazônica no início do período colonial do Brasil, quando supostamente houve o desflorestamento do último contato entre estes dois domínios florestais pelo litoral nordestino (Coimbra-Filho e Câmara, 1996). Entretanto, considerando a taxa de substituição do gene COI (1,2–1,5% por milhão de anos) calibrada para outros insetos (Caccone e Sbordoni, 2001; Farrell, 2001), é possível obter uma estimativa, ainda que grosseira e com algumas limitações já apontadas na literatura (*e.g.* Pulquério e Nichols, 2006), de que o evento de separação entre as populações da Amazônia e Mata Atlântica tenha ocorrido no Pleistoceno (\approx 800.000 anos e 1 Ma).

5.3. O gene COI dá suporte às decisões taxonômicas recentes em *Euglossina* baseadas em estudo de caracteres morfológicos?

A maioria das decisões tomadas recentemente sobre o *status* taxonômico de espécies com ocorrência simultânea na Amazônia e Mata Atlântica (Faria e Melo, 2012; Nemésio e Engel, 2012; Nemésio, 2011) foi suportada pelos resultados das análises com o gene COI. Em alguns casos, este gene sugere a existência de complexos adicionais de espécies ainda confundidas sob um mesmo nome.

Em um caso (*E. bombiformis/E. niveofasciata*), a distinção das espécies amazônica e atlântica não encontrou suporte nas análises aqui realizadas. Essas espécies podem não existir de fato; elas podem não ser tão dependentes de ambientes de interior de matas como previamente suposto (considerando a observação de que todos os indivíduos de *E. niveofasciata* foram capturados em áreas de borda da mata no PARNA de Ubajara, CE) e poderiam estar transitando nas regiões abertas entre a Amazônia e a Mata Atlântica, talvez se utilizando de florestas de galeria como corredores de dispersão, como é observado para outros grupos de organismos (*e.g.* Oliveira-Filho e Ratter, 1995; Silva, 1996; Silva e Bates, 2002; Costa, 2003). Apesar disto, as duas espécies reconhecidas recentemente podem corresponder a conjuntos de populações evolutivamente independentes e, neste caso, a contradição entre dados morfológicos e os dados obtidos aqui carecem de explicação. É

preciso considerar, por exemplo, que (i) diferenças morfológicas, ainda que sutis, congruentes com a disjunção geográfica sugerem a existência de barreiras entre as populações e (ii) este pode ser um caso de separação recente entre espécies, em que as populações divergentes poderiam ainda estar mantendo polimorfismos ancestrais, como detectado por Dick *et al.* (2004) entre espécies de *Euglossina*. Assim, é possível que essas espécies sejam entidades reais, não distinguíveis pelo COI, e a análise de outros genes, juntamente com caracteres morfológicos poderia auxiliar na elucidação deste problema.

A identificação *a priori* das espécies do grupo *crassipunctata* com base na morfologia não foi possível, pois envolveria a análise da genitália, o que não pode ser feito. Contudo, os clados indicados pela análise filogenética coincidem na sua distribuição geográfica, com as espécies recentemente reconhecidas por Nemésio e Engel (2012). Estas espécies, portanto, foram identificadas neste trabalho *a posteriori*, com base no gene COI, dando suporte às decisões tomadas por Nemésio e Engel (2012).

Em relação ao clado de *E. clausi* de Murici, Alagoas, não foi possível encontrar caracteres morfológicos externos que o separassem dos outros espécimes da Mata Atlântica analisados. O uso de caracteres da genitália, como sugerido em estudos recentes de *Euglossina* (*e.g.* Hinojosa-Díaz e Engel, 2011; Nemésio e Engel, 2012), poderia revelar diferenças que corroborassem o reconhecimento da população de Murici como uma espécie irmã de outra, composta por outras populações da Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais. Infelizmente, essas genitálias não foram examinadas por Nemésio e Engel (2012) (que não dispunham de exemplares desta localidade), nem puderam ser examinadas aqui.

Este estudo indica que *E. calycina* seja uma espécie distinta dentro de *Euglossa* (*Euglossa*) do grupo *analis* da Mata Atlântica. No entanto, a análise filogenética, ainda que restrita à metade das espécies do grupo *analis*, sugere que não haja uma espécie irmã atual de *E. calycina*. Além disto, os dados apresentados aqui dão suporte à existência de mais espécies dentro do grupo *analis* (*e.g.* dentro de “*E. mixta*”), como Faria e Melo (2012) já haviam suspeitado. Os baixos valores de divergência encontrados entre *E. “mixta 2”* e *E. “marianae 1”* (0%) e entre *E. “mixta 2”* e *E. “bidentata 1”* (0,2%) são, de certa forma, inesperados, considerando que os grupos envolvidos são distinguíveis morfológicamente. Descarta-se, nestes casos, a possibilidade de contaminação entre amostras, que foram sequenciadas em placas e datas diferentes. O clado *E. “bidentata 2”*, formado por um único indivíduo (Ebi17) de Canaã dos Carajás, PA, poderia indicar uma diversidade haplotípica muito mais alta em *E. bidentata* que aquela capturada pela amostragem e, por isto, este indivíduo apresenta-se em um clado separado no filograma resultante da

inferência bayesiana. Com isso, seria importante a realização de uma análise filogenética que inclua representantes de todas as espécies deste grupo e, se possível, com a utilização de dados morfológicos e de outros marcadores moleculares para que as relações dentro deste grupo sejam esclarecidas.

5.4. Implicações para a conservação das espécies de Euglossina nos domínios florestais estudados.

O reconhecimento da existência de complexos de espécies em alguns casos (*E. mixta*, *E. marianae* e *E. bidentata*) e o suporte às decisões taxonômicas tomadas recentemente (Faria e Melo, 2012; Nemésio e Engel, 2012; Nemésio, 2011) têm importantes implicações para a conservação destes grupos de Euglossina.

Informações sobre o estado de conservação das espécies de Euglossina da Mata Atlântica foram levantadas por Nemésio (2009, 2011). *Euglossa marianae*, por exemplo, foi considerada uma espécie bioindicadora devido à sua forte associação aos grandes remanescentes florestais da Mata Atlântica (Ramalho *et al.*, 2009; Nemésio, 2011) e foi classificada na categoria de **quase ameaçada** devido ao fato de ser encontrada em mais de 10 localidades ao longo da Mata Atlântica (Nemésio, 2009, 2011). Apesar disto, Nemésio (2011) destaca que as populações de Alagoas, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo deveriam ser consideradas em perigo, ou até mesmo em perigo crítico para os casos de Alagoas e São Paulo, que se encontram mais isolados em relação à distribuição da espécie. *Euglossa marianae* é relativamente comum nos grandes fragmentos florestais em que é encontrada, no entanto, estas abelhas são aparentemente dependentes dos ambientes mais internos das matas e supostamente não transitam para os fragmentos menores situados nas proximidades (10 a 30 Km) destes grandes fragmentos (Nemésio, 2011). Esta espécie, inclusive, foi considerada extinta em algumas áreas do norte do Espírito Santo, onde sua presença foi registrada no passado (Nemésio, 2009, 2011). O gene COI sugere a existência de dois clados (*E. "marianae 1"* e *E. "marianae 2"*) ainda confundidos sob um mesmo nome na Mata Atlântica. A comprovação de que esses dois clados constituam, realmente, espécies distintas, poderia ter forte implicação para a avaliação do estado de conservação dessas abelhas, bem como para a proposição de ações para sua conservação. Sendo assim, é preciso esclarecer o *status* taxonômico deste grupo através do uso de outros marcadores moleculares e de um estudo mais refinado de sua morfologia. De qualquer forma, a

conservação deste grupo depende de ações que minimizem a destruição dos grandes remanescentes florestais da Mata Atlântica.

Euglossa calycina, *E. botocuda* e *Eulaema niveofasciata* também foram consideradas na categoria de **quase ameaçadas** por Nemésio (2009), porém, diferente de *E. marianae*, estas espécies aparentemente são mais raras nos fragmentos onde são encontradas (Nemésio, 2009) e, com isso, possivelmente estão mais sujeitas à perda de variabilidade genética por deriva genética aleatória.

Euglossa clausi tem distribuição ampla na Mata Atlântica (Nemésio, 2009; Nemésio e Engel, 2012) e é relativamente comum nos fragmentos em que ocorre. Por estes motivos, encontra-se na categoria de baixo risco de extinção (**pouco preocupante**) segundo a classificação da UICN (Nemésio, 2009). No entanto, uma atenção especial deve ser dada à população de Murici, Alagoas, que pode ser considerada uma Unidade Evolutiva Significativa (Moritz, 1994; Avise, 2000, 2004) devido ao seu isolamento geográfico e a diferenciação genética. Do ponto de vista biogeográfico, a região de Murici é considerada muito importante para a compreensão da evolução da biota da Amazônia e Mata Atlântica (Coimbra-Filho e Câmara, 1996) e é apontada como uma área de reconhecida importância biológica (Wege e Long, *apud* Uchoa Neto e Tabarelli, 2002; Nemésio, 2010) que abriga um grande número de espécies ameaçadas de extinção (Wege e Long, *apud* Nemésio, 2010). O único levantamento da fauna de Euglossina nesta região (Nemésio, 2010) ampliou a distribuição de algumas espécies antes nunca amostradas na porção nordestina da Mata Atlântica. Portanto, caso a população de *E. clausi* de Murici venha a ser reconhecida como espécie, esta deveria ser enquadrada na categoria “em perigo”, ou mesmo “em perigo crítico”, devido à sua distribuição geográfica extremamente limitada e às pressões sofridas pelo último fragmento de mata onde elas ainda são encontradas.

Este estudo indica que *E. mixta s.s.* e *E. crassipunctata s.s.* possam estar restritas à América Central, o que restringe muito sua distribuição geográfica e este é um dado importante na proposição de estratégias conservacionistas para elas. A população de *E. “bidentata 2”* também deve ser estudada em mais detalhe, com a análise de outros marcadores moleculares e avaliação de sua distribuição na bacia amazônica para que seu *status* de conservação seja definido. *Euglossa moratoi*, *E. “bidentata 1”*, *E. mixta 1”* e *E. bombiformis* aparentemente têm ampla distribuição na bacia Amazônica o que as deixa, inicialmente, em uma situação de baixo risco de extinção.

6. Conclusões

- As evidências encontradas neste estudo indicam que os padrões de diversificação/especiação observados em populações/espécies irmãs de *Euglossina* com distribuição disjunta na Amazônia e Floresta Atlântica não são explicáveis por um único evento geoclimático, mas provavelmente advém de uma sequência de fatores que se sucedeu ao longo dos últimos 10 milhões de anos.
- Em alguns casos, o estabelecimento da diagonal seca (em uma de suas várias ocorrências, a partir do final do Mioceno) pode ter sido o fator responsável pela separação original de espécies irmãs nos dois domínios fitogeográficos; mais recentemente, a diagonal seca pode ser responsável por manter separadas espécies disjuntas.
- Os resultados sugerem uma complexa história geológica em que as florestas Atlântica e Amazônica estiveram alternadamente em contato e isoladas e que esta sequência de retrações e expansões dos domínios florestais teriam criado condições para especiação repetida dentro de *Euglossina*.
- A divergência genética entre os pares de espécies estudados é relativamente baixa, o que pode ser um reflexo do isolamento reprodutivo recente, compatível com a hipótese de separação recente entre as Florestas Amazônica e Atlântica.
- A maioria das decisões taxonômicas tomadas recentemente foi suportada pelos resultados das análises com o gene COI. Em alguns casos, este gene sugere a existência de complexos adicionais de espécies ainda confundidas sob um mesmo nome na Amazônia e, talvez, na Floresta Atlântica.
- Os resultados ressaltam a importância conservacionista da população de *E. clausi* de Murici, Alagoas, que pode ser considerada uma “Unidade Evolutiva Significativa” por se tratar de um clado bem suportado dentro do grupo, com haplótipos únicos desta localidade e por se encontrar aparentemente isolada das outras populações mais ao sul da Mata Atlântica.

7. Referências bibliográficas

- Ab'Saber, A. N. 1977. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. Primeira aproximação. *Geomorfologia* 53: 1–23.
- Ackerman, J. D. 1983. Diversity and seasonality of male euglossine bees (Hymenoptera: Apidae) in central Panamá. *Ecology* 64: 274–283.
- Almeida, E. A. B. & Danforth, B. N. 2009. Phylogeny of colletid bees (Hymenoptera: Colletidae) inferred from four nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 290–309.
- Altekar, G.; Dwarkadas, S.; Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. 2004. Parallel Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference. *Bioinformatics* 20: 407–415.
- Alvarenga, P. E. F., Freitas, R. F. & Augusto, S. C. 2007. Diversidade de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em áreas de cerrado do Triângulo Mineiro, MG. *Bioscience Journal* 23 (Supplement 1): 30–37.
- Amorim, D. S. 2012. Biogeografia da região Neotropical. pp. 111-132. In Rafael, J. A. *et al.* (eds.) *Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia*. Ribeirão Preto: Holos.
- Anjos-Silva, E. J. 2008. Discovery of *Euglossa* (*Euglossa*) *cognata* Moure (Apidae: Euglossini) in the Platina Basin, Mato Grosso state, Brazil. *Biota Neotropica* 8(2): 79–83.
- Augusto, S. C. & Garófalo, C. A. 2011. Task allocation and interactions among females in *Euglossa carolina* nests (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Apidologie* 42: 162–173.
- Auler, A. S. & Smart, P. L. 2001. Late Quaternary Paleoclimate in Semiarid Northeastern Brazil from U-Series Dating of Travertine and Water-Table Speleothems. *Quaternary Research* 55(2): 159–167.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press. Cambridge, MA, USA. 447 p.
- Avise, J. C. 2004. Molecular markers, natural history, and evolution. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 684 p.
- Avise, J. C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36: 3–15.
- Avise, J. C.; Arnold, J.; Ball, R. M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J. E.; Reeb, C. A. & Saunders, N. C. 1987. Intra-specific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489–522.
- Bandelt, H. J.; Forster, P. & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37–48.
- Batalha-Filho, H.; Waldschmidt, A. M.; Campos, L. A. O.; Tavares, M. G. & Fernandes-Salomão, T. M. 2010. Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie* 41: 534–547.
- Batalha-Filho, H.; Fjeldså, J.; Fabre, P-H. & Miyaki, C. Y. 2012. Connections between the Atlantic and the Amazonian Forest avifaunas represent distinct historical events. *Journal of Ornithology* 154: 41–50.
- Becker, P.; Moure, J. S. & Peralta, F. J. A. 1991. More about euglossine bees in Amazonian Forest fragments. *Biotropica* 23: 586–591.
- Bermingham, E. & Martin, A. P. 1998. Comparative mtDNA phylogeography of Neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology* 7: 499–517.
- Biesmeijer, J. C.; Roberts, S. P. M.; Reemer, M.; Ohlemuller, R.; Edwards, M.; Peeters, T.; Schaffers, A. P.; Potts, S. G.; Kleukers, R.; Thomas, C. D.; Settele, J. & Kunin, W. E. 2006.

- Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313: 351–354.
- Bonilla-Gómez, M. A. & Nates-Parra, G. 1992. Abejas euglosinas de Colombia (Hymenoptera: Apidae) I. Claves Ilustradas. *Caldasia* 17: 149–172.
- Brito, R. M. & Arias, M. C. 2010. Genetic structure of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) from Neotropical Atlantic rainforest. *Insectes Sociaux* 57: 413–419.
- Brunner, P. C.; Fleming, C. & Frey, J. E. 2002. A molecular identification key for economically important thrips species (Thysanoptera: Thripidae) using direct sequencing and a PCR-RFLP-based approach. *Agriculture and Forest Entomology* 4: 127–136.
- Buhay, J. E. & Crandall, K. A. 2005. Subterranean phylogeography of freshwater crayfishes shows extensive gene flow and surprisingly large population sizes. *Molecular Ecology* 14: 4259–4273.
- Caccone, A. & Sbordoni, V. 2001. Molecular biogeography of cave life: a study using mitochondrial DNA from Bathysciine beetles. *Evolution* 55(1): 122–130.
- Calderón, C. I.; Dorn, P. L.; Melgar, S.; Chávez, J. J.; Rodas, A.; Rosales, R. & Monroy, C. M. 2004. A preliminary assessment of genetic differentiation of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) in Guatemala by random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Entomology* 41(5): 882–887.
- Camargo, J. M. F. 1996. Meliponini neotropicais (Apinae, Apidae, Hymenoptera): biogeografia histórica. pp 107–121. In: Garófalo, C. A. et al. (eds.) *Anais do Encontro sobre Abelhas de Ribeirão Preto*, SP, FFCLRP-USP; Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. xxii + 351 pp.
- Camargo, J. M. F. 2006. A Amazônia não é uma unidade histórica. pp. 47–49. In: Santana, W. C.; Lobo, C. H.; Hartfelder, K. H. et al. (eds.) *Anais do VII Encontro sobre Abelhas*. Ribeirão Preto, Brasil, FFCLRP-USP, FMRP-USP, publicação eletrônica em mídia digital (CDROM), p. 850.
- Camargo, J. M. F. & Moure, J. S. 1994. Meliponini neotropicais: os gêneros *Paratrigona* Schwarz, 1938 e *Aparatrigona* Moure, 1951 (Hymenoptera, Apidae). *Arquivos de Zoologia* 32(2): 33–109.
- Camargo, J. M. F. & Moure, J. S. 1996. Meliponini neotropicais: o genero *Geotrigona* Moure, 1943, (Apinae, Apidae, Hymenoptera), com especial referência à filogenia e biogeografia. *Arquivos de Zoologia* 33: 95–161.
- Camargo, J. M. F. & Pedro, S. R. M. 2003. Meliponini Neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae) – bionomia e biogeografia. *Revista Brasileira de Entomologia* 47: 311–372.
- Camargo, J. M. F. & Vit, P. 2013. Historical Biogeography of the Meliponini (Hymenoptera, Apidae, Apinae) of the Neotropical Region. pp. 19–34. In: Vit, P.; Pedro, S. R. M. & Roubik, D. (eds.) *Pot-Honey: a legacy of stingless bees*. 1st Edition. New York: Springer. 697 p.
- Cameron, S. A. 2004. Phylogeny and biology of Neotropical orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Entomology* 49, 377–404.
- ChromasPro version 1.7.4. 2012, Technelysium software for DNA sequencing. Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia. http://technelysium.com.au/?page_id=27
- Clary, D. O. & Wolstenholme, D. R. 1985. The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of Molecular Evolution* 22(3): 252–271.
- Coen, E. S.; Thoday, J. M. & Dover, G. 1982. Rate of turnover of structural variants in the rDNA gene family of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 295: 564–568.

- Coimbra-Filho, A. F. & Câmara, L. G. 1996. *Os limites originais do bioma Mata Atlântica na região norte do Brasil*. Rio de Janeiro, Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza, 86 p.
- Colla, S. R. & Packer, L. 2008. Evidence for decline in eastern North American bumblebees (Hymenoptera: Apidea), with special focus on *Bombus affinis* Cresson. *Biodiversity and Conservation* 17: 1379–1391.
- Colli, G. R. 2005. As origens e a diversificação da herpetofauna do Cerrado. p. 247–264. In Scariot, A.; Souza-Silva, J. C. & Felfili, J. M. (eds.). *Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.
- Costa, L. P. 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography* 30: 71–86.
- Cracraft, J. & Prum, R. O. 1988. Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some Neotropical birds. *Evolution* 42(3): 603–620.
- Cristiano, M. P.; Fernandes-Salomão, T. M. & Yotoko, K. S. C. 2012. Nuclear mitochondrial DNA: an Achilles' hell of molecular systematics, phylogenetics, and phylogeographic studies of stingless bees. *Apidologie* 43: 527–538.
- Crozier, R. H.; Crozier, Y. C. & Mackinlay, A. G. 1989. The CO-I and CO-II region of honeybee mitochondrial DNA: evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. *Molecular Biology and Evolution* 6(4): 399–411.
- Crozier, R. H. & Crozier, Y. C. 1993. The Mitochondrial Genome of the Honeybee *Apis mellifera*: Complete Sequence and Genome Organization. *Genetics* 133: 97–117.
- Danforth Lab. 2009. Disponível em: <http://www.danforthlab.entomology.cornell.edu/resources.html>
Acesso em: 12/01/2011.
- Danforth, B. N.; Fang, J. & Sipes, S. D. 2006. Analysis of family level relationships in bees (Hymenoptera: Apiformes) using 28S and two previously unexplored nuclear genes: CAD and RNA polymerase II. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39 (2): 358–372.
- Dick, C. W.; Abdul-Salim, K. & Bermingham, E. 2003. Molecular systematics reveals cryptic Tertiary diversification of a widespread tropical rainforest tree. *American Naturalist* 162: 691–703.
- 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.
- Ditchfield, A. D. 2000. The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. *Molecular Ecology* 9: 1307–1318.
- Dodson, C. H.; Dressler, R. L.; Hills, H. G.; Adams, R. M. & Williams, N. H. 1969. Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science* 164: 1243–1249.
- Dorn, P. L.; Melgar, S.; Rouzier, V.; Gutierrez, A.; Combe, C.; Rosales, R.; Rodas, A.; Kott, S.; Salvia, D. & Monroy, C. M. 2003. The Chagas Vector, *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), is Panmictic within and Among Adjacent Villages in Guatemala. *Journal of Medical Entomology* 40(4):436–440.
- Dressler, R. L. 1982a. Biology of the 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 Biología Tropical* 30 (2): 121–129.
- Dressler, R. L. 1982c. New species of *Euglossa*. III. The *bursigera* species group (Hymenoptera: Apidae). *Revista de Biología Tropical* 30(2): 131–140.

- Dressler, R. L. 1982d. New species of *Euglossa* IV. The *cordata* and *purpurea* species groups (Hymenoptera: Apidae). *Revista de Biología Tropical* 30(2): 141–150.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792–1797.
- Edwards, S. V. & Beerli, P. 2000. Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution* 54(6): 1839–1854.
- Eltz, T.; Roubik, D. W. & Lunau, K. 2005a. Experience-dependent choices ensure species-specific fragrance accumulation in male orchid bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 59: 149–156.
- Eltz, T.; Sager, A. & Lunau, K. 2005b. Juggling with volatiles: exposure of perfumes by displaying male orchid bees. *Journal of Comparative Physiology A* 191: 575–581.
- Eltz, T.; Whitten, W. M.; Roubik, D. W. & Linsenmair, K. E. 1999. Fragrance collection, storage, and accumulation by individual male orchid bees. *Journal of Chemical Ecology* 25: 157–176.
- Engel, M. S. 1999. The first fossil *Euglossa* and the phylogeny of the orchid bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *American Museum Novitates* 3272: 1–14.
- Eva, H. D.; de Miranda, E. E.; Di Bella, C. M.; Gond, V.; Huber, O.; Sgrenzaroli, M.; Jones, S.; Coutinho, A.; Dorado, A.; Guimarães, M.; Elvidge, C.; Achard, F.; Belward, A. S.; Bartholomé, E.; Baraldi, A.; De Grandi, G.; Vogt, P.; Fritz, S. & Hartley, A. 2002. *A vegetation map of South America*. Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Excoffier, L.; Laval, G. & Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47–50.
- Excoffier, L.; Smouse, P. E. & Quattro, J. M. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes - Application to Human Mitochondrial-DNA Restriction Data. *Genetics* 131: 479–491.
- Ewing, B. & Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* 8: 186–194.
- Faria Jr., L. R. R. 2005. Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em áreas de cerrado *s.s.* e mata ciliar em Brasilândia de Minas, MG, com uma discussão sobre a biogeografia do grupo no cerrado. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 90 p.
- Faria, L. R. R. & Melo, G. A. R. 2012. Species of *Euglossa* of the *analis* group in the Atlantic forest (Hymenoptera, Apidae). *Zoologia* 29 (4): 349–374
- Faria, L. R. R. & Silveira, F. A. 2011. The orchid bee fauna (Hymenoptera, Apidae) of a core area of the Cerrado, Brazil: the role of riparian forests as corridors for forest-associated bees. *Biota Neotropica* 11(4): 87–94.
- Farrel, B. D. 2001. Evolutionary Assembly of the Milkweed Fauna: Cytochrome Oxidase I and the Age of *Tetraopes* Beetles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18(3): 467–478.
- Frankham, R.; Ballou, J. D. & Briscoe, D. A. 2010. *Introduction to conservation genetics*. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge. 642 p.
- Friese, H. 1899. Monographie der Bienengattung *Euglossa* Latr. *Természetráji Füzetek* 22: 117–172.
- Fu, Y.-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- Garcia-Paris, M.; Good, D. A.; Parra-Olea, G. & Wake, D. B. 2000. Biodiversity of Costa Rican salamanders: implications of high levels of genetic differentiation and phylogeographic structure for species formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 1640–1647.

- Garófalo C. A.; Camillo, E.; Augusto, S. C.; Jesus, B. M. V. & Serrano, J. C. 1998. Nest structure and communal nesting in *Euglossa (Glossura) annectans* Dressler (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Revista Brasileira de Zoologia* 15(3): 589–596.
- Gelman, A. & Rubin, D. B. 1992. Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Statistical Science* 7(4): 457–511.
- Gerth, M.; Geißler, A. & Bleidorn, C. 2011. *Wolbachia* infections in bees (Anthophila) and possible implications for DNA barcoding. *Systematics and Biodiversity* 9(4): 319–327.
- Gibbs, J. 2009. Integrative taxonomy identifies new (and old) species in the *Lasioglossum (Dialictus) tegulare* (Robertson) species group (Hymenoptera, Halictidae). *Zootaxa* 2032: 1–38.
- Gordon, D.; Abajian, C. & Green, P. 1998. Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Research* 8: 195–202.
- Greenleaf, S. S.; Williams, N. M.; Winfree, R. & Kremen, C. 2007. Bee foraging ranges and their relationship to body size. *Oecologia* 153: 589–596.
- Grixti, J. C.; Wong, L. T.; Cameron, S. A. & Favret, C. 2009. Decline of bumble bees (*Bombus*) in the North American Midwest. *Biological Conservation* 142: 75–84.
- Guillot, G. 2008. Inference of structure in subdivided populations at low levels of genetic differentiation. The correlated allele frequencies model revisited. *Bioinformatics* 24: 2222–2228.
- Guillot, G.; Estoup, A.; Mortier, F. & Cosson, J. F. 2005. A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* 170: 1261–1280.
- Guillot, G.; Santos, F. & Estoup, A. 2008. Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics* 24(11): 1406–1407.
- Hare, M. P. 2001. Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology and Evolution* 16(12): 700–706.
- Hare, M. P. & Avise, J. C. 1998. Population structure in the American Oyster as inferred by nuclear gene genealogies. *Molecular Biology and Evolution* 15: 119–128.
- Harlin-Cognato, A.; Markowitz, T.; Wursig, B. & Honeycutt, R. 2007. Multi-locus phylogeography of the dusky dolphin (*Lagenorhynchus obscurus*): passive dispersal via the west-wind drift or response to prey species and climate change? *BMC Evolutionary Biology* 7: 131.
- Hebert, P. D. N.; Ratnasingham, S. & de Waard, J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closed related species. *Proceedings of the Royal Society of London-B (Suppl.)* 270: S96–S99.
- 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 *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(41): 14812–14817.
- Hickerson, M. J.; Carstens, B. C.; Cavender-Bares, J.; Crandall, K. A.; Graham, C. H.; Johnson, J. B.; Rissler, L.; Victoriano, P. F. & Yoder, A. D. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 291–301.
- Hinojosa-Díaz, I. A. & Engel, M. S. 2011. Revision of the orchid bee subgenus *Euglossella* (Hymenoptera, Apidae), part I, the *decorata* species group. *ZooKeys* 140: 27–69.
- Hollatz, C.; Vilaça, S. T.; Redondo, R. A. F.; Marmontel, M.; Baker, C. S. & Santos, F. R. 2011. The Amazon River system as an ecological barrier driving genetic differentiation of the pink dolphin (*Inia geoffrensis*). *Biological Journal of the Linnean Society* 102(4): 812–827.

- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754–755.
- Hurst, G. D. D. & Jiggins, F. M. 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B* 272: 1525–1534.
- Hurt, C.; Anker, A. & Knowlton, N. 2009. A multilocus test of simultaneous divergence across the Isthmus of Panama using snapping shrimp in the genus *Alpheus*. *Evolution* 63: 514–530.
- Ingvarsson, P. K. 2008. Multilocus patterns of nucleotide polymorphism and the demographic history of *Populus tremula*. *Genetics* 180: 329–340.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Contagem Populacional. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/> Acesso em: julho de 2011.
- Ivanova, N. V.; de Waard, J. R. & Hebert, P. D. N. 2006. *Canadian Centre for DNA barcoding Protocols - Glass Fiber DNA extraction*. Disponível em: www.dnabarcoding.ca. Acesso em: novembro de 2011.
- Ivanova, N. V. & Grainger, C. 2006. *Canadian Centre for DNA barcoding Protocols – COI amplification*. Disponível em: www.dnabarcoding.ca. Acesso em: novembro de 2011.
- Janzen, D. H. 1971. Euglossine bees as long distance pollinators of tropical plants. *Science* 171: 203–205.
- Janzen, D. H. 1981. Bee arrival at two Costa Rican female *Catasetum* orchid inflorescences, and a hypothesis on euglossine population structure. *Oikos* 36: 177–183.
- Kambhampati, S.; Luykx, P. & Nalepa, C. A. 1996. Evidence for sibling species in *Cryptocercus punctulatus*, the wood roach, from variation in mitochondrial DNA and karyotype. *Heredity* 86: 485–496.
- Kawakita, A.; Sota, T.; Ascher, J.S.; Ito, M.; Tanaka, H. & Kato, M. 2003. Evolution and phylogenetic utility of alignment gaps within intron sequences of three nuclear genes in bumble bees (*Bombus*). *Molecular Biology and Evolution* 20(1): 87–92.
- Kimsey, L. S. 1980. The behaviour of male orchid bees (Apidae, Hymenoptera, Insecta) and the question of leks. *Animal Behaviour* 28: 996–1004.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120.
- Kimura, M. & Weiss, G. H. 1964. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49: 561–576.
- Kroodsma, D. E. 1975. Flight distances of male euglossine bees in orchid pollination. *Biotropica* 7: 71–72.
- 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). *Organisms, Diversity and Evolution* 7: 155–165.
- Ledru, M.-P. 1993. Late quaternary environmental and climatic changes in central Brazil. *Quaternary Research* 39: 90–98.
- Lee, J. Y. & Edwards, S. V. 2008. Divergence across Australia's carpentarian barrier: statistical phylogeography of the red-backed fairy wren (*Malurus melanocephalus*). *Evolution* 62: 3117–3134.
- Lepeletier, A. L. M. 1841. *Histoire Naturelle des Insectes. Hyménoptères*. Paris: Roret Vol. 2 680 p.

- López-Urbe, M. M. & Del Lama, M. A. 2007. Molecular identification of species of the genus *Euglossa* Latreille (Hymenoptera: Apidae, Euglossini). *Neotropical Entomology* 36: 712–720.
- Lunt, D. H.; Zhang, D. -X.; Szymura, J. M. & Hewitt, G. M. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology* 5(3): 153–165.
- Martini, A. M. Z.; Fiaschi, P.; Amorim, A. M. & Paixão, J. M. 2007. A hot-point within a hot-spot: a high diversity site in Brazil's Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation* 16: 3111–3128.
- Meier, R.; Zhang, G. & Ali, F. 2008. The use of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the "Barcoding Gap" and leads to misidentification. *Systematic Biology* 57(5): 809–813.
- Michel-Salzat, A.; Cameron, A. S. & Oliveira M. L. 2004. Phylogeny of the orchid bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossini): DNA and morphology yield equivalent patterns. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 309–323.
- Michener, C. D. 2007. *The bees of the world*. The Johns Hopkins University Press. 2nd Edition. 953 p.
- Milet-Pinheiro, P. & Schlindwein, C. 2005. Do euglossine males (Apidae, Euglossini) leave tropical rainforest to collect fragrances in sugarcane monocultures? *Revista Brasileira de Zoologia* 22: 853–858.
- Minckley, R. L. & Reyes, S. G. 1996. 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* 69: 102–104.
- Möller, E. M.; Bahnweg, G.; Sandermann, H. & Geiger, H. H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20(22): 6115–6116.
- Moojen, J. 1948. Speciation in the Brazilian spiny rats (Genus *Proechimys*, Family Echimyidae). *University of Kansas Publications, Museum of Natural History* 1: 301–406.
- Moore, W. S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene tree versus nuclear-gene tree. *Evolution* 49: 718–726.
- Morato, E. F. 1994. Abundância e riqueza de machos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em mata de terra firme e áreas de derrubada, nas vizinhanças de Manaus (Brasil). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Zoologia* 10: 95–105.
- Morato, E. F. 1998. Estudos sobre comunidades de abelhas Euglossini. *Anais do Encontro sobre Abelhas* (3): 135–143.
- Morato, E. F., Campos, L. A. O. & Moure, J. S. 1992. Abelhas Euglossini (Hymenoptera, Apidae) coletadas na Amazônia Central. *Revista Brasileira de Entomologia* 36: 767–771.
- Moritz, C. 1994. Defining "evolutionary significant units" for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 373–375.
- Moura, D. C. & Schlindwein, C. 2009. Mata Ciliar do Rio São Francisco como Biocorredor para Euglossini (Hymenoptera: Apidae) de Florestas Tropicais Úmidas. *Neotropical Entomology* 38(2): 281–284.
- Moure, J. S. 1968. Espécies novas de *Euglossa* da América Central (Hymenoptera: Apidae). *Boletim da Universidade Federal do Paraná, Zoologia* 3(2): 13–64 [40].
- Moure, J. S. 2000. As espécies do gênero *Eulaema* Lepeletier, 1841 (Hymenoptera, Apidae, Euglossinae). *Acta Biológica Paranaense* 29 (1, 2, 3, 4): 1–70.
- 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. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em 12/11/2012

- Naeole, C. K. M. & Haymer, D. S. 2003. Use of oligonucleotide arrays for molecular taxonomic studies of closely related species in the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*) complex. *Molecular Ecology Notes* 3: 662–665.
- Nemésio, A. 2003. Preliminary sampling of Euglossina (Hymenoptera: Apidae: Apini) of Reserva Particular do Patrimônio Natural Feliciano Miguel Abdala, Caratinga, Minas Gerais state, Brazil. *Lundiana* 4: 121–124.
- Nemésio, A. 2009. Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of the Brazilian Atlantic Forest. *Zootaxa* 2041: 1–242.
- Nemésio, A. 2010. *Eulaema (Apeulaema) felipei* sp. n. (Hymenoptera: Apidae: Euglossina): a new forest-dependent orchid bee found at the brink of extinction in northeastern Brazil. *Zootaxa* 2424: 51–62.
- Nemésio, A. 2011. *Euglossa marianae* sp. n. (Hymenoptera: Apidae): A new orchid bee from the Brazilian Atlantic Forest and the possible first documented local extinction of a forestdependent orchid bee. *Zootaxa* 2892: 59–68.
- Nemésio, A.; Augusto, S. C. & Almeida, E. A. B. 2007. *Euglossa decorata* Smith (Hymenoptera: Apidae) in central Brazil – biogeographic implications. *Lundiana* 8(1): 57–61.
- Nemésio, A. & Engel, M. S. 2012. Three new species of *Euglossa* from Brazil (Hymenoptera, Apidae). *ZooKeys* 222: 47–68.
- Nemésio, A. & Faria Jr., L. R. R. 2004. First assessment of orchid bee fauna (Hymenoptera: Apidae: Apini: Euglossina) of Parque Estadual do Rio Preto, a cerrado area in southeastern Brazil. *Lundiana* 5: 113–117.
- Nemésio, A. & Morato, E. F. 2004. Euglossina (Hymenoptera: Apidae: Apini) of the Humaitá Reserve, Acre state, Brazilian Amazon, with comment on bait trap efficiency. *Revista de Tecnologia e Ambiente* 10: 71–80.
- Nemésio, A. & Morato, E. F. 2006. The orchid-bee fauna (Hymenoptera: Apidae) of Acre state (northwestern Brazil) and a re-evaluation of euglossine bait-trapping. *Lundiana* 7: 59–64.
- Nemésio, A.; Santos-Júnior, J. E. & Santos, F. R. 2013. *Eufriesea zhangii* sp. n. (Hymenoptera: Apidae: Euglossina), a new orchid bee from Brazil revealed by molecular and morphological characters. *Zootaxa* 3609 (6): 568–582.
- Nemésio, A. & Silveira, F. A. 2006. Edge effects on the orchid-bee fauna (Hymenoptera: Apidae) at a large remnant of Atlantic Forest in southeastern Brazil. *Neotropical Entomology* 35: 313–323.
- Nemésio, A. & Silveira, F. A. 2007a. Orchid bee fauna (Hymenoptera: Apidae: Euglossina) of Atlantic Forest fragments inside an urban area in southeastern Brazil. *Neotropical Entomology* 36: 186–191.
- Nemésio, A. & Silveira, F. A. 2007b. Diversity and distribution of orchid bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossina) with a revised checklist of their species. *Neotropical Entomology* 36: 874–888.
- Neves, E. L. & Viana, B. F. 1997. Inventário da fauna de Euglossinae (Hymenoptera: Apidae) do baixo sul da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 4: 831–837.
- Neves, E. L. & Viana, B. F. 1999. Comunidade de machos de Euglossinae (Hymenoptera: Apidae) das matas ciliares da margem esquerdo do médio rio São Francisco, Bahia. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 28: 201–210.
- Neves, E. L. & Viana, B. F. 2003. A fauna de abelhas da subtribo Euglossina (Hymenoptera, Apidae) do estado da Bahia, Brasil. p. 223–229. In: Melo, G. A. R. & Santos, I. A. (eds.).

- Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure*. Criciúma, UNESC, XVI + 320 p.
- Norgate, M.; Chamings, J.; Pavlova, A.; Bull, J. K.; Murray, N. D. & Sunnucks, P. 2009. Mitochondrial DNA indicates late Pleistocene divergence of populations of *Heteronympha merope*, an emerging model in environmental change biology. *PLoS ONE* 4(11): e7950.
- Nylander, J. A. A.; Ronquist, F.; Huelsenbeck, J. P. & Nieves Aldrey, J. L. 2004. Bayesian Phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology* 53: 47–67.
- Ojeda, R. A. & Mares, M. A. 1989. A Biogeographic Analysis of the Mammals of Salta Province, Argentina: Patterns of Species Assemblages in the Neotropics. Special Publication, The Museum Texas Tech University, 27. Texas Tech University Press. 66 p.
- Oliveira, M. L. 2006. Nova hipótese de relacionamento filogenético entre os gêneros de Euglossini e entre as espécies de *Eulaema* Lepeletier, 1841 (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Acta Amazonica* 36(2): 273–286.
- Oliveira, M. L. 2007. Catálogo comentado das espécies de abelhas do gênero *Eulaema* Lepeletier, 1841 (Hymenoptera: Apidae). *Lundiana* 8(2): 113–136.
- Oliveira, P. E.; Barreto, A. M. F. & Suguio, K. 1999. Late Pleistocene/Holocene climatic and vegetational history of the Brazilian caatinga: the fossil dunes of the middle São Francisco River. *Paleogeography, Paleoclimatology and Paleoecology* 152: 319–337.
- 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. *Edinburgh Journal of Botany* 52: 141–194.
- Packard, A. S. 1869. List of hymenopterous and lepidopterous insects collected by the Smithsonian Expedition to South America, under Prof. James Orton. *Annual Report of the Trustees of the Peabody Academy of Science* 1: 52–69.
- Patton, J. L.; Silva, M. N. F. & Malcolm, J. R. 1994. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (Rodentia: Echimyidae) of the Amazon Basin: a test of the riverine barrier hypothesis. *Evolution* 48: 1314–1323.
- Pavan, A. C.; Martins, F.; Santos, F. R.; Ditchfield, A. & Redondo, R. A. F. 2011. Patterns of diversification in two species of short-tailed bats (*Carollia* Gray, 1838): the effects of historical fragmentation of Brazilian rainforests. *Biological Journal of the Linnean Society* 102(3): 527–539.
- Paxton, R. J.; Thorén, P. A.; Tengö, J.; Estoup, A. & Pamilo, P. 1996. Mating structure and nestmate relatedness in a communal bee, *Andrena jacobii* (Hymenoptera: Andrenidae), using microsatellites. *Molecular Ecology* 5: 511–519.
- Pemberton, R. W. & Wheeler, G. S. 2006. Orchid bees don't need orchids mutualists—evidence from the naturalization of an orchid bee in Florida. *Ecology* 87: 1995–2001.
- Perdices, A.; Bermingham, E.; Montilla, A. & Doadrio, I. 2002. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25: 172–189.
- Pereira-Martins, S. R. & Kerr, W. E. 1991. Biologia de *Eulaema nigrita*. 3. Inferências evolutivas. *Papéis Avulsos de Zoologia, São Paulo* 37: 245–250.
- Peters, J. L.; Zhuravlev, Y. N.; Fefelov, I.; Humphries, E. M. & Omland, K. E. 2008. Multilocus phylogeography of a Holarctic duck: colonization of North America from Eurasia by gadwall (*Anas strepera*). *Evolution* 62: 1469–1483.
- Poinar, G. 1998. *Paleoeuglossa melissiflora* Gen n., sp. n. (Euglossinae: Apidae), fossil orchid bees in Dominican amber. *Journal of the Kansas Entomological Society* 71: 29–34.
- Posada, D. 2008. jModeltest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25(7): 1253–1256.

- Powell, A. H. & Powell, G. V. N. 1987. Population dynamics of male euglossine bees in Amazonian forest fragments. *Biotropica* 19: 176–179.
- Pulquério, M. J. F. & Nichols, R. A. 2006. Dates from the molecular clock: how wrong can we be? *TRENDS in Ecology and Evolution* 22(4): 180–184.
- Ramalho, A. V.; Gaglianone, M. C. & Oliveira, M. L. 2009. Comunidades de abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em fragmentos de Mata Atlântica no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* 53(1): 95–101.
- Rambaut, A. 2009. *FigTree - Tree Figure Drawing Tool - v.1.3.1*. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- 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.
- Ratnasingham, S. & Herbert, P. D. 2007. Bold: The barcode of life data system. *Molecular Ecology Notes* 7: 355–364.
- Raven, P. H. & Axelrod, D. I. 1974. Angiosperm biogeography and past continental movements. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61: 539–673.
- Rebêlo, J. M. M. & Garófalo, C. A. 1997. Comunidades de machos de Euglossinae (Hymenoptera, Apidae) em matas semidecíduas do nordeste do estado de São Paulo. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 26: 243–256.
- Rebêlo, J. M. M. & Moure, J. S. 1995. As espécies de *Euglossa* Latreille do nordeste de São Paulo (Apidae, Euglossinae). *Revista Brasileira de Zoologia* 12: 445–466.
- Rebêlo, J. M. M. & Silva, F. S. 1999. Distribuição das Abelhas Euglossini (Hymenoptera: Apidae) no Estado do Maranhão, Brasil. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 28(3): 389–401.
- Reineke, A.; Karlovsky, P. & Zebitz, C. P. 1998. Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. *Insect Molecular Biology* 7(1): 95–99.
- Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J. & Hirota, M. M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141–1153.
- Rizzini, C. T. 1963. Nota prévia sobre a divisão fitogeográfica do Brasil. *Revista Brasileira de Geografia* 25: 1–64.
- Roig-Alsina, A. & Michener, C. D. 1993. Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). *The University of Kansas Science Bulletin* 55: 123–173.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics Applications Note* 19(12): 1572–1574.
- Rosenblum, E.; Hickerson, M. J. & Moritz, C. 2007. A multilocus perspective on colonization accompanied by selection and gene flow. *Evolution* 61: 2971–2985.
- Roubik, D. W. 1989. *Ecology and natural history of tropical bees*. Cambridge Tropical Biology series. Cambridge University Press. 514 p.
- Roubik, D. W. & Ackerman, J. D. 1987. Long-term ecology of euglossine orchid-bees (Apidae: Euglossini) in Panama. *Oecologia* 73: 321–333.
- Roubik, D. W. & Hanson, P. E. 2004. *Orchid bees of tropical America: biology and field guide*. INBIO, San Jose, 370 p.
- Rozas, J.; Sánchez-Delbarrio, J. C.; Messeguer, X. & Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496–2497.

- Santos, M. L. & Garófalo, C. A. 1994. Nesting biology and nest re-use of *Eulaema nigrita* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Insect Societies* 41: 99–110.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSHL Press, New York, British Museum, London.
- Saraste, M. 1990. Structural features of cytochrome oxidase. *Quarterly Reviews of Biophysics* 23(4): 331–366.
- Schama, R.; Solé-Cava, A. M. & Thorpe, J. P. 2005. Genetic divergence between east and west Atlantic populations of *Actinia* spp. sea anemones (Cnidaria: Actiniidae). *Marine Biology* 146: 435–443.
- Shephard, G. E.; Müller, R. D.; Liu, L. & Gurnis, M. 2010. Miocene drainage reversal of the Amazon River driven by plate–mantle interaction. *Nature Geoscience* 3: 870–875.
- Sigrist, M. S. & Carvalho, C. J. B. 2009. Historical relationships among areas of endemism in the tropical South America using Brooks Parsimony Analysis (BPA). *Biota Neotropica* 9(4): 79–90.
- Silva, J. M. C. 1996. Distribution of Amazonian and Atlantic birds in gallery forests of the Cerrado region, South America. *Ornitologia Neotropical* 7:1–18
- Silva, J. M. C. & Bates, J. M. 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. *Bioscience* 52: 225–233.
- Silveira, F. A.; Melo, G. A. R. & Almeida, E. A. B. 2002. *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. Belo Horizonte: F. A. Silveira. 253 p.
- Simpson, G. G. 1961. *Principles of Animal Taxonomy*. New York: Columbia University Press.
- 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.
- Smith, M. A.; Bertrand, C.; Crosby, K.; Eveleigh, E. S.; Fernandez-Triana, J.; Fisher, B. L.; Gibbs, J.; Hajibabaei, M.; Hallwachs, W.; Hind, K.; Hrcek, J.; Huang, D-W.; Janda, M.; Janzen, D. H.; Li, Y.; Miller, S. E.; Packer, L.; Quicke, D.; Ratnasingham, S.; Rodriguez, J.; Rougerie, R.; Shaw, M. R.; Sheffield, C.; Stahlhut, J. K.; Steinke, D.; Whitfield, J.; Wood, M. & Zhou, X. 2012. *Wolbachia* and DNA Barcoding Insects: Patterns, Potential, and Problems. *PLoS ONE* 7(5): e36514. doi:10.1371/journal.pone.0036514
- Srivathsan, A. & Meier, R. 2012. On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. *Cladistics* 28: 190–194.
- Stahlhut, J. K.; Gibbs, J.; Sheffield, C. S.; Smith, M. A. & Packer, L. 2012. *Wolbachia* (Rickettsiales) infections and bee (Apoidea) barcoding: a response to Gerth *et al.* *Systematics and Biodiversity* 10(4): 395–401.
- Strange, J. P.; Knoblett, J. & Griswold, T. 2009. DNA amplification from pin-mounted bumble bees (*Bombus*) in a museum collection: effects of fragment size and specimen age on successful PCR. *Apidologie* 40: 134–139.
- Suni, S. S. & Brosi, B. J. 2012. Population genetics of orchid bees in fragmented tropical landscape. *Conservation Genetics* 13: 323–332.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595.
- 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.

- Tänzler, R.; Sagata, K.; Surbakti, S.; Balke, M. & Riedel, A. 2012. DNA Barcoding for Community Ecology - How to Tackle a Hyperdiverse, Mostly Undescribed Melanesian Fauna. *Plos ONE* 7(1): 1–11.
- Tonhasca Jr., A.; Blackmer, J. L. & Albuquerque, G. S. 2002. Abundance and diversity of euglossine bees in the fragmented landscape of the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 34: 416–422.
- Uchoa Neto, C. A. M. & Tabarelli, M. 2002. Diagnóstico e estratégia de conservação do Centro de Endemismo Pernambuco. Centro de Pesquisas Ambientais do Nordeste – CEPAN. Conservation International do Brasil. Recife. 69 p.
- Uzvolgyi, E.; Kiss, I.; Pitt, A.; Arsenian, S.; Ingvarsson, S.; Udvardy, A.; Hamada, M.; Klein, G. & Sumegi, J. 1988. *Drosophila* homolog of the murine Int-1 protooncogene. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 85: 3034–3038.
- Vanzolini, P. E. 1974. Ecological and geographical distribution of lizards in Pernambuco, northeastern Brasil (Sauria). *Papéis Avulsos de Zoologia* 28(4): 61–90.
- de Vivo, M. & Carmignotto, A. P. 2004. Holocene vegetation change and the mammal faunas of South America and Africa. *Journal of Biogeography* 31: 943–957.
- Wang, X.; Auler, A. S.; Edwards, R. L.; Cheng, H.; Cristalli, P. S.; Smart, P. L.; Richards, D. A. & Shen, C-C. 2004. Wet periods in northeastern Brazil over the past 210 kyr linked to distant climate anomalies. *Nature* 432: 740–743.
- Werneck, F. P.; Gamble, T.; Colli, G. R.; Rodrigues, M. T. & Sites, J. W. Jr. 2012. Deep Diversification and Long-Term Persistence in the South American ‘dry Diagonal’: Integrating Continent-Wide Phylogeography and Distribution Modeling of Geckos. *Evolution* 66(10): 3014–3034.
- Westwood, J. O. 1840. Foreign Bees pp. 260-301 in Duncan, J. (ed.) *The Natural History of Bees, in W. Jardine (ed.) The Naturalist's Library*. Edinburgh: Lizars 301 p.
- Wikelski, M.; Moxley, J.; Eaton-Mordas, A.; López-Urbe, M. M.; Holland, R.; Moskowicz, D.; Roubik, D. W. & Kays, R. 2010. Large-range movements of Neotropical orchid bees observed via radio telemetry. *Plos ONE* 5(5): e10738.
- Wiley, E. O. 1981. *Phylogenetics—The Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 439 p.
- Williams, N. H. & Whitten, W. N. 1983. Orchid floral fragrances and male euglossine bees: methods and advances in the last sesquidecade. *Biology Bulletin* 164: 355–395.
- Wittmann, D.; Hoffmann, M. & Scholz, E. 1988. Southern distributional limits of euglossine bees in Brazil linked to habitats of the Atlantic and subtropical rain forest (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Entomologia Generalis* 14: 53–60.
- Zanella, F. C. V. 2000. The bees of the Caatinga (Hymenoptera, Apoidea, Apiformes): a species list and comparative notes regarding their distribution. *Apidologie* 31: 579–592.
- Zayed, A. 2009. Bee genetics and conservation. *Apidologie* 40: 237–262.
- Zimmermann, Y.; Roubik, D. W. & Eltz, T. 2006. Species-specific attraction to pheromonal analogues in orchid bees. *Behaviour Ecology and Sociobiology* 60: 833–843.
- Zucchi, R.; Sakagami, S. F. & Camargo, J. M. F. 1969. Biological observations on a Neotropical parasocial bee, *Eulaema nigrita*, with a review on the biology of Euglossinae (Hymenoptera: Apidae). A comparative study. *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University, Zoology* 17: 271–380.

8. Apêndices

Apêndice F 1. Autorização para atividades com finalidade científica – IBAMA/ ICMBIO/ SISBIO (nº26425-1) obtida para este estudo. Somente a primeira página é apresentada.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 26425-1	Data da Emissão: 18/11/2011 17:51
Dados do titular	
Nome: Carolina Ferreira Cardoso Yazbeck	CPF: 875.647.001-06
Título do Projeto: A importância da diagonal árida (Caatinga, Cerrado e Chaco) no isolamento de populações de espécies de Euglossina (Insecta: Hymenoptera: Apidae) presentes nos domínios morfoclimáticos da Amazônia e da Mata Atlântica – um estudo filogeográfico	
Nome da Instituição : UFMG - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	CNPJ: 17.217.985/0001-04

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta, transporte e deposição das abelhas na Coleção Taxonômica da UFMG.	10/2011	10/2013
De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.			

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Exportação) ou www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, biosprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Incluir no relatório a ocorrência de espécies de insetos alóctones invasores em vida livre (ex: <i>Apis mellifera</i> , <i>Apis dorsata</i>). Encaminhar a APA uma versão do relatório em meio físico para o acervo da biblioteca da unidade.
2	1. A pesquisadora deverá agendar a atividade de campo previamente com a administração da UC através do tel (88) 3634-1388; 2. Os materiais utilizados para captura deverão serem retirados e/ou desmontados ao final da atividade de campo; 3. A pesquisadora deverá apresentar relatório parcial após a atividade de campo nesta UC, bem como relatório final em formato digital e impresso.
3	A equipe de pesquisa deverá comparecer, antes do início dos trabalhos, à sede do Parna Serra da Capivara para ser orientada sobre os regulamentos internos da unidade e informar as datas de trabalho.
4	Enviar uma cópia dos resultados a sede da APA Araripe.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

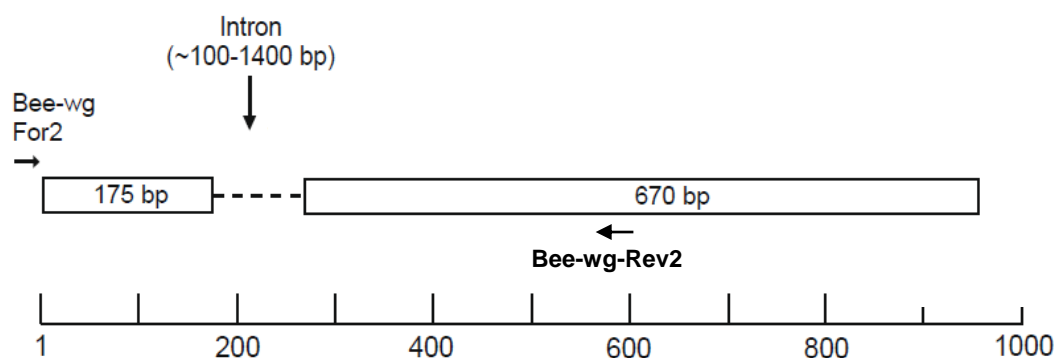
#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		PI	PARQUE NACIONAL DA SERRA DAS CONFUSÕES	UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

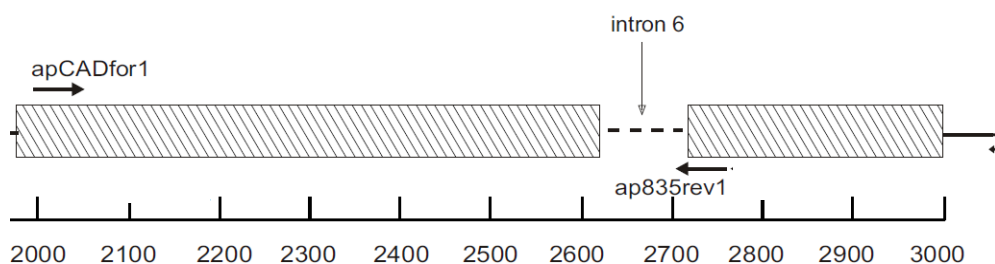
Código de autenticação: 91596211



Página 1/3



Apêndice F 2. Mapa do gene Wingless, com um intron ($\approx 100-1400$ pb). A numeração é baseada na sequência codificadora de *Drosophila melanogaster* (GenBank Accession J03650). Fonte: Uzvölgyi et al. (1988), modificado de Almeida e Danforth (2009) e neste estudo.



Apêndice F 3. Mapa do gene CAD, com dois éxons (≈ 600 pb e ≈ 300 pb) e um intron (≈ 100 pb). A numeração é baseada na sequência do CAD de *Apis mellifera* do Projeto Genoma de Apis. Fonte: Danforth et al. (2006); Danforth Lab (2009); modificado neste estudo.

Apêndice T 1. Sequências dos iniciadores para a amplificação por PCR dos genes CAD e Wingless.

Locus	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)	Iniciadores	Sequência	Referência
CAD ^a	≈ 800	apCADfor1	5' - GGW TAT CCC GTD ATG GCB MGW GC - 3'	Danforth <i>et al.</i> , 2006
		ap835rev1	5' - GCA THA CYT CHC CCA CRC TYT TC - 3'	Danforth <i>et al.</i> , 2006
Wingless ^b	≈ 400 - 500	Bee-wg-For2	5'-GGC AGC ATY CAG TCS TGY TCC TGC GA-3'	Sipes (não publicado)
		Bee-wg-Rev2	5'- CC GTC GAA WCG RTC CTT YAR RTT GTC -3'	Almeida (não publicado)

^a Condições da PCR. apCADfor1/ap835rev1: 94°C por 1min, 52°C por 1min, 72°C por 1min (35 ciclos). (Danforth *et al.*, 2006)

^b Condições da PCR. Bee-wg-For2/Lep-wg-Rev2: 94°C por 1 min, 58°C por 1 min, 72°C por 1,5 min (35 ciclos). (Almeida, comunicação pessoal). Realizou-se uma PCR de gradiente de temperatura (50°C e 62°C) e constatou-se uma boa amplificação entre 58°C e 61,6°C para este grupo de abelhas.

Apêndice T 2: Reagentes utilizados na PCR para amplificação dos genes CAD e Wingless.

Reagentes	Concentração final (CAD)*	Concentração final (Wingless)**
BSA ^a	0,5 mM	-
ddH ₂ O	-	-
Tampão	1 X	1 X
MgCl ₂	2 mM	2 mM
<i>Primer Forward</i>	0,5 µM	0,5 µM
<i>Primer Reverse</i>	0,5 µM	0,5 µM
<i>dNTPs</i>	0,2 mM	0,2 mM
<i>Platinum Taq DNA Polymerase (Invotrogen™)</i>	0,25 U/reação	0,25 U/reação
Volume para uma reação	10 µL	10 µL
DNA genômico	≈ 50 ng/µL (1-2 µL)	≈ 50 ng/µL (1-2 µL)

* Outras concentrações que foram testadas: 2,5 mM MgCl₂; primers: 16 µM; dNTPs: 1mM e Taq: 0,5 U/reação (Lopez-Uribe, comunicação pessoal).

** Utilizou-se MgSO₄ no lugar de MgCl₂.

^a BSA = adjuvante *Bovine Serum Albumin* que faz com que o DNA fique mais acessível à enzima para a amplificação. Amplificações foram feitas com e sem BSA.