

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E**  
**BIOLOGIA MOLECULAR**

A divisão subgenérica de *Trypoxylon* Latreille, 1796  
(Hymenoptera: Crabronidae) é sustentada por marcadores  
moleculares?

Camila Pereira Sabadini

São Carlos  
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E  
BIOLOGIA MOLECULAR

A divisão subgenérica de *Trypoxylon* Latreille, 1796  
(Hymenoptera: Crabronidae) é sustentada por marcadores  
moleculares?

Camila Pereira Sabadini

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Área de Concentração: Genética Evolutiva.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

São Carlos  
2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**Folha de Aprovação**

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Camila Pereira Sabadini, realizada em 04/06/2018:

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama  
UFSCar

Prof. Dr. Reinaldo Otávio Alvarenga Alves de Brito  
UFSCar

Prof. Dr. Lucio Antônio de Oliveira Campos  
UFV

O presente trabalho foi realizado com apoio da  
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal  
de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código  
de Financiamento 001.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Prof. Marco Antonio Del Lama, pela confiança em mim depositada não só para desenvolvimento deste trabalho, mas desde quando me convidou para integrar seu grupo de pesquisa há 4 anos, pela paciência e pelos ensinamentos tanto na área profissional como para minha formação como pessoa e que me acompanharão por toda minha caminhada.

Ao Prof. Carlos Alberto Garófalo (FFCLRP – USP) e ao técnico José Carlos Serrano (FFCLRP – USP) por compartilharem o conhecimento sobre a identificação do gênero *Trypoxylon*.

Aos grupos de pesquisas que nos forneceram amostras de coleta para integrar nossos dados, em especial a Doutoranda Patrícia Vilhena (FFCLRP – USP), o Doutorando Daércio Lucena (FFCLRP – USP), a Doutoranda Danúbia Maria da Costa (UEMA), o Doutorando Gustavo Araújo (UFTM) e o Prof. Tiago Izzo (UFTM).

Ao Dr. Wojciech J. Pulawski (California Academy of Science) que foi extremamente solícito, aceitando receber os espécimes para identificação e à Pós-Doutoranda Carolina de Barros Machado da Silva (UFSCar) pela paciência, ajuda e ensinamentos ao me auxiliar com *softwares* que eu nunca havia trabalhado, sendo de muita ajuda na definição de conceitos e na construção do texto.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da UFSCar, que contribuíram para minha formação por meio das disciplinas ministradas e aos funcionários e técnicos do Departamento de Genética e Evolução.

A todos do Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros (LGEH), àqueles que passaram e seguiram seu caminho deixando ensinamentos e companherismo e àqueles que permaneceram, estando comigo até os momentos finais da conclusão de minha dissertação. O meu muito obrigada à Isabel Godoy e à Kátia Maria Ferreira, por todo suporte durante esses 4 anos que estive no LGEH, pelas conversas, conselhos e desabafos.

Aos amigos Paula, Mariana, Fagner, Cristiani, Lida, Diana, Aline e Leandro, que compartilharam momentos de alegrias, dificuldades, aprendizados e muitas risadas, tornando toda essa caminhada um pouco mais leve. Em especial, o meu muito obrigada ao

meu irmão maranhense Leandro Pereira Rezende que me deu forças e acreditou em mim, muitas vezes quando eu não podia mais e que me mostra diariamente o valor de uma amizade.

Aos meus pais Silvana e Ailton que com muito trabalho conseguiram criar seus dois filhos, dando oportunidades e condições para nos tornarmos o que somos hoje. Cada dificuldade passada é um exemplo de que com amor, esforço e determinação a gente pode chegar lá e é em vocês que me inspiro todos os dias a continuar lutando.

Às pessoas especiais Gi Cavallaro e Felipe Rizzoli que entraram na minha vida por um motivo maior e fizeram parte de toda a minha trajetória até aqui, eu não poderia deixar de agradecer. Mesmo que já não estejam mais por perto diariamente, parte dessa conquista se deve a vocês que me incentivaram e acreditaram que eu era capaz.

E, finalmente, àqueles que estiveram por perto, torcendo, ou simplesmente oferecendo ajuda quando era a única coisa que poderiam fazer, o meu muito obrigada, porque em cada linha dessa dissertação tem um pouquinho de vocês.

## RESUMO

A família Crabronidae compreende um grupo de extrema importância na filogenia de Hymenoptera por ser considerada por alguns autores como o grupo que deu origem às abelhas; no entanto, ainda há poucos estudos sobre essa família. O gênero *Trypoxylon* é o mais diverso da família Crabronidae, com 631 espécies nas quais as fêmeas se ocupam da construção e provisionamento dos seus ninhos com aranhas que são paralisadas e depositadas em células de cria dispostas linearmente em cavidades preexistentes ou em ninhos de barro construídos por elas. O gênero é dividido em dois subgêneros com base em caracteres morfológicos e comportamentais. *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) é o mais diverso e não apresenta sinapomorfias que o sustentem como grupo monofilético. Em contrapartida, o subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) é caracterizado pelo comportamento de guarda exibido pelos machos. Apesar de muitos estudos com o subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) terem sido desenvolvidos no Brasil, o subgênero *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) foi pouco explorado, assim como os estudos de filogenia do gênero, o que se torna mais difícil ao passo que não há especialistas no país na identificação taxonômica desses organismos. A utilização de marcadores moleculares em estudos de genética evolutiva tem sido uma alternativa para casos como o de *Trypoxylon*, de maneira a possibilitar o estudo da história evolutiva do gênero. Para isso foi levantada a pergunta central que embasou esse trabalho: “A divisão subgenérica de *Trypoxylon* Latreille, 1796 (Hymenoptera: Crabronidae) é sustentada por marcadores moleculares?”. Para respondê-la, foram extraídas e sequenciadas para as regiões *pol*, CytB e COI amostras de 268 espécimes do gênero *Trypoxylon*. Foram realizadas também buscas em bancos de dados, totalizando 173 sequências do gene COI. Essas sequências foram submetidas a análises de diversidade nucleotídica, análises filogenéticas pelas metodologias de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança, além da estimativa de tempo de divergência e delimitação e identificação de espécies. Os resultados mostraram que o gene nuclear *pol* apresenta menor variação em relação aos genes mitocondriais CytB e COI que se mostraram bons candidatos para o estudo da variação intra e interespecífica. Os dados moleculares apresentaram altos valores de sustentação na divisão dos subgêneros em *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) e *Trypoxylon* (*Trypargilum*), porém foi observado que pode haver mais de dois subgêneros no gênero *Trypoxylon*. As análises de delimitação de espécies apresentaram na maioria dos casos os mesmos resultados, porém as incongruências observadas se assemelham às dificuldades encontradas também na classificação, sugerindo fortemente a necessidade de revisão do grupo com base em caracteres morfológicos e moleculares.

## ABSTRACT

The family Crabronidae comprises a group of extreme importance to the phylogeny of Hymenoptera and is considered by some authors to be the group that gave rise to bees. Despite this importance, very few studies have been conducted on the family. *Trypoxylon* is the most diverse genus in Crabronidae, with 631 species. Females supply of their nests with spiders, which are paralyzed and deposited in brood cells arranged linearly in pre-existing cavities or in nests of mud built by the females. The genus is divided into two subgenera based on morphological and behavioral characteristics. *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) *sensu stricto* is the most diverse and has no synapomorphies that sustain it as a monophyletic group. Nevertheless, the subgenus *Trypoxylon* (*Trypargilum*) is characterized by the guard behavior displayed by males. Although studies on the subgenus *Trypoxylon* (*Trypargilum*) have been developed in Brazil, few investigations have addressed the subgenus *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) or the phylogeny of the genus, which becomes more difficult due to the lack of specialists in the country that can perform the taxonomical identification of these organisms. The use of molecular markers in genetic evolutionary studies is an option for cases like *Trypoxylon* and enables the study of the evolutionary history of the genus. Therefore, the following question was raised and served as the basis for the present study: "Is the subgeneric division of *Trypoxylon* Latreille, 1796 (Hymenoptera: Crabronidae) supported by molecular markers?" To answer this question, we extracted and sequenced the *pol*, CytB and COI regions of 268 samples of the genus *Trypoxylon*. We also searched on databases and found 173 sequences of the COI gene. These sequences were subjected to analyses of nucleotide diversity, phylogenetic analysis by Bayesian Inference and Maximum Likelihood and estimated time of divergence as well as the delimitation and identification of species. The results showed that the nuclear gene *pol* is less varied in comparison to the mitochondrial genes CytB and COI, which were good candidates for the study of intraspecific and interspecific variation. The molecular data had high support values for the division of the subgenera into *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) and *Trypoxylon* (*Trypargilum*). However, the findings suggest that there may be more than two subgenera in the genus *Trypoxylon*. The species delimitation analyses demonstrated the same results in most cases, but the inconsistencies encountered resemble the difficulties found in the classification, strongly suggesting the need for a revision of the group based on morphological traits and molecular markers.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Árvore filogenômica de Hymenoptera .....	12
<b>Figura 2:</b> Formas de nidificação do gênero <i>Trypoxylon</i> .....	13
<b>Figura 3:</b> Visão interna do ninho de <i>Trypoxylon (Trypargilum) menkeanum</i> .....	14
<b>Figura 4:</b> Exemplo de macho em posição de guarda .....	16
<b>Figura 5:</b> Casulos do gênero <i>Trypoxylon</i> .....	16
<b>Figura 6:</b> Ninhos-armadilhas.....	20
<b>Figura 7:</b> Géis de agarose dos genes <i>wg</i> e <i>pol</i> .....	29
<b>Figura 8:</b> Eletroferograma do gene <i>wg</i> .....	30
<b>Figura 9:</b> Eletroferograma do gene <i>pol</i> .....	31
<b>Figura 10:</b> Rede de haplótipos do gene <i>pol</i> .....	33
<b>Figura 11:</b> Árvore filogenética da região <i>pol</i> de espécimes do gênero <i>Trypoxylon</i> (IB) .....	34
<b>Figura 12:</b> Árvore filogenética da região <i>pol</i> de espécimes do gênero <i>Trypoxylon</i> (ML).....	35
<b>Figura 13:</b> Eletroferograma da região <i>citB</i> .....	36
<b>Figura 14:</b> Eletroferograma da região <i>COI</i> .....	36
<b>Figura 15:</b> Rede de haplótipos do gene <i>citB</i> .....	39
<b>Figura 16:</b> Árvore filogenética da região <i>citB</i> de espécimes do gênero <i>Trypoxylon</i> (IB).....	41
<b>Figura 17:</b> Árvore filogenética da região <i>citB</i> de espécimes do gênero <i>Trypoxylon</i> (ML).....	42
<b>Figura 18:</b> Rede de haplótipos do gene <i>COI</i> .....	45
<b>Figura 19:</b> Árvore filogenética da região <i>COI</i> de espécimes do gênero <i>Trypoxylon</i> (IB) .....	47
<b>Figura 20:</b> Árvore filogenética da região <i>COI</i> de espécimes do gênero <i>Trypoxylon</i> (ML) .....	48
<b>Figura 21:</b> Árvore filogenética das regiões mitocondrial <i>COI</i> e <i>citB</i> concatenadas (IB) .....	50
<b>Figura 22:</b> Árvore filogenética das regiões mitocondrial <i>COI</i> e <i>citB</i> concatenadas (ML) .....	51
<b>Figura 23:</b> Espécimes de <i>Trypoxylon</i> disponíveis no BOLD .....	52
<b>Figura 24:</b> Árvore filogenética do gene <i>COI</i> por IB (subgênero <i>Trypargilum</i> ) e divisão em grupos de espécies .....	56
<b>Figura 25:</b> Árvore filogenética do gene <i>COI</i> por IB (subgênero <i>Trypoxylon</i> ) e divisão em grupos de espécies .....	57
<b>Figura 26:</b> Árvore filogenética do gene <i>COI</i> por ML (subgênero <i>Trypargilum</i> ).....	58
<b>Figura 27:</b> Árvore filogenética do gene <i>COI</i> por ML (subgênero <i>Trypoxylon</i> ).....	59
<b>Figura 28:</b> Árvore filogenética evidenciando o tempo de divergência do gênero <i>Trypoxylon</i> .....	60
<b>Figura 29:</b> Delimitação de espécies do subgênero <i>Trypargilum</i> .....	62
<b>Figura 30:</b> Delimitação de espécies do subgênero <i>Trypoxylon</i> .....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Comparação da classificação dos grupos de espécies do gênero <i>Trypoxylon</i> subgênero <i>Trypargilum</i> .....	15
<b>Tabela 2:</b> Relação das localidades de coleta .....	20
<b>Tabela 3:</b> Espécimes de <i>Trypoxylon</i> fornecidos por grupos de pesquisa parceiros do LGEH.....	22
<b>Tabela 4:</b> Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e seus respectivos autores. ....	23
<b>Tabela 5:</b> Ciclos das reações de PCR.....	24
<b>Tabela 6:</b> Morfotipos do gênero <i>Trypoxylon</i> extraídos .....	28
<b>Tabela 7:</b> Posição dos picos duplos em sequência do gene <i>pol</i> .....	30
<b>Tabela 8:</b> Sequências analisadas para a região <i>pol</i> .....	32
<b>Tabela 9:</b> Identificação das amostras do gênero <i>Trypoxylon</i> analisadas para o gene <i>citB</i> .....	38
<b>Tabela 10:</b> Identificação das amostras do gênero <i>Trypoxylon</i> analisadas para o gene <i>COI</i> .....	44
<b>Tabela 11:</b> Informações das sequências obtidas de bancos de dados.....	53

## SUMÁRIO

1 Introdução.....	9
2 Material e Métodos.....	19
2.1 Obtenção de amostras.....	19
2.2 Obtenção do DNA, amplificação, sequenciamento e análise das sequências nucleotídicas.....	23
2.3 Obtenção de sequências em bancos de dados.....	25
2.4 Análises filogenéticas.....	25
2.5 Delimitação de espécies.....	26
3 Resultados.....	28
3.1 Amostragem e obtenção das sequências nucleotídicas.....	28
3.2 Caracterização dos genes nucleares e análise filogenética.....	28
3.3 Caracterização dos genes mitocondriais e análises filogenéticas.....	36
3.4 Seleção das sequências de bancos de dados, análises filogenéticas e estimativa de tempo de divergência dos subgêneros.....	52
3.5 Delimitação de espécies.....	61
4 Discussão.....	64
4.1 Caracterização da variação gênica.....	64
4.2 Relações de parentesco entre os subgêneros.....	65
4.3 Divisão dos subgêneros em grupos de espécies.....	68
4.4 Identificação molecular das espécies do gênero <i>Trypoxylon</i> .....	70
5 Considerações finais.....	73
6 Referências bibliográficas.....	75
APÊNDICES.....	87

## 1 Introdução

Desde os primórdios, o ser humano sempre demonstrou a necessidade de fazer classificações. Os primeiros registros de classificação dos organismos vivos datam de 360 a.C., quando o filósofo Aristóteles foi capaz de identificar características comuns entre eles, propondo a formação de grupos com base em estruturas organizadas de maneira dicotômica, das mais simples às mais complexas, estabelecendo certa hierarquia entre os grupos. Aristóteles os descreveu inicialmente como organismos que se moviam, dando a eles o nome de animais, e indivíduos que não se moviam, sendo estes as plantas (LOPES; CHOW HO, 2018).

Com o desenvolvimento de novas ferramentas, como o microscópio de luz por Antonie Van Leeuwenhoek, organismos microscópicos puderam ser descritos, revelando uma diversidade maior, trazendo a necessidade da modificação da classificação feita até então (MADIGAN et al., 2016).

Carl Von Linné (Carolus Linnaeus) foi outro cientista extremamente importante na classificação dos organismos. Em sua principal obra, denominada *Systema Naturae* (1735), ele descreveu os organismos de maneira sistematizada, perdurando a forma dicotômica de classificação até o surgimento das ideias evolucionistas de Charles Darwin e Alfred Russel Wallace em 1859, quando a evolução passou a integrar as discussões que permeavam o estudo do campo biológico e, sobretudo, a classificação dos seres vivos (LOPES; CHOW HO, 2018; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A partir deste marco, começou a ser levado em conta o parentesco evolutivo dos seres vivos ao se fazer as classificações, surgindo o que foi chamado de filogenia dos diferentes grupos de organismos. Em 1866, o entomólogo Ernst Haeckel apresentou o seu sistema de classificação como uma árvore na qual deixava explícitas as relações evolutivas de parentesco entre os seres vivos, sistema que ainda hoje é utilizado (SHARKEY, 2007).

Na década de 1950, avanços tecnológicos surgiram e com o advento da biologia molecular foi possível o desenvolvimento da escola filogenética que mais tarde seria utilizada para discussão das relações entre as espécies existentes (LOPES; CHOW HO, 2018).

Atualmente, a proposta de classificação mais aceita é a elaborada por Robert Whittaker (1959), a qual divide os organismos vivos em cinco reinos, dos quais se destaca o Reino Animalia, representado por organismos heterótrofos que interagem com o meio ambiente na busca por alimento (MADIGAN et al., 2016).

No Reino Animalia está incluída a classe Insecta, a mais diversa em número de espécies, diversidade de hábitos de vida e distribuição geográfica, representada por organismos que apresentam, entre suas características principais, três pares de pernas articuladas e corpo dividido em três tagmas (RUPPERT; BARNES, 1996).

Na Classe Insecta, destaca-se a ordem Hymenoptera por ser uma das mais diversas, com cerca de 153.000 espécies descritas, de hábitos de vida diversos como predadores, parasitoides ou polinizadores, estes com especial importância ecológica e econômica (GRISSELL, 1999; GRIMALDI; ENGEL, 2005; AGUIAR et al., 2013).

A ordem Hymenoptera, representada por abelhas, formigas, sínfitas, vespas esfecídeas e parasitoides (SHARKEY, 2007), é um dos grupos responsáveis por cerca de 80% da polinização de espécies de plantas brasileiras (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ESTUDOS DAS ABELHAS, 2018), além de desempenharem enorme papel ecológico como decompositores e predadores (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Atualmente, as vespas parasitoides constituem também alternativa ao uso de pesticidas a partir do manejo integrado de pragas (ABREU; ROVIDA; CONTE, 2015) e as abelhas respondem também pela produção de mel e própolis e pela polinização, tendo papel importante na economia (MICHENER, 2007).

Ademais, ocorreu em Hymenoptera a evolução do comportamento social, temática amplamente estudada e que permanece levantando diversas questões por envolver conceitos de altruísmo, cooperação e conflitos, sendo um desafio à teoria evolutiva reconhecido pelo próprio Darwin (1859) (HERRON; FREEMAN, 2014). Neste contexto, argumentos inovadores foram propostos, como a associação do sistema haplodiploide de determinação do sexo dos himenópteros e a assimetria de parentesco entre as filhas, favorecendo o comportamento social (HAMILTON, 1964; CROZIER, 2008).

A classificação de Hymenoptera vem sendo amplamente estudada e diversos trabalhos foram publicados com dados morfológicos, comportamentais e moleculares para estabelecer as relações filogenéticas existentes entre os grupos inclusos na ordem (RASNITSYN, 1988; RONQUIST et al., 1999; RONQUIST, 1999; CARPENTER; WHEELER, 1999; DOWTON; AUSTIN, 2001; SHARKEY, 2007; SHARKEY et al., 2012; AGUIAR et al., 2013; PETERS et al., 2017).

Atualmente, a ordem é dividida em duas subordens, denominadas Symphyta (sínfitas) e Apocrita (vespas, formigas e abelhas), em que a diferença principal entre elas é a

constrição dos primeiros segmentos abdominais, possibilitando maior mobilidade abdominal, favorecendo a maior diversificação de Apocrita (VILHELMSSEN; MIKÓ; KROGMANN, 2010; PETERS et al., 2017).

Apocrita, por sua vez, inclui as superfamílias “Parasitica” caracterizada pelo comportamento de parasitismo e ausência de ferrão e Aculeata, que agrupa indivíduos com o comportamento de predação favorecido pela presença do acúleo ou ferrão (GRIMALDI; ENGEL 2005; SHARKEY, 2007; SHARKEY et al., 2012; AGUIAR et al., 2013; PETERS et al., 2017).

Em trabalho recente sobre a história evolutiva de Hymenoptera, Peters e colaboradores (2017) corroboraram a classificação de Hymenoptera utilizando dados filogenômicos, chegando à conclusão de que “Symphyta” e “Parasitica” correspondem a grupos parafiléticos, enquanto que Apocrita e Aculeata são grupos monofiléticos.

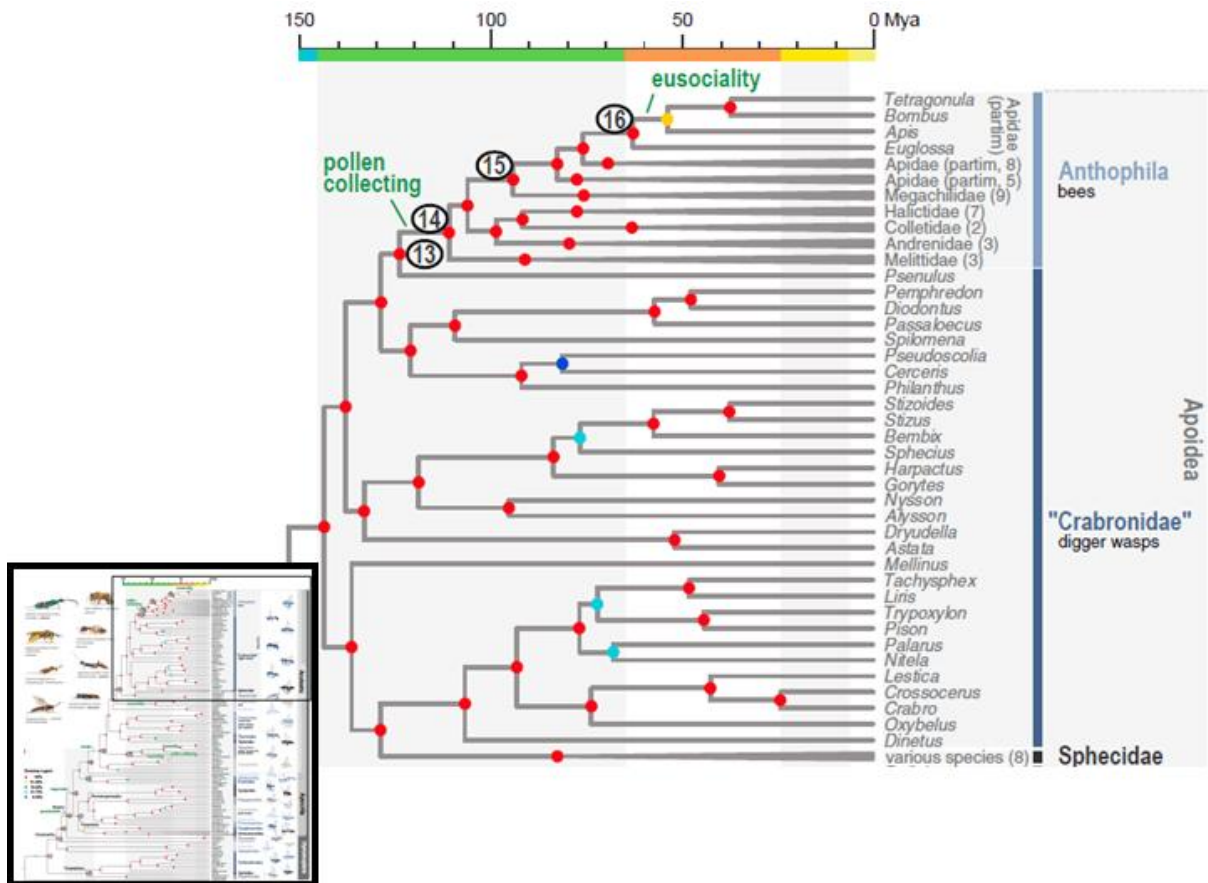
A classificação de Aculeata também já foi alvo de diversos estudos e a mais aceita inclui a superfamília denominada “Vespoidea”, parafilética, e uma segunda superfamília monofilética, denominada de Apoidea que agrupa os demais aculeados (SHARKEY, 2007; SHARKEY et al., 2012; PILGRIM; VON DOHLEN; PITTS, 2008).

Apoidea inicialmente foi dividida nas famílias Sphecidae e Apidae e agrupadas em um táxon denominado Sphegiformia (MÜLLER, 1872). Porém, estudos posteriores apontaram que Sphecidae poderia ser considerado um grupo parafilético, devido a indícios de que Apidae teria se originado a partir de vespas esfeciformes, reforçando a ideia de que as duas famílias poderiam ser agrupadas em um grupo monofilético (LOMHOLDT, 1982; ALEXANDER, 1992; PRENTICE, 1998; MELO, 1999; OHL; BLEIDORN, 2006; LOHRMANN et al., 2008). Essa classificação foi suportada por vários autores que reconheceram uma única superfamília denominada Sphecoidea (MICHENER, 1944; BROTHERS, 1975; BOHART; MENKE, 1976) No entanto, posteriormente, Michener (1986) sugeriu utilizar o nome Apoidea pelo fato de ter sido o primeiro nome proposto e ter assim prioridade.

Portanto, de acordo com a classificação mais aceita atualmente, Apoidea agrupa vespas predadoras e abelhas e está dividido em cinco famílias: Sphecidae, Ampulicidae, Heterogynaidae, Apidae e Crabronidae (ALEXANDER, 1992; MELO, 1999; BROTHERS, 1999; AGUIAR et al., 2013; AMARANTE, 2002; PETERS et al., 2017), sendo Sphecidae, grupo irmão de Crabronidae (PRENTICE, 1998; MELO, 1999; OHL;

BLEIDORN, 2006; PETERS et al., 2017) e Crabronidae o grupo que deu origem a Anthophila, no qual estão incluídas todas as abelhas (Figura 1) (DANFORTH et al., 2013; PETERS et al., 2017), o que constitui um motivo relevante para o estudo de Crabronidae.

**Figura 1:** Árvore filogenômica de Hymenoptera. Círculos azuis escuros indicam 0% de bootstrap, azuis claro de 71-55%, amarelos de 91-99% e vermelhos 100%.



Fonte: Modificado de Peters et al. 2017

A família Crabronidae é considerada um grupo monofilético por alguns autores com base em caracteres morfológicos (LOMHOLDT, 1982; MELO, 1999; MICHENER, 2007). No entanto, para outros autores que utilizaram dados morfológicos (ALEXANDER, 1992) e moleculares (OHL; BLEIDORN, 2006; LOHRMANN et al., 2008; DEBEVEC; CARDINAL; DANFORTH, 2012; PETERS et al., 2017), Crabronidae pode ser considerado um grupo parafilético, com base em evidências que apontam que a família Heterogynaidae está inclusa em Crabronidae (ALEXANDER, 1992; OHL; BLEIDORN, 2006; DEBEVEC; CARDINAL; DANFORTH, 2012). Porém, estas relações ainda não estão bem esclarecidas e Apoidea ainda é subdividida em cinco famílias, permanecendo Crabronidae separada de Heterogynaidae (PULAWSKI, 2018).

Crabronidae destaca-se entre os Apoidea por ser cosmopolita e extremamente diversa. É representada basicamente por vespas solitárias e predadoras especializadas em capturar e paralisar a presa que servirá de alimento para a sua prole (BOHART; MENKE, 1976; MELO, 2000; HANSON; MENKE, 2006).

A família Crabronidae é dividida em oito subfamílias, sendo uma delas denominada Crabroninae, na qual está inclusa a tribo Trypoxylini que, por sua vez, agrupa oito gêneros, sendo *Trypoxylon* Latreille, 1796 considerado o mais diverso da família, com 631 espécies (PULAWSKI, 2018).

Espécies de *Trypoxylon* apresentam hábito de vida solitário. As fêmeas se ocupam da construção e aprovisionamento de seus ninhos com aranhas, que são paralisadas e depositadas em células de cria, dispostas linearmente em cavidades preexistentes ou em tubos de barro construídos pelas mesmas (Figura 2). Ao término do aprovisionamento de cada célula, um ovo é colocado sobre uma das presas estocadas e uma divisória de barro é construída, individualizando as células de cria (Figura 3) (BOHART; MENKE, 1976; COVILLE, 1982).

**Figura 2:** Formas de nidificação do gênero *Trypoxylon*. A. *Trypoxylon* sp. nidificando em cavidade preexistente em parede; B. Ninho de barro construído por *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*.



Fotos: Camila Sabadini



**Figura 3:** Visão interna do ninho de *Trypoxylon (Trypargilum) menkeanum* em um ninho-armadilha, evidenciando três células. Na primeira e segunda células é possível observar as larvas sobre o abdômen de uma aranha; na terceira célula, há apenas aranhas e, provavelmente, um ovo que ainda não eclodiu.



Fonte: COVILLE; GRISWOLD; COVILLE, 2015.

Inicialmente, este gênero foi dividido por Richards (1934) nos subgêneros *Trypoxylon (Trypoxylon)* e *Trypoxylon (Trypargilum)*. Krombein (1967) ao revisá-lo, sugeriu que os subgêneros fossem elevados a nível de gênero, o que posteriormente foi refutado por Bohart & Menke (1976) e Coville (1982) que revalidaram a proposta original de Richards (1934).

Esta divisão infragenérica, considerada até os dias atuais, foi baseada em caracteres morfológicos, biológicos e comportamentais, porém *Trypoxylon (Trypoxylon)* *sensu stricto* não apresenta sinapomorfias que sustentem sua condição de grupo monofilético. Em contrapartida, *Trypoxylon (Trypargilum)* se diferencia principalmente pelo comportamento de guarda exibido pelo macho ao longo do processo de nidificação, traço considerado por muitos autores como uma sinapomorfia para o subgênero (AMARANTE, 2005; BROCKMANN, 1980; COVILLE, 1982; BERGAMASCHI et al., 2015).

*Trypoxylon (Trypoxylon)* apresenta distribuição mundial e agrupa 543 espécies descritas que exibem grande variação morfológica (PULAWSKI, 2018) e são subdivididas em cinco grupos de espécies: *T. fabricator*, *T. scutatatum*, *T. marginatum*, *T. figulus* e *T. rufidens* (RICHARDS, 1934).

Por outro lado, o subgênero *Trypoxylon (Trypargilum)* é menos diverso e apresenta registros desde o sul do Canadá até o sul da Argentina. Atualmente, 88 espécies são reconhecidas; estas foram catalogadas e agrupadas, com base em caracteres morfológicos e comportamentais, nos grupos de espécies *T. albitarse*, *T. superbum*, *T. punctulatum*, *T. spinosum* e *T. nitidum* que por sua vez, são subdivididos em subgrupos (RICHARDS, 1934).

Mais tarde esses grupos de espécies foram revisados por Sandhouse (1940) que analisou as espécies do gênero *Trypoxylon* com distribuição neártica alterando os nomes dos grupos para Fabricator, Scutatatum, Marginatum, Figulus e Rufidens para o subgênero

*Trypoxylon* (*Trypoxylon*) e grupos Politum (semelhante ao grupo *T. albitarse*), Punctulatum, Spinosum e Nitidum para o subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*).

Em 1982, Coville analisando as espécies do subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) da América do Norte, propôs uma nova classificação para os grupos de espécies, alterando o nome dos subgrupos de Richards (1934) para complexos e propondo uma nova reorganização destes, voltando o grupo Politum para o nome Albitarse e rebaixando os grupos *T. punctulatum* e *T. spinosum* a nível de complexos dentro do grupo Nitidum (Tabela 1) (COVILLE, 1982).

**Tabela 1:** Comparação da classificação dos grupos de espécies do gênero *Trypoxylon* subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*).

Richards (1934)	Sandhouse (1940)	Coville (1982)
Grupo <i>T. superbum</i>		Grupo Superbum
Grupo <i>T. albitarse</i>	Grupo Politum	Grupo Albitarse
Subgrupo <i>T. albitarse</i>		Complexo albitarse
Subgrupo <i>T. palliditarse</i>		
Subgrupo <i>T. fuscipenne</i>		Complexo fuscipenne
Subgrupo <i>T. poultoni</i>		Complexo poultoni
Grupo <i>T. punctulatum</i>	Grupo Punctulatum	Grupo Nitidum
Grupo <i>T. nitidum</i>		Complexo punctulatum
Subgrupo <i>T. nitidum</i>		Complexo nitidum
Subgrupo <i>T. aureovestitum</i>		Complexo aureovestitum
Subgrupo <i>T. excavatum</i>		Complexo excavatum
Subgrupo <i>T. fugax</i>		Complexo fugax
Subgrupo <i>T. vagum</i>	Complexo vagum	
Grupo <i>T. spinosum</i>	Grupo Spinosum	Complexo spinosum

Fonte: Modificado de Coville (1982).

Os subgêneros apresentam diferenças morfológicas, biológicas e comportamentais, com destaque para duas delas: i) o comportamento de guarda exibido pelos machos do subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) (Figura 4) que, ao formar par com uma fêmea, mantêm presença constante durante o processo de nidificação, o que pode ser eficiente contra ataque de parasitoides, predadores e competidores intraespecíficos (BROCKMANN; GRAFEN, 1989), além de provavelmente, ser uma forma de garantir a paternidade da prole feminina como apontado por Bergamaschi et al. (2015); ii) a morfologia do casulo que em *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) é delicado, com uma coloração branca se assemelhando a seda (Figura 5A) e em *Trypoxylon* (*Trypargilum*) é mais rígido e com coloração marrom

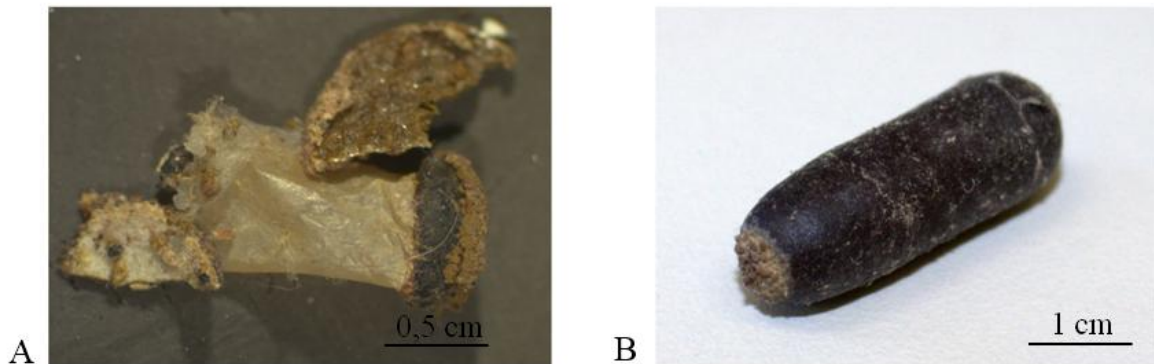
envernizada devido às secreções que a larva incorpora ao construí-lo (Figura 5B) (KROMBEIN, 1967; MATTHEWS; MATTHEWS, 1968; BOHART; MENKE, 1976).

**Figura 4:** Exemplo de macho em posição de guarda. Macho do grupo *T. (Trypargilum) nitidum* na posição de guarda durante a nidificação em ninho reaproveitado de *T. (Trypargilum) albitarse*.



Foto: Camila Sabadini

**Figura 5:** Casulos do gênero *Trypoxylon*. A. Casulo de *Trypoxylon (Trypoxylon) punctivertex*; B. Casulo de *T. (Trypoxylon) albitarse*.



Fotos: Camila Sabadini

Ademais, outra característica que distingue as espécies do subgênero *Trypoxylon (Trypargilum)* é a morfologia da espermateca das fêmeas, considerada não funcional quando comparada às de fêmeas de *Trypoxylon (Trypoxylon)* (MOREIRA, 2007). Este fato pode justificar a necessidade de repetidas cópulas imediatamente antes da oviposição para gerar filhas, demandando a presença constante do macho durante o processo de nidificação.

Sendo assim, acredita-se que esse comportamento, compartilhado pelas espécies do subgênero, tenha surgido a partir de um ancestral comum e se estabeleceu no tempo evolutivo com a receptividade da fêmea a repetidas cópulas ao longo do processo de nidificação (ALCOCK et al., 1978).

Por concentrar grande riqueza de espécies, a região Neotropical foi alvo de muitos estudos no intuito de obter dados sobre a história natural do subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*). A maior parte dos estudos relacionados à fauna Neotropical foi realizada no Brasil, focando diversos aspectos - taxonomia, distribuição geográfica, biologia, comportamento, alocação sexual, parentesco intranidal, morfologia, citogenética, estrutura familiar e genética de populações (AMARANTE, 1991a; 1991b; 2002; 2005; ARAUJO et al., 2002; PERUQUETTI, 2003; 2005; PERUQUETTI; DEL LAMA, 2003; BUSCHINI, 2006; 2007; BUSCHINI; WOLF, 2006; BUSCHINI; BERGAMASCHI, 2010; BUSCHINI; DONATTI, 2012; SANTONI; DEL LAMA, 2007; SANTONI, 2008; SANTONI; BRESCOVIT; DEL LAMA, 2009; ALMEIDA 2010; ALMEIDA et al., 2013; BERGAMASCHI, 2013; BERGAMASCHI et al., 2015; BERGAMASCHI; DEL LAMA, 2015)

Entretanto, a amostragem e a quantidade de trabalhos com espécies do subgênero *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) na região Neotropical é quase inexistente, com apenas alguns estudos sobre socialidade e biologia de nidificação em *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) *asuncicola* Strand, 1910 (PERUQUETTI; DEL LAMA, 2003) e análise citogenética das espécies *T.* (*Trypoxylon*) *asuncicola*, *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) *fabricator* Strand, 1910 e *T.sp1* (GOMES; POMPOLO; CAMPOS et al., 1995).

Os estudos de filogenia são muito esparsos no gênero, assim como não há especialistas capazes de fazer a identificação taxonômica, o que constitui um sério impedimento no estabelecimento da classificação no gênero.

Atualmente, a utilização de marcadores moleculares tem sido uma forma de aumentar as informações disponíveis para auxiliar no estudo dos mais diversos grupos de organismos vivos de tal forma que, questões dificilmente esclarecidas pelos marcadores morfológicos, passam a ser prioridade para o uso de marcadores moleculares (BLAXTER, 2003).

A utilização dos marcadores moleculares é pautada pelo preceito de que a informação necessária está distribuída em todo o genoma; porém, para que seja eficiente, o tipo de marcador a ser utilizado deve ter estrutura e modo de herança conhecidos, além de apresentar variação entre as populações e espécies (AVISE, 1994).

Os marcadores mitocondriais são considerados os marcadores modelos para os estudos de genética evolutiva, pois apesar de representar uma pequena parte da informação

genética contida nos organismos, são mais fáceis de acessá-los devido ao tamanho reduzido, por estar presente em uma organela ao invés de estar no núcleo, não apresentar íntrons e sequências repetitivas, o que facilita o processo de leitura das sequências nucleotídicas e posterior análise dos dados, além de apresentar herança uniparental materna e maior taxa de variabilidade se comparado aos genes nucleares, culminando em uma evolução mais rápida (BROWN et al., 1982; WILSON et al., 1985; MORITZ; DOWLING; BROWN, 1987; SACCONI et al., 1999).

O gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI) tem sido utilizado como um código de barras genético (DNA Barcode) para identificar táxons (HEBERT et al., 2003), sendo uma excelente ferramenta para estudos taxonômicos. Ele apresenta duas vantagens em relação aos demais genes mitocondriais: i) existência de diversos marcadores universais conhecidos para esse gene e que englobam quase todos os filos animais (FOLMER et al., 1994; ZHANG; HEWITT, 1997); ii) possui alta ocorrência de substituições na terceira base nucleotídica, elevando a sua taxa de evolução molecular em três vezes se comparada a de outros genes mitocondriais como 12S e 16S, permitindo assim a caracterização de espécies, bem como a diferenciação entre as espécies (KNOWLTON; WEIGT, 1998; COLLINS; CRUICKSHANK, 2012).

O gene COI pode ser utilizado conjuntamente com outros genes para estabelecer relações filogenéticas mais robustas (SIMMONS; WELLER, 2001), o que pode ser de especial utilidade em investigações como no caso do gênero *Trypoxylon*, em que a realização de estudos sobre a biologia, estrutura populacional e comportamento de nidificação é dificultada pela falta de especialistas para uma segura identificação das espécies do gênero, fato este que tem sido um sério obstáculo para as pesquisas desenvolvidas não só pelo nosso, mas também para outros grupos de pesquisa.

O interesse de tornar possível o estudo desse grupo fascinante acabou por inspirar a realização deste trabalho, de modo que ao estudarmos melhor a história evolutiva do grupo poderemos testar a monofilia dos subgêneros e será possível também testar a identificação molecular dos indivíduos tanto por descoberta de espécies novas como por caracterização das espécies já identificadas, possibilitando assim que outros trabalhos sejam realizados em futuro próximo.

Ademais, *Trypoxylon* também é um representante de Crabronidae, outro grupo com poucos estudos filogenéticos (MELO, 1999; HANSON; MENKE, 2006; ROSA, 2015) e

que pode nos fornecer informações valiosas sobre a ascendência e história evolutiva das abelhas (DEBEVEC; CARDINAL; DANFORTH, 2012; DANFORTH et al., 2013; PETERS et al., 2017). Além disso, estudos têm demonstrado que abelhas e vespas que nidificam em cavidades preexistentes tendem a apresentar um maior número de espécies em ambientes mais alterados (KLEIN et al., 2002), o que torna tais espécies sensíveis bioindicadores da ação antrópica e de mudanças ambientais (TSCHARNTKE; GATHMANN; STEFFAN-DEWENTER et al., 1998), sendo de grande valia o conhecimento da classificação e identificação desses organismos.

Considerando que a divisão subgenérica de *Trypoxylon* foi realizada apenas com base em marcadores morfológicos e comportamentais, uma questão imediatamente decorre deste fato, constituindo a pergunta central que sustenta este trabalho: “A divisão subgenérica de *Trypoxylon* Latreille, 1796 (Hymenoptera: Crabronidae) é sustentada por marcadores moleculares?”.

Neste sentido, para que tal questão fosse adequadamente respondida, dois objetivos específicos foram traçados: i) padronizar marcadores moleculares de forma a utilizá-los como meio de estimar a variação entre as espécies de cada subgênero; ii) estimar as relações evolutivas entre as espécies dos subgêneros, assim como entre os subgrupos que os compõem.

## **2 Material e Métodos**

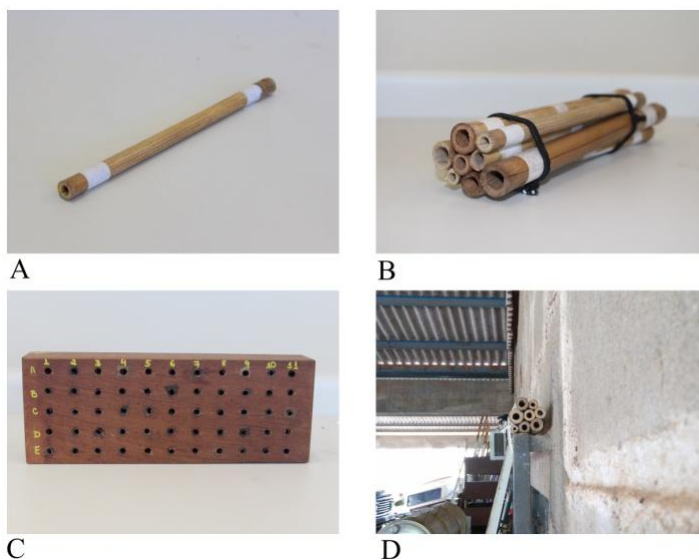
### *2.1 Obtenção de amostras*

Os espécimes utilizados nas análises foram obtidos de duas formas. A primeira foi por meio de coleta feita por nós ou em trabalhos realizados anteriormente no Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros (LGEH) utilizando ninhos-armadilha e busca ativa por ninhos de barro construídos em paredes. Os ninhos-armadilha foram feitos com gomos de bambu de 5 mm a 10 mm de diâmetro, cortados na região dos nós de forma que ficassem com, aproximadamente, 20 cm de comprimento. Esses gomos foram cortados longitudinalmente e as duas partes foram mantidas juntas com auxílio de fita adesiva de forma que pudessem ser abertos facilmente quando necessário. Por fim, os tubos de bambu foram agrupados em pacotes com oito unidades (Figura 6A e 6B).

Outro modelo de ninho-armadilha utilizado foi elaborado com uma placa de madeira com furos onde eram encaixados tubos de papel cartão com cerca de 10 cm de

comprimento e 6 mm ou 8 mm de diâmetro (Figura 6C). Após a confecção, eles eram dispostos na localidade a ser estudada (Tabela 2) e de 15 em 15 dias eram feitas visitas para averiguar se havia nidificação (Figura 6D).

**Figura 6:** Ninhos-armadilhas. A. Gomo de bambu cortado e colado com fita adesiva o que correspondia a um ninho-armadilha; B. Pacote com oito ninhos armadilha; C. Ninho-armadilha feito em placa de madeira, os tubos onde os indivíduos nidificam foram confeccionados com papel cartão; D. Pacote instalado em área de coleta.



Fotos: Camila Sabadini

**Tabela 2:** Relação das localidades de coleta especificando as siglas utilizadas, os pontos nos quais foram instalados ninhos-armadilha e suas respectivas coordenadas. UFSCar: Universidade Federal de São Carlos, UFLA: Universidade Federal de Lavras, UFV: Universidade Federal de Viçosa, UESC: Universidade Estadual de Santa Cruz.

Sigla	Localidades	Ponto de coleta	Coordenadas
ARR	Araras – SP	Campus da UFSCar	22°18'41"S, 47°23'05"W
SCL	São Carlos – SP	Campus da UFSCar	21°59'03"S, 47°52'55"W
RIF	Rifaina – SP	Zona rural - Fazenda Rio Branco	20°03'32"S, 47°26'25"W
SJC	São José dos Campos – SP	Zona rural – Estrada Municipal Petybon	23°11'01"S, 45°55'39"W
LAV	Lavras – MG	Campus da UFLA	21°13'56"S, 44°59'37"W
VIC	Viçosa – MG	Campus da UFV	20°45'39"S, 42°51'50"W
ILH	Ilhéus – BA	Campus da UESC	14°47'46"S, 39°10'22"W
CFO	Campo Formoso – BA	Chapada Diamantina – Fazenda Formosa	10°21'37"S, 40°26'09"W
GUA	Guarapuava – PR	Parque Municipal das Araucárias	25°23'36"S, 51°27'19"W
PRU	Prudentópolis – PR	Zona rural - BR 277 / Km 284	25°19'08"S, 51°01'56"W
SMA	Atílio Vivácqua – ES	Zona rural - São Pedro	20°56'32"S, 41°11'51"W

Quando era registrado sinal de nidificação, tanto em ninhos-armadilha quanto em ninhos de barro, esperava-se o término desta e o desenvolvimento da prole até a fase de casulo, quando os indivíduos eram colocados individualmente em vidros de penicilina e

deixados à temperatura ambiente até a emergência do adulto. Após isso, eram anotadas as informações de sexo e data de emergência e os indivíduos transferidos para tubos de 1,5 ml com álcool 85% e estocados a -4°C para posterior extração do DNA. A segunda forma de obtenção de amostras foi pela concessão de espécies em álcool, ou montados a seco por grupos de pesquisa parceiros do LGEH (Tabela 3).

A triagem do material obtido para o presente trabalho consistiu em separar os organismos de acordo com seus tipos morfológicos com base nas chaves de identificação de Bohart & Menke (1976) e Coville (1982). Essa identificação foi realizada por nós quando possível, pelos grupos de pesquisa descritos na Tabela 3 e pelo Dr. Wojciech J. Pulawski (California Academy of Science). Quando não era possível efetuar a classificação utilizando chaves de identificação, o morfotipo recebia um nome genérico para identificação como descrito nos resultados.



**Tabela 3:** Espécimes de *Trypoxylon* fornecidos por grupos de pesquisa parceiros do LGEH. N (número de espécimes), ARA (Aracajú - SE), CAR (Ilha do Cardoso-SP), CAN (Cananéia-SP), COM (Ilha Comprida- SP), ITI (Itirapina-SP) e COT (Cotriguaçu - MT).

Universidade	Grupo de pesquisa	Morfotipos	N	Localidade de coleta	Armazenamento
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)	Agroecologia de Desenvolvimento Rural	Sp01- ARA	3	ARA	Seco
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)	Agroecologia de Desenvolvimento Rural	Sp02 - ARA	3	ARA	Seco
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)	Agroecologia de Desenvolvimento Rural	Sp03 - ARA	2	ARA	Seco
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)	Agroecologia de Desenvolvimento Rural	Sp04 - ARA	3	ARA	Seco
USP – Ribeirão Preto (FFCLRP)	Laboratório de Ecologia e Evolução de Abelhas e Vespas	Morfotipo "A"	8	CAR, CAN e COM	Seco e álcool
USP – Ribeirão Preto (FFCLRP)	Laboratório de Ecologia e Evolução de Abelhas e Vespas	Morfotipo "B"	4	CAR e CAN	Seco e álcool
USP – Ribeirão Preto (FFCLRP)	Laboratório de Ecologia e Evolução de Abelhas e Vespas	Morfotipo "C"	10	CAN, CAN e COM	Seco e álcool
USP – Ribeirão Preto (FFCLRP)	Laboratório de Ecologia e Evolução de Abelhas e Vespas	Morfotipo "D"	3	CAR	Seco e álcool
USP – Ribeirão Preto (FFCLRP)	Laboratório de Ecologia e Evolução de Abelhas e Vespas	Morfotipo "E"	1	CAR	Seco e álcool
USP – Ribeirão Preto (FFCLRP)	Laboratório de Ecologia e Evolução de Abelhas e Vespas	Morfotipo "F"	1	CAR	Seco e álcool
USP – Ribeirão Preto (FFCLRP)	Laboratório de Ecologia e Evolução de Abelhas e Vespas	Morfotipo "H"	2	COM	Seco e álcool
USP – Ribeirão Preto (FFCLRP)	Laboratório de Ecologia e Evolução de Abelhas e Vespas	<i>T. lactitarse</i>	2	CAR	Seco e álcool
USP – Ribeirão Preto (FFCLRP)	Laboratório de Ecologia e Evolução de Abelhas e Vespas	<i>T. punctivertex</i>	4	CAN e COM	Seco e álcool
USP – Ribeirão Preto (FFCLRP)	Laboratório de Biologia Comparada de Abelhas	<i>T. punctivertex</i>	7	ITI	Álcool
USP – Ribeirão Preto (FFCLRP)	Laboratório de Biologia Comparada de Abelhas	<i>T. lactitarse</i>	3	ITI	Álcool
USP – Ribeirão Preto (FFCLRP)	Laboratório de Biologia Comparada de Abelhas	<i>T. rogenhoferi</i>	4	ITI	Álcool
USP – Ribeirão Preto (FFCLRP)	Laboratório de Biologia Comparada de Abelhas	<i>T. sp2</i>	2	ITI	Seco
USP – Ribeirão Preto (FFCLRP)	Laboratório de Biologia Comparada de Abelhas	<i>T. sp</i>	2	ITI	Seco
Universidade Federal do Mato Grosso (UFTM)	Laboratório de Ecologia de Comunidades	Sp1 - COT	3	COT	Seco
Universidade Federal do Mato Grosso (UFTM)	Laboratório de Ecologia de Comunidades	Sp2 - COT	2	COT	Seco
Universidade Federal do Mato Grosso (UFTM)	Laboratório de Ecologia de Comunidades	Sp3 - COT	2	COT	Seco
Universidade Federal do Mato Grosso (UFTM)	Laboratório de Ecologia de Comunidades	Sp4 - COT	2	COT	Seco
Universidade Federal do Mato Grosso (UFTM)	Laboratório de Ecologia de Comunidades	<i>T. xanthandrum</i>	2	COT	Seco

## 2.2 Obtenção do DNA, amplificação, sequenciamento e análise das sequências nucleotídicas

Os indivíduos coletados, assim como os cedidos tiveram o DNA extraído a partir de três pernas do lado direito do corpo ou do tórax utilizando os métodos Chelex 100 (WALSH; METZGER; HIGUCHI, 1991) ou fenol-clorofórmio-CETAB (FERNANDES-SALOMÃO et al., 2005).

Logo após a obtenção do extrato, as amostras eram amplificadas por PCR para as regiões dos genes nucleares *wingless* (*wg*) e *RNA Polimerase II* (*pol*) e dos genes mitocondriais citocromo c oxidase subunidade I (COI) e citocromo B (CytB) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 4.

**Tabela 4:** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e seus respectivos autores.

Região	Sequência de oligonucleotídeos	Autores
COI-Lep F1	5'- ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA TTG G - 3'	HEBERT et al., 2004
COI-Lep R1	5' - TAA ACT TCT GGA TGT CCA AAA AAT CA- 3'	
CytB – F	5' - TAA AGA GTC CAA TTA CTC CTC C – 3'	Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros
CytB – R	5' - GGA CAA ATA TCA TTT TGA GGA GC – 3'	
Wg – F	5' - TGC ACN GTG AAR ACY TGC TGG ATG CG - 3'	WARD; DOWNIE, 2005
Wg – R	5' - ACY TCG CAG CAC CAR TGG AA - 3'	ABOUHEIF; WRAY, 2002
Polfor2a – F	5' - AAY AAR CCV GTY ATG GGT ATT GTR CA - 3'	DANFORTH; FANG; SIPES, 2006
Polrev2a – R	5' - AGR TAN GAR TTC TCR ACG AAT CCT CT - 3'	

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25µL contendo tampão de reação *Invitrogen* 1x, 2,5mM de cloreto de magnésio, 250µM de cada dNTP, 1µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1U de Taq Polimerase *Platinum® Taq DNA Polymerase – Invitrogen* e eventualmente *GoTaq® DNA Polymerase – Promega*, 1 µL ou 2 µL da solução de DNA e água esterilizada. As PCRs foram submetidas a diferentes ciclos em termociclador de acordo com a temperatura de anelamento de cada par de oligonucleotídeo iniciador (Tabela 5). Posteriormente, os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com *Gel Red™* e a qualidade da amplificação foi revelada em luz ultravioleta com foto documentador BIO-RAD Gel Doc™ XR+.

**Tabela 5:** Informações dos ciclos aos quais foram submetidas as reações de PCR para cada gene estudado.

<i>wg</i>	Temperatura	Tempo	Ciclos	<i>pol</i>	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação	94°C	3'	1x	Desnaturação	95°C	15'	1x
Desnaturação	94°C	40"	} 40x	Desnaturação	95°C	40"	} 40x
Hibridação	54°C	1'		Hibridação	54°C	1'	
Elongação	72°C	1'20"		Elongação	72°C	1'30"	
Extensão	72°C	10		Extensão	72°C	10	
<b>CytB</b>	Temperatura	Tempo	Ciclos	<b>COI</b>	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação	94°C	3'	1x	Desnaturação	94°C	3'	1x
Desnaturação	94°C	30"	} 40x	Desnaturação	94°C	30"	} 40x
Hibridação	54°C	1'		Hibridação	48°C	1'	
Elongação	72°C	1'30"		Elongação	72°C	1'30"	
Extensão	72°C	10		Extensão	72°C	10	

Os fragmentos gerados na amplificação por PCR foram purificados utilizando 1U de SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, GE) e 10U de ExoI (Exonuclease I, GE) em 8 $\mu$ L de DNA amplificado totalizando o volume de 10 $\mu$ L, que foi submetido a um ciclo único de 60 minutos a 37°C, 15 minutos a 80°C e 5 minutos a 20°C em termociclador. Posteriormente, os fragmentos purificados foram sequenciados utilizando 2,5x do tampão *Save Money*, 1 $\mu$ L de BigDye v3.1 (*Applied Biosystems*), 1 picomol do oligonucleotídeo iniciador, 1 $\mu$ L da reação purificada e água esterilizada completando 10 $\mu$ L no volume final. O sequenciamento foi realizado em um sequenciador automático ABI 3700 (*Applied Biosystems*).

A análise das sequências obtidas foi realizada no programa *CodonCode* versão 3.7.1 (*CodonCode, Dedham, Massachusetts, United States*). O alinhamento e edição para retirada dos oligonucleotídeos iniciadores foi feito no programa *BioEdit* (HALL, 1999) utilizando a ferramenta CLUSTAL W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON et al., 1994). Para verificar as similaridades entre as sequências analisadas e aquelas depositadas no banco de dados do NCBI/GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi utilizado o *software* BLAST® (ALTSCHUL et al., 1990) disponível na mesma plataforma, e com isso foi possível confirmar que a região gênica estudada correspondia à região de interesse.

O número de haplótipos para cada espécie foi identificado e estimativas de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) nas e entre as espécies foram realizadas utilizando o programa DnaSP v7.1.2 (LIBRADO; ROZAS, 2009) e a diferença par a par entre as espécies foi elaborada no Mega7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Foi utilizada a metodologia TCS Network (CLEMENT et al., 2002) no programa PopArt v.1.7 para a confecção de redes de haplótipos com a finalidade de, juntamente com os índices de diversidade nucleotídica, separar as sequências em linhagens de acordo com a quantidade de substituições

nucleotídicas existente entre elas. Desta forma, quando era observado um número de substituições nucleotídicas maior do que o geralmente visto nas espécies com base no gene COI, essa sequência era considerada como pertencente a outro tipo genético.

### 2.3 Obtenção de sequências em bancos de dados

Foram realizadas buscas por sequências nucleotídicas de espécies do gênero *Trypoxylon* e de espécies proximalmente relacionadas nas plataformas NCBI/GenBank e BOLD Systems v4 (<http://www.boldsystems.org/>). As sequências encontradas foram analisadas seguindo o mesmo procedimento citado anteriormente, de maneira que apenas as que não apresentassem *indels* e *missing data* foram consideradas nas análises.

As sequências extraídas dos bancos de dados também foram submetidas à análise de diversidade haplotípica nas espécies utilizando o *software* DnaSP v7.1.2 (LIBRADO; ROZAS, 2009) para que na presença de sequências repetidas, apenas uma única sequência por haplótipo fosse utilizada nas análises filogenéticas.

### 2.4 Análises filogenéticas

A filogenia de *Trypoxylon* foi gerada a partir de cada gene separadamente e com as sequências concatenadas dos genes mitocondriais. Foram utilizados os modelos de Inferência Bayesiana (IB) e de Máxima Verossimilhança (em inglês, *Maximum Likelihood* - ML). Os melhores modelos evolutivos para as três partições dos dados foram estimados no programa Partition Finder v1.1.1 (LANFEAR et al., 2012) com base no *Alkaike Information Criterion* (AIC) sugerido por Posada & Buckley (2004). Quando os dados não foram particionados, a estimativa do melhor modelo evolutivo foi feita no programa jModelTest 2.1.10 (POSADA, 2008), baseando-se também no AIC (POSADA; BUCKLEY, 2004).

Para a análise por IB de todos os genes, foi utilizado o programa MrBayes 3.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001), sendo duas corridas independentes de 10 milhões de gerações e quatro cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC). Após a amostragem de mil árvores a cada mil gerações, considerou-se um *burn-in* de 25% e com isso, 2,5 mil árvores foram descartadas. A convergência das corridas foi estimada utilizando o programa Tracer v1.6 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>) e os resultados foram aceitos quando os valores de ESS (*Effective Sample Size*) foram >200. A árvore consenso para cada inferência foi visualizada e editada usando o programa FigTree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

A análise filogenética pelo método de ML foi realizada no RAxML (STAMATAKIS; HOOVER; ROUGEMONT, 2008) utilizando o *default* do programa que

consiste no modelo evolutivo GTRAC, modelo de heterogeneidade com sítios invariáveis e distribuição *gamma* para cada partição durante a corrida.

Ademais, foi elaborada outra análise de IB utilizando a plataforma CIPRES Science Gateway (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2010) para executar o programa BEAST 2.4.8 (BOUCKAERT et al., 2014) e assim estimar o tempo de divergência dos subgêneros considerando todo o conjunto de dados obtidos para o gene COI.

Para obter o tempo absoluto, foi utilizada a taxa de substituição de 1,9% por sítio por milhões de anos como padronizado por Machado e colaboradores (2001) para vespas do figo, o grupo mais proximamente relacionado a *Trypoxylon* no qual foi possível identificar a padronização de uma taxa de mutação. O modelo de substituição foi estimado no jModelTest 2.1.10 (POSADA, 2008), baseando-se no AIC (POSADA; BUCKLEY, 2004). Foram realizadas três corridas independentes com o conjunto de dados particionado e não particionado, seguindo os parâmetros *Birth Death Model* com relógio relaxado de 30 milhões de gerações. Ao final das três corridas para cada uma das metodologias (dados particionados e não particionados), foi utilizado o programa LogCombiner v2.4.8 para combinar os arquivos das estatísticas e das árvores geradas.

A convergência entre as corridas e o desempenho da análise foram checados utilizando o programa Tracer v1.6, e os resultados foram aceitos quando os valores de ESS foram >200. As árvores resultantes foram sumarizadas no TreeAnnotator v2.4.8 assumindo um *burn-in* de 25% e a árvore consenso das espécies com o tempo de divergência foi visualizada no programa FigTree v1.4.2.

## 2.5 Delimitação de espécies

As análises de identificação de espécimes e delimitação de espécies, a partir do marcador mitocondrial COI, foram realizadas utilizando duas metodologias diferentes: a análise por distância genética e a análise pelo modelo filogenético e coalescente.

A distância genética foi estimada utilizando o modelo evolutivo de Kimura-2-Parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980) por meio do pacote SPIDER (*SPecies IDentity and Evolution in R*; BROWN et al., 2012) dentro da plataforma R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). Essa análise possibilita que, a partir do conjunto de dados fornecido, seja calculado o valor máximo da distância genética intraespecífica e o valor mínimo interespecífico, gerando assim o valor de *Barcoding gap* que representa a lacuna que existe entre a distância genética de indivíduos de uma mesma espécie e a distância genética entre indivíduos de espécies diferentes (MEYER; PAULAY, 2005). A partir do *Barcoding gap* e

utilizando a função “localMinima” do pacote SPIDER, é estabelecido o valor de corte denominado de ótimo *threshold* (OT) que indica a transição entre os indivíduos pertencentes à mesma espécie e os indivíduos de espécies distintas (BROWN et al., 2012).

Após a obtenção desse valor, foi utilizado o programa jMOTU v1.0.9 (<http://www.nematodes.org/bioinformatics/jMOTU/>) para separar os indivíduos em unidades taxonômicas operacionais moleculares (MOTU). A MOTU é um termo amplamente utilizado na delimitação de espécies que consiste em agrupamentos de sequências que representam as entidades moleculares presentes no conjunto de dados (JONES; GHOORAH; BLAXTER, 2011), possibilitando que seja feita a caracterização de morfotipos que merecem uma atenção dos taxonomistas por, possivelmente, representarem uma espécie ainda não identificada (COLLINS; CRUICKSHANK, 2012).

Essa análise foi realizada com dois conjuntos de dados diferentes a fim de comparação, sendo o primeiro, todas as sequências de COI obtidas durante este trabalho, totalizando 333 sequências; já o segundo conjunto de dados utilizado foi composto de uma sequência por haplótipo, totalizando 102 sequências.

A delimitação de espécies realizada pelo modelo filogenético e coalescente foi feita por meio de duas metodologias diferentes utilizando apenas uma sequência por haplótipo (n = 102) com o intuito de evitar politomias geradas por sequência idênticas no conjunto de dados (FUJISAWA; BARRACLOUGH, 2013).

A primeira metodologia foi o bPTP (<https://species.h-its.org/>), em que se assume que o número de substituições nucleotídicas entre espécies é significativamente maior do que entre organismos de uma mesma espécie. Para a realização da análise, é utilizada uma árvore não ultramétrica em que o comprimento dos ramos significa o número médio de substituições nucleotídicas por sítio entre duas sequências, fazendo com que seja possível relacionar espécies novas a espécies conhecidas (ZHANG; MUSTER; LIANG, 2012). A árvore foi obtida utilizando o programa MrBayes 3.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001) conforme descrito anteriormente nas análises filogenéticas. Foram feitas duas corridas com e sem os grupos externos *Pison* sp. e *Nitela* sp. com 300 mil gerações MCMC.

A segunda metodologia utilizada foi o GMYC (*Generalized Mixed Coalescent Yule*) (PONS et al., 2006) que estima a transição entre os eventos de coalescência e os de especiação e extinção que representam, respectivamente, as relações intra e interespecíficas com base em uma árvore ultramétrica na qual o comprimento dos ramos significa a distância genética em relação ao tempo e que, neste trabalho, foi gerada no programa BEAST v2.4.8

(BOUCKAERT et al., 2014) na plataforma CIPRES Science Gateway (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2010) utilizando os mesmos parâmetros da análise de tempo de divergência descrita anteriormente. A análise do GMYC foi realizada na plataforma R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) utilizando o pacote SPLITS (*SPecies LImits by Threshold Statistics*; MONAGHAN et al., 2009) e o método de *threshold* único em que assume um único intervalo padrão para delimitar o ponto de transição entre os eventos de especiação/extinção e eventos de coalescência.

### 3 Resultados

#### 3.1 Amostragem e obtenção das sequências nucleotídicas

Após a coleta e triagem dos organismos a serem estudados, foi realizada a extração do DNA de 268 indivíduos que representavam 29 morfotipos, sendo 24 do subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) e cinco do subgênero *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) (Tabela 6). Além destes, também foi extraído o DNA de indivíduos da família Crabronidae com o intuito de utilizá-los como grupos irmãos nas análises filogenéticas, sendo eles três indivíduos do gênero *Pison* (Crabronidae: Trypoxilini) e três indivíduos do gênero *Nitela* (Crabronidae: Mischophini).

**Tabela 6:** Morfotipos do gênero *Trypoxylon* utilizados para extração de DNA obtidos em coletas ou por doação de grupos de pesquisa parceiros do LGEH. SCL (São Carlos-SP), ARR (Araras-SP), RIF (Rifaina-SP), ITI (Itirapina-SP), COM (Ilha Comprida-SP), CAN (Cananeia-SP), CAR (Ilha do Cardoso-SP), SJC (São José dos Campos-SP), LAV (Lavras-MG), VIC (Viçosa-MG), CFO (Campo Formoso-BA), ILH (Ilhéus-BA), SMA (São Mateus-ES), GUA (Guarapuava-PR), PRU (Prudentópolis-PR), ARA (Aracaju-SE) e COT (Cotriguaçu-MT).

<i>Trypargilum</i>			<i>Trypoxylon</i>		
Morfotipo	Localidade	N	Morfotipo	Localidade	N
<i>Trypoxylon albitarse</i>	SCL	37	Morfotipo B	CAN	2
<i>Trypoxylon albitarse</i>	LAV	14	Morfotipo C	CAR	2
<i>Trypoxylon albitarse</i>	VIC	17	Morfotipo C	COM	2
<i>Trypoxylon albitarse</i>	CFO	1	Morfotipo C	CAN	6
<i>Trypoxylon albitarse</i>	ILH	17	Morfotipo D	CAR	2
<i>Trypoxylon albitarse</i>	PRU	6	Morfotipo D	CAN	1
<i>Trypoxylon albitarse</i>	GUA	19	Morfotipo F	CAN	1
<i>Trypoxylon agamemnon</i>	GUA	11	<i>T. SP</i>	ITI	1
<i>Trypoxylon aurifrons</i>	SCL	5	<i>T. SP</i>	SCL	6
<i>Trypoxylon aurifrons</i>	ARR	4	<i>T. sp2</i>	ITI	2
<i>Trypoxylon aurifrons</i>	RIF	3	Sp2 - COT	COT	2
<i>Trypoxylon aurifrons</i>	SMA	2	Sp3 - COT	COT	2

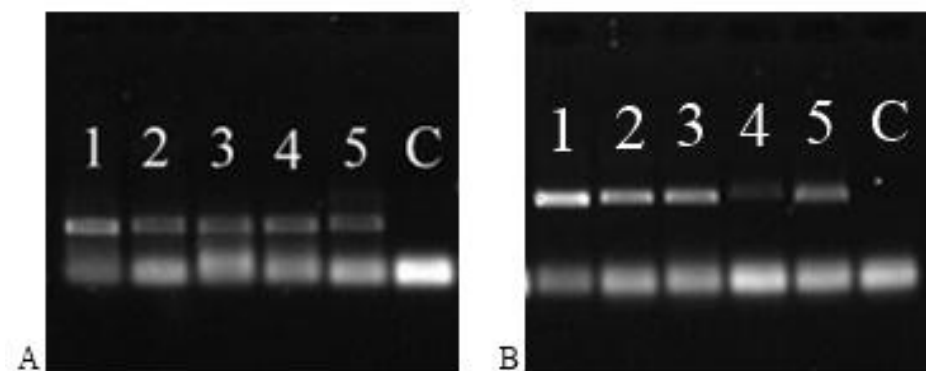
**Tabela 6:** Continuação

<i>Trypargilum</i>			<i>Trypargilum</i>		
Morfotipo	Localidade	N	Morfotipo	Localidade	N
<i>Trypoxylon lactitarse</i>	ARR	6	Sp4 - COT	COT	2
<i>Trypoxylon lactitarse</i>	CAR	1	<i>Trypoxylon xanthandrum</i>	COT	2
<i>Trypoxylon lactitarse</i>	ITI	2	Sp01 - ARA	ARA	3
<i>Trypoxylon lactitarse</i>	RIF	2	Sp02 - ARA	ARA	3
<i>Trypoxylon rogenhoferi</i>	RIF	5	Sp03 - ARA	ARA	2
<i>Trypoxylon rogenhoferi</i>	SCL	1	Sp04 - ARA	ARA	3
<i>Trypoxylon rogenhoferi</i>	ARR	2	<i>T. sp4</i>	SCL	2
<i>Trypoxylon rogenhoferi</i>	ITI	2	<i>T. sp5</i>	SJC	2
<i>Trypoxylon rogenhoferi</i>	VIC	1	<i>Trypoxylon</i>		
<i>Trypoxylon rogenhoferi</i>	GUA	2	Morfotipo	Localidade	N
<i>Trypoxylon nitidum</i>	RIF	3	<i>Trypoxylon asuncicola</i>	ARR	9
<i>Trypoxylon nitidum</i>	ARR	3	<i>Trypoxylon punctivertex</i>	SCL	4
<i>Trypoxylon opacum</i>	SCL	6	<i>Trypoxylon punctivertex</i>	ITI	2
<i>Trypoxylon opacum</i>	GUA	13	<i>Trypoxylon punctivertex</i>	COM	2
Morfotipo A	CAR	4	<i>Trypoxylon punctivertex</i>	CAN	2
Morfotipo A	COM	2	Morfotipo E	CAR	1
Morfotipo A	CAN	2	Morfotipo H	COM	2
Morfotipo B	CAR	2	Sp1 - COT	COT	3

### 3.2 Caracterização dos genes nucleares e análise filogenética

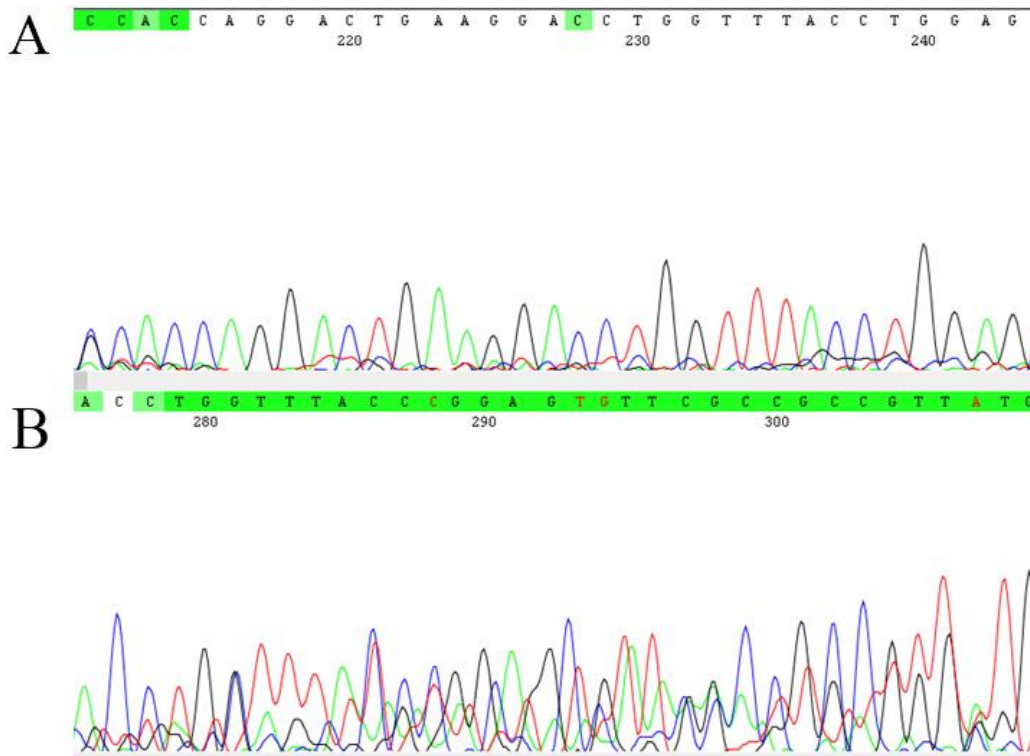
Foram feitos testes preliminares para os genes nucleares *wg* e *pol*. Apesar dos resultados das ampliações terem sido positivos com bandas fortes e bem delimitadas (Figura 7), os eletroferogramas resultantes da reação de sequenciamento da região *wg* não apresentaram boa qualidade para nove das 16 amostras testadas (Figura 8); assim, apesar da obtenção de sequências com 409 pb para cinco amostras, optamos pela exclusão deste gene das análises.

**Figura 7:** Géis de agarose dos genes *wg* e *pol*. Géis de agarose 1% com os amplicons da região *wg* (A) e *pol* (B). Os números de 1 a 5 indicam as amostras amplificadas e C indica o controle negativo.





**Figura 8:** Eletroferograma do gene *wg*. Eletroferograma obtido após sequenciamento da região nuclear *wg* de amostras do gênero *Trypoxylon*. A imagem A corresponde à fita *forward* e a imagem B à fita *reverse*.

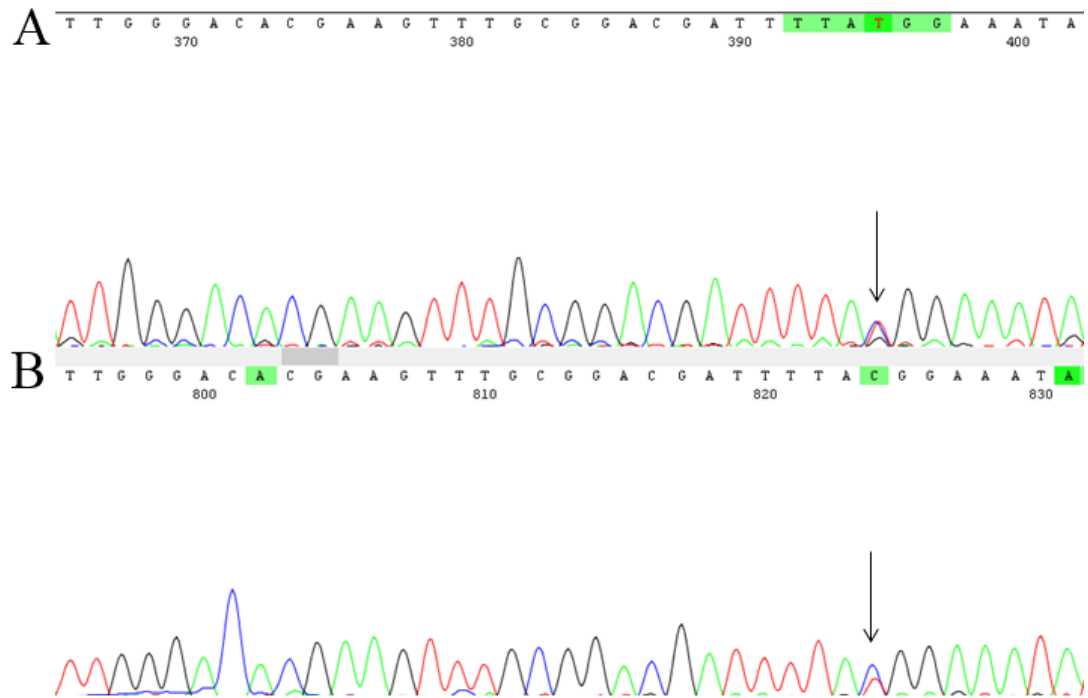


A região nuclear *pol* apresentou eletroferogramas de excelente qualidade possibilitando obtenção de sequências de 771 pb (Figura 9). Foi possível identificar regiões que continham picos duplos que foram consideradas nas análises como *missing data* (N), porém foi possível identificar qual base nucleotídica estava presente em cada região e comparar com as demais sequências analisadas (Tabela 7).

**Tabela 7:** Posição dos picos duplos em sequência do gene *pol*. Bases nucleotídicas, posição de ocorrência de pico duplo e bases nucleotídicas presentes nas demais sequências analisadas para o gene *pol* de amostras do gênero *Trypoxylon*.

Morfotipo	Haplótipo	Posição	Tipo de substituição	Bases nucleotídicas no mesmo sítio
<i>T. (Trypargilum) agamemnon</i>	AgaH1	105	C - G (S)	C, G e A
<i>T. (Trypargilum) lactitarse</i>	LacH1	119	A - G (R)	A
<i>T. (Trypargilum) Morotipo J</i>	"J"H1	171	C - T (Y)	C
<i>T. (Trypargilum) albitarse</i>	AlbH3	297	A - G (R)	A e G
<i>T. (Trypoxylon) punctivertex 1</i>	Pun1H2	384	C - T (Y)	C e T

**Figura 9:** Eletroferograma do gene *pol*. Eletroferograma obtido a partir da reação de sequenciamento da região *pol* de amostras do gênero *Trypoxylon*. A imagem A corresponde à fita *forward*, a imagem B corresponde à fita *reverse*. As setas indicam a presença de picos duplos nas duas fitas analisadas



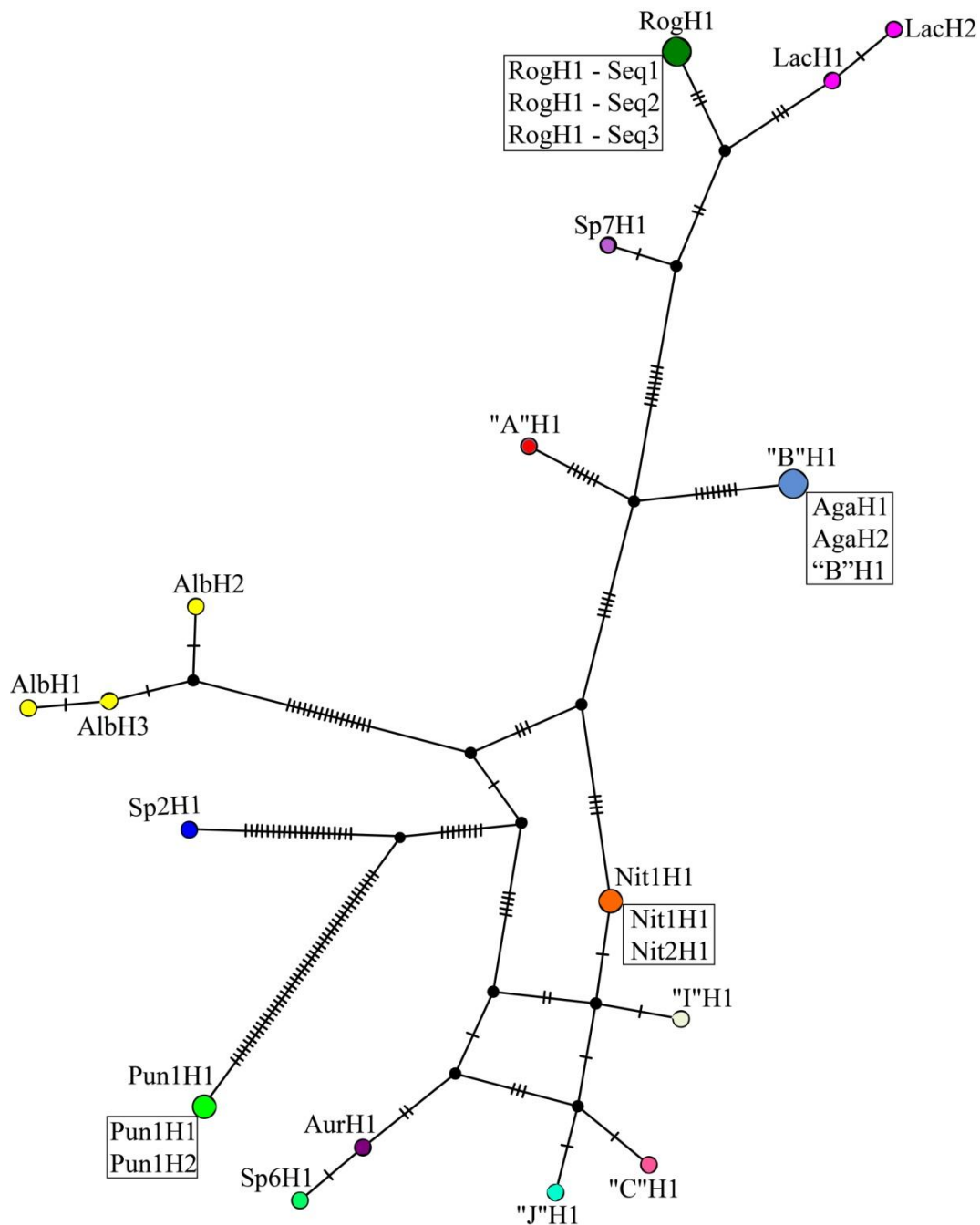
Foram analisadas para a região *pol* 23 sequências correspondentes a 15 morfotipos, sendo um do subgênero *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) e 14 do subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) (Tabela 8). No total, foram obtidos 19 haplótipos, sendo que haplótipos que diferiam entre si apenas pela presença de *missing data* foram agrupados na rede de haplótipos, como é possível ver na espécie *T. (Trypoxylon) punctivertex* H1 e H2. Ademais, morfotipos diferentes apresentaram o mesmo haplótipo, como visto para o *T. (Trypargilum)* Morfotipo B e *T. (Trypargilum) agamemnon* (Figura 10). Os valores de diversidade nucleotídica par-a-par entre e nos tipos genéticos estão apresentados no Apêndice A.

Ao efetuar a transcrição das sequências nucleotídicas em sequência de aminoácidos e comparar entre todos os espécimes sequenciados, não foi identificada qualquer alteração de aminoácidos entre elas. A composição média de G+C foi de 40,13% ( $\pm 0,73$ ), 124 sítios polimórficos 64 sítios parcimoniosamente informativos e 134 substituições nucleotídicas.

**Tabela 8:** Sequências analisadas para a região *pol* de amostras do gênero *Trypoxylon* e seus respectivos haplótipos. SCL (São Carlos-SP), RIF (Rifaina-SP), ITI (Itirapina-SP), COM (Ilha Comprida-SP), CAN (Cananeia-SP), CAR (Ilha do Cardoso-SP), LAV (Lavras-MG), VIC (Viçosa-MG), GUA (Guarapuava-PR) e ARA (Aracaju-SE).

Subgênero	Sequências	Localidade	Identificação dos haplótipos	Presença de <i>Missing Data</i>
<i>Trypargilum</i>	<i>T. sp7</i>	CAR	Sp7H1	Não
<i>Trypargilum</i>	<i>T. sp2</i>	ITI	Sp2H1	Não
<i>Trypargilum</i>	<i>T. sp6</i>	ARA	Sp6H1	Não
<i>Trypargilum</i>	Morfotipo A	CAR	“A” H1	Não
<i>Trypargilum</i>	Morfotipo B	CAR	“B” H1	Não
<i>Trypargilum</i>	Morfotipo C	CAN	“C” H1	Não
<i>Trypargilum</i>	Morfotipo I	ITI	“I” H1	Não
<i>Trypargilum</i>	Morfotipo J	CAR	“J” H1	Sim
<i>Trypargilum</i>	<i>T. agamemnon 1</i>	GUA	AgaH1	Sim
<i>Trypargilum</i>	<i>T. agamemnon 2</i>	GUA	AgaH2	Não
<i>Trypargilum</i>	<i>T. albitarse 1</i>	GUA	AlbH1	Não
<i>Trypargilum</i>	<i>T. albitarse 2</i>	LAV	AlbH2	Não
<i>Trypargilum</i>	<i>T. albitarse 3</i>	GUA	AlbH3	Sim
<i>Trypargilum</i>	<i>T. aurifrons</i>	SCL	AurH1	Não
<i>Trypargilum</i>	<i>T. lactitarse 1</i>	ITI	LacH1	Sim
<i>Trypargilum</i>	<i>T. lactitarse 2</i>	ITI	LacH2	Não
<i>Trypargilum</i>	<i>T. nitidum 1</i>	RIF	NitH1	Não
<i>Trypargilum</i>	<i>T. nitidum 2</i>	RIF	NitH1	Não
<i>Trypargilum</i>	<i>T. rogenhoferi 1</i>	RIF	RogH1	Não
<i>Trypargilum</i>	<i>T. rogenhoferi 2</i>	ITI	RogH1	Não
<i>Trypargilum</i>	<i>T. rogenhoferi 3</i>	VIC	RogH1	Não
<i>Trypoxylon</i>	<i>T. punctivertex 1</i>	COM	Pun1H1	Não
<i>Trypoxylon</i>	<i>T. punctivertex 2</i>	ITI	Pun1H2	Sim

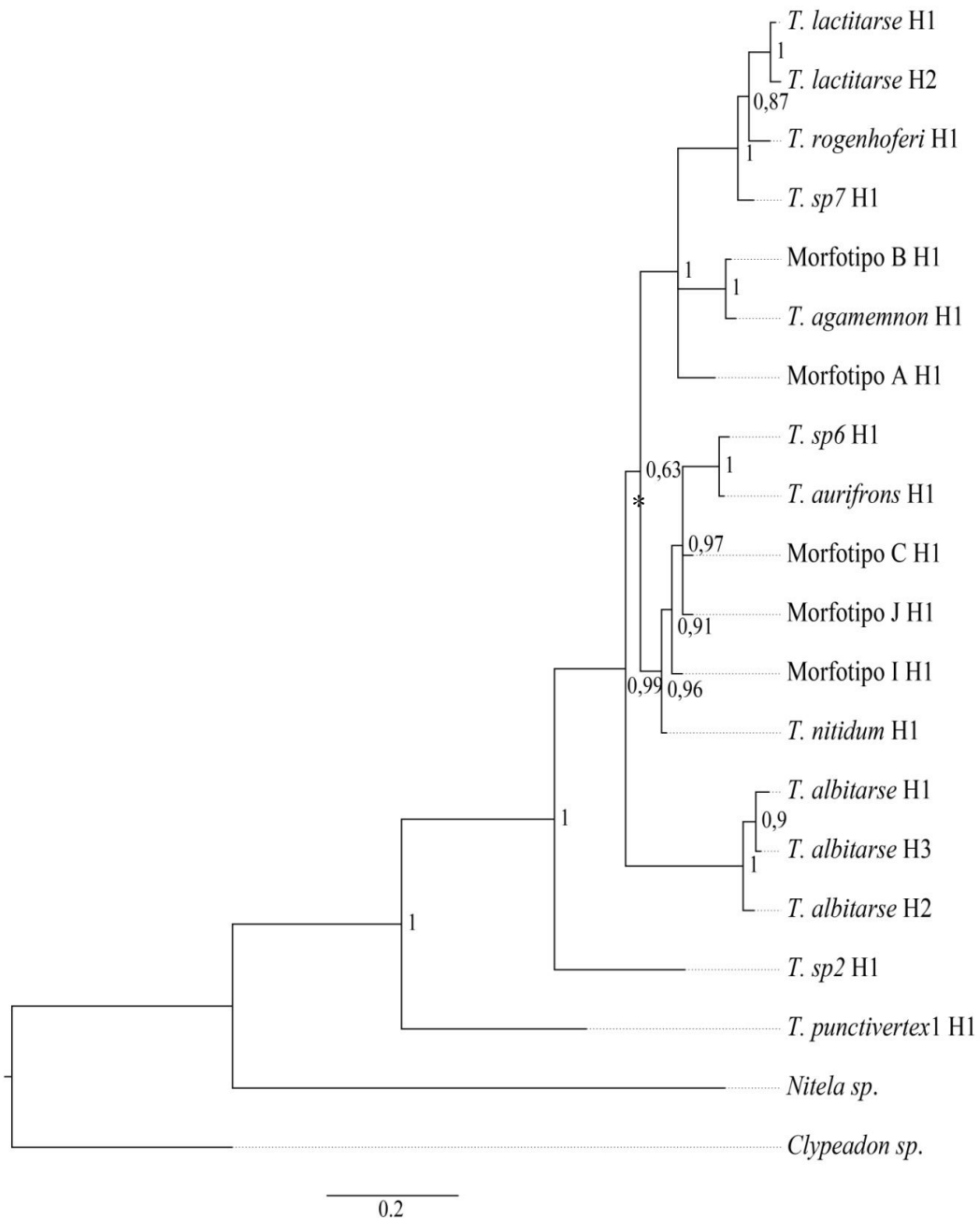
**Figura 10:** Rede de haplótipos do gene *pol*. Rede de haplótipos produzida com sequências da região nuclear *pol* de amostras do gênero *Trypoxylon*. As caixas abaixo dos círculos mostram as amostras que foram agrupadas por apresentarem *missing data* ou o mesmo haplótipo. Os nomes dos haplótipos estão indicados na Tabela 8. As cores estão presentes para facilitar a identificação de haplótipos do mesmo tipo genético.



A árvore filogenética para o gene *pol* por IB foi gerada utilizando os modelos evolutivos TIM+I (nst=6) (POSADA, 2003), F81 (nst=1) (FELSENSTEIN, 1981) e TrN+G (nst=6) (TAMURA; NEI, 1993) para cada uma das partições, respectivamente. A topologia final apresentou altos valores de probabilidade *a posteriori*, indicando que os *priors* utilizados na análise foram eficientes para gerar uma árvore com alta sustentação dos ramos

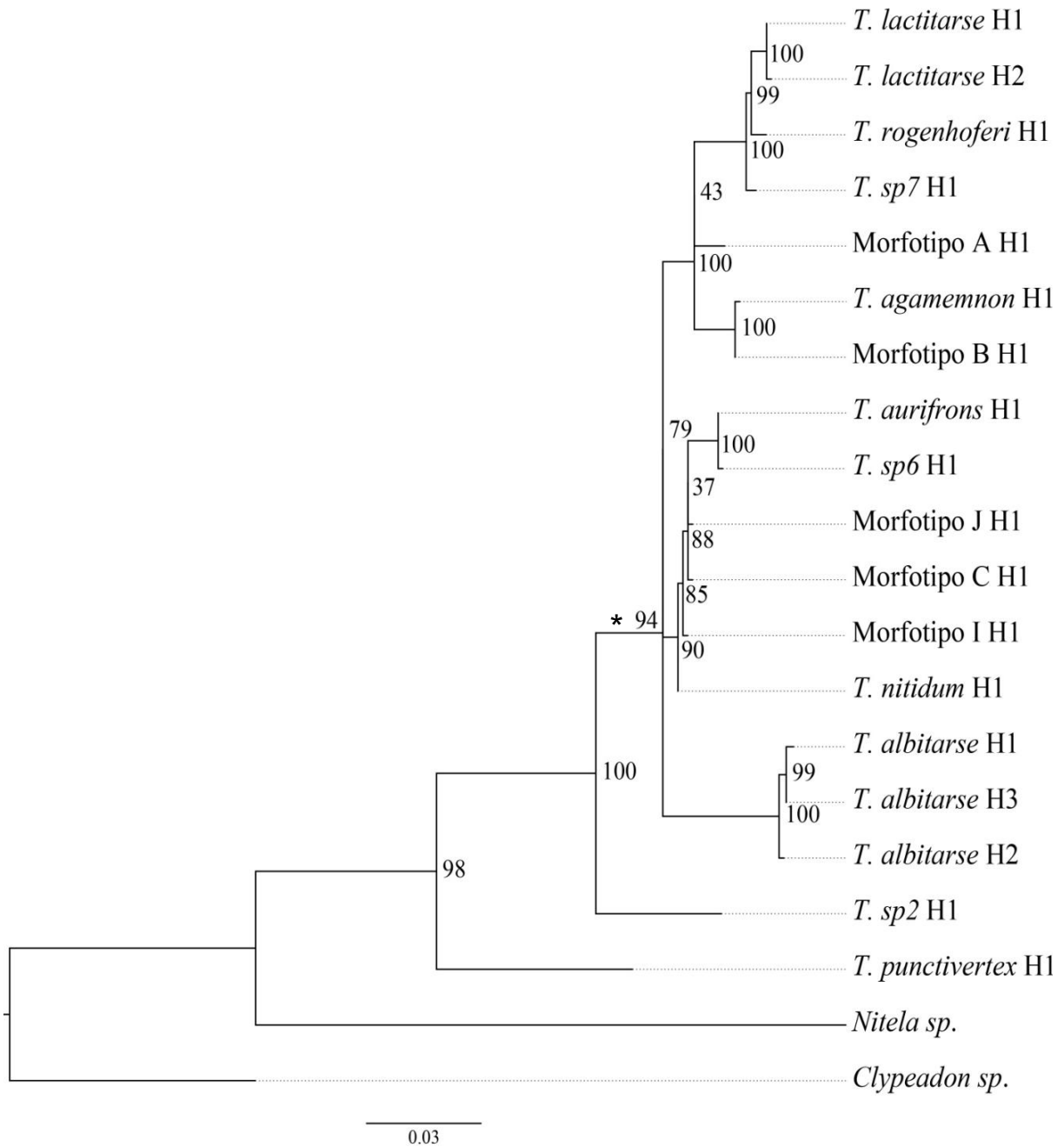
(Figura 11). Os grupos irmãos utilizados foram uma espécie do gênero *Nitela* (Crabroninae: Miscophini) e uma sequência da espécie *Clypeadon haigi* (Philanthinae: Aphilanthopini) (AY945104.1) retirada do GenBank/NCBI e cuja sequência foi obtida utilizando o mesmo par de oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho. Não foi possível obter *amplicons* de boa qualidade para os indivíduos do gênero *Pison* e, por esse motivo, eles não foram utilizados como grupo irmão nas análises de *pol*.

**Figura 11:** Árvore filogenética da região *pol* de espécimes do gênero *Trypoxylon* produzida pela metodologia de IB. Os valores de densidade *a posteriori* estão indicados em cada nó da árvore. O Asterisco indica um ramo com baixo valor de densidade *a posteriori*.



A árvore filogenética feita pela metodologia de ML está apresentada na Figura 12. Os valores de *bootstrap* foram altos em todos os ramos e os grupos irmãos utilizados foram os mesmos da análise por IB.

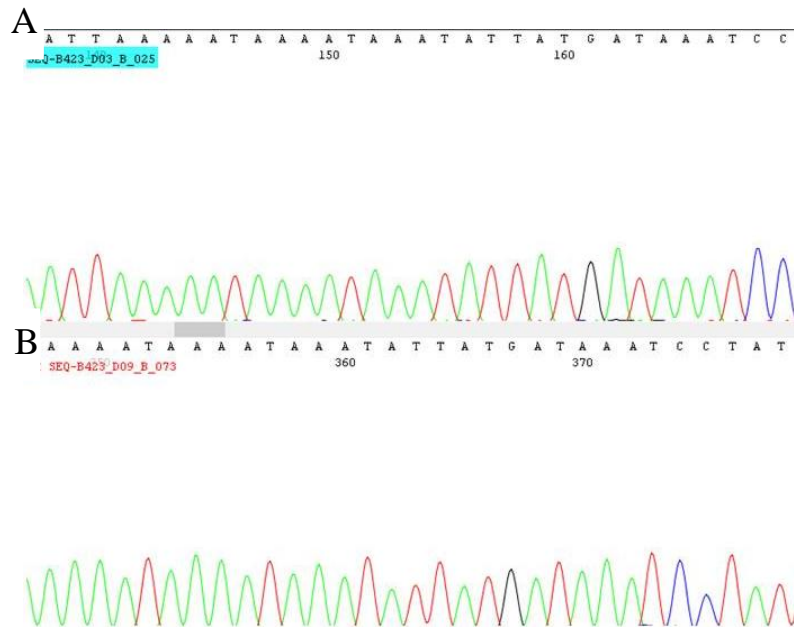
**Figura 12:** Árvore filogenética de espécimes do gênero *Trypoxylon* gerada a partir das sequências do gene *pol* pela metodologia de ML. Os valores de *bootstrap* estão indicados em cada ramo da topologia. O Asterisco indica um ramo com politomia.



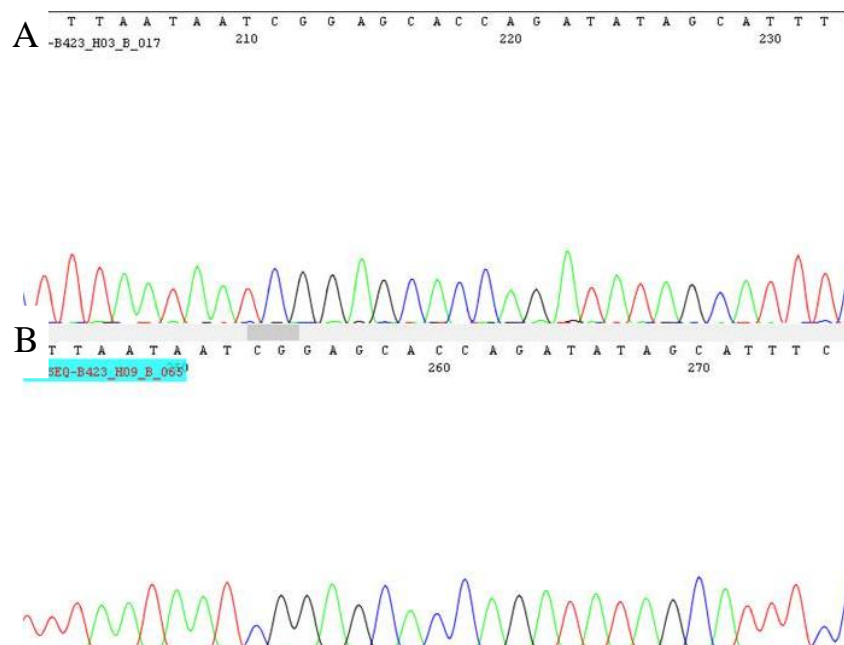
### 3.3 Caracterização dos genes mitocondriais e análises filogenéticas

O sequenciamento das regiões mitocondriais CytB e COI geraram eletroferogramas com excelente qualidade (Figuras 13 e 14), possibilitando a análise de fragmentos com 436 pb e 658 pb, respectivamente.

**Figura 13:** Eletroferograma da região CytB. Eletroferograma obtido após sequenciamento da região mitocondrial CytB de amostras do gênero *Trypoxylon*. A imagem A corresponde à fita *forward* e a imagem B à fita *reverse*.



**Figura 14:** Eletroferograma da região COI. Eletroferograma obtido após sequenciamento da região mitocondrial COI de amostras do gênero *Trypoxylon*. A imagem A corresponde à fita *forward* e a imagem B à fita *reverse*.



Foram obtidas 169 sequências para o gene CytB com 237 sítios polimórficos, 201 sítios parcimoniosamente informativos, 364 substituições nucleotídicas e 38 haplótipos correspondentes a 23 morfotipos, sendo 19 do subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) e quatro do subgênero *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) (Tabela 9). Após a análise de diversidade nucleotídica entre as espécies (Apêndice B) e a elaboração da rede de haplótipos (Figura 15), foi possível identificar 28 tipos genéticos, sendo 23 do subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) e cinco do subgênero *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) (Tabela 9).

Todos os indivíduos do *T. (Trypargilum)* Morfotipo I analisados apresentaram picos duplos nas posições 21 e 413 das sequências de CytB. Em todas as sequências, o pico duplo correspondia a duas pirimidinas (C-T) na primeira posição e a duas purinas na segunda posição (A-G). Nos outros indivíduos analisados, esses sítios correspondiam a uma citosina e a uma guanina, respectivamente, com exceção do tipo genético *T. (Trypargilum)* sp4 que apresentou uma adenina na posição 413.

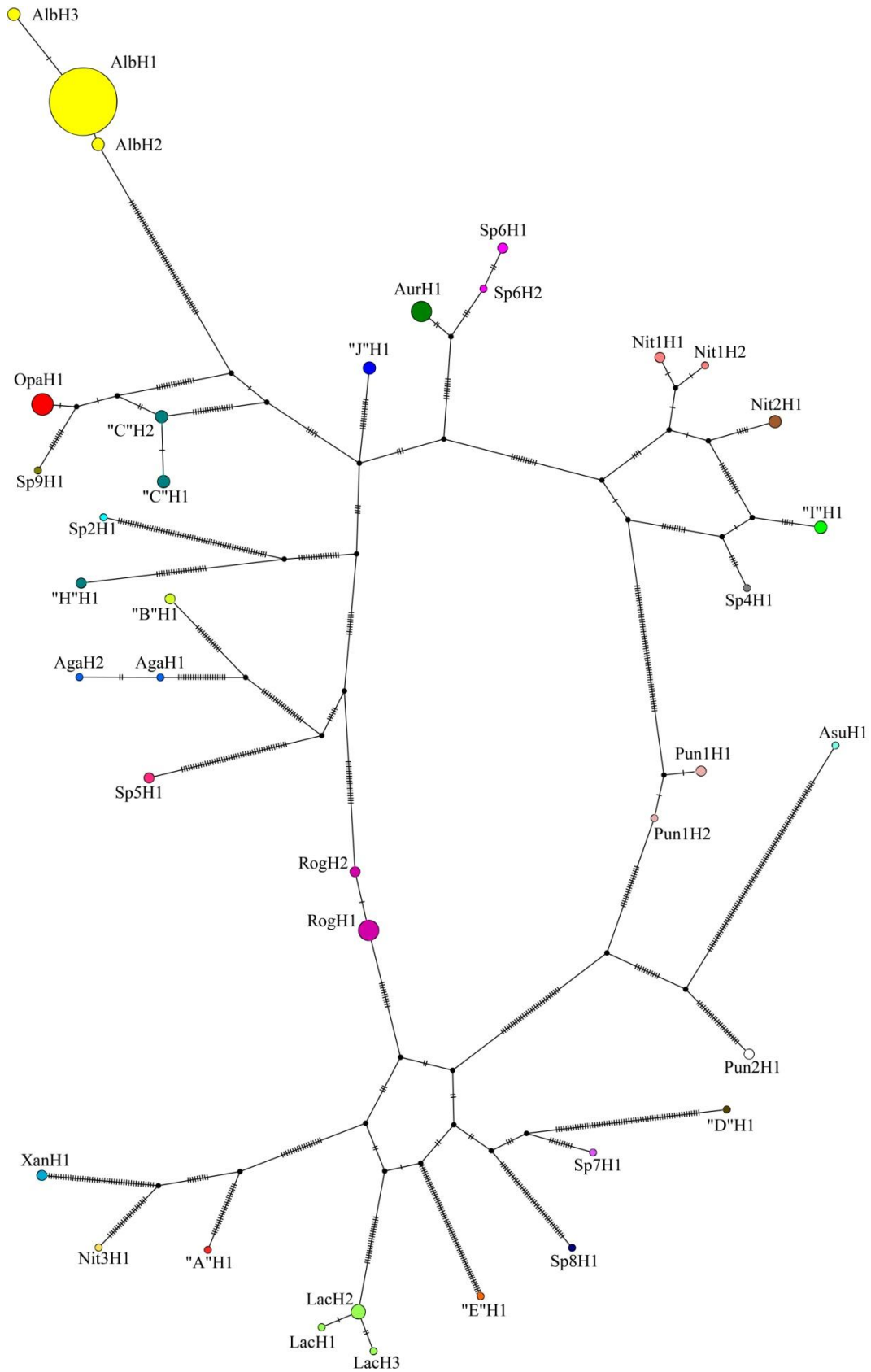
Devido à presença dos picos duplos nas sequências do *T. (Trypargilum)* Morfotipo I e por se tratar da análise de um gene mitocondrial de origem uniparental (portanto, haploide), não era esperado que houvesse picos duplos nas sequências; por esse motivo, optamos por excluir o *T. (Trypargilum)* Morfotipo I das análises filogenéticas. Com isso, foram analisados 27 tipos genéticos, sendo 22 do subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) e cinco do subgênero *Trypoxylon* (*Trypoxylon*). Foi utilizado como grupo irmão apenas uma espécie do gênero *Pison* (Crabroninae: Trypoxilini), pois não foi possível amplificar a região CytB dos indivíduos do gênero *Nitela* com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados, além de não haver sequências de espécies mais proximamente relacionadas no GenBank/NCBI para essa região.



**Tabela 9:** Identificação das amostras de gênero *Trypoxylon* analisadas com o gene CytB detalhando os morfotipos estudados e os tipos genéticos encontrados após a análise dos dados. SCL (São Carlos-SP), ARR (Araras-SP), RIF (Rifaina-SP), ITI (Itirapina-SP), COM (Ilha Comprida-SP), CAN (Cananeia-SP), CAR (Ilha do Cardoso-SP), SJC (São José dos Campos-SP), LAV (Lavras-MG), VIC (Viçosa-MG), CFO (Campo Formoso-BA), ILH (Ilhéus-BA), SMA (São Mateus-ES), GUA (Guarapuava-PR), PRU (Prudentópolis-PR), ARA (Aracaju-SE) e COT (Cotriguaçu-MT).

Subgênero	Morfotipos	N	Localidades	Tipos genéticos	
<i>Trypargilum</i>	Sp3 – COT	1	COT	<i>T. lactitarse</i> (LacH3)	
<i>Trypargilum</i>	<i>T. xanthandrum</i>	2	COT	<i>T.xan</i> (XanH1)	
<i>Trypargilum</i>	Sp02 - ARA	1	ARA	<i>T. nitidum</i> 1 (Nit1H2)	
<i>Trypargilum</i>	Sp04 - ARA	2	ARA	<i>T.sp6</i> (Sp6H1)	
<i>Trypargilum</i>	<i>T.sp2</i>	1	ITI	<i>T.sp2</i> (Sp2H1)	
<i>Trypargilum</i>	<i>T.sp4</i>	1	SCL	<i>T.sp4</i> (Sp4H1)	
<i>Trypargilum</i>	<i>T.sp5</i>	2	SJC	<i>T.sp5</i> (Sp5H1)	
<i>Trypargilum</i>	Morfotipo A	1	CAR	Morfotipo A (“A”H1)	
<i>Trypargilum</i>	Morfotipo B	2	CAR	Morfotipo B (“B”H1)	
<i>Trypargilum</i>	Morfotipo C	9	CAN, CAR, COM	Morfotipo C (“C”H1 e H2)	Morfotipo J (“J”H1)
<i>Trypargilum</i>	Morfotipo D	1	CAR	Morfotipo D (“D”H1)	
<i>Trypoxylon</i>	Morfotipo E	1	CAR	Morfotipo E (“E”H1)	
<i>Trypoxylon</i>	Morfotipo H	2	COM	Morfotipo H (“H”H1)	
<i>Trypargilum</i>	Morfotipo I	3	RIF, ITI	Morfotipo I (“I”H1)	
<i>Trypoxylon</i>	<i>T. asuncicola</i>	1	ARR	<i>T. asuncicola</i> (AsuH1)	
<i>Trypargilum</i>	<i>T. agamemnon</i>	3	GUA	<i>T. agamemnon</i> (AgaH1 e H2)	<i>T.sp8</i> (Sp8H1)
<i>Trypargilum</i>	<i>T. aurifrons</i>	9	ARR, SCL, RIF	<i>T. aurifrons</i> (AurH1)	
<i>Trypargilum</i>	<i>T. rogenhoferi</i>	11	GUA, ARR, SCL, VIC, ITI	<i>T. rogenhoferi</i> (RogH1e H2)	<i>T.sp6</i> (Sp6H2)
<i>Trypargilum</i>	<i>T. opacum</i>	9	SCL, GUA	<i>T. opacum</i> (OpaH1)	<i>T.sp9</i> (Sp9H1)
<i>Trypargilum</i>	<i>T. albitarse</i>	90	ILH, LAV, VIC, SCL, GUA, PRU	<i>T. albitarse</i> (AlbH1, H2 e H3)	
<i>Trypargilum</i>	<i>T. lactitarse</i>	6	ARR, ITI	<i>T. lactitarse</i> (LacH1 e H2)	<i>T.sp7</i> (Sp7H1)
<i>Trypoxylon</i>	<i>T. punctivertex</i>	5	COM, ITI, SCL	<i>T. punctivertex</i> 1 (Pun1H1 e H2)	<i>T. punctivertex</i> 2 (Pun2H1)
<i>Trypargilum</i>	<i>T. nitidum</i>	6	ARR, RIF, SCL	<i>T. nitidum</i> 1 (Nit1H1)	<i>T. nitidum</i> 2 (Nit2H1) <i>T. nitidum</i> 3 (Nit3H1)

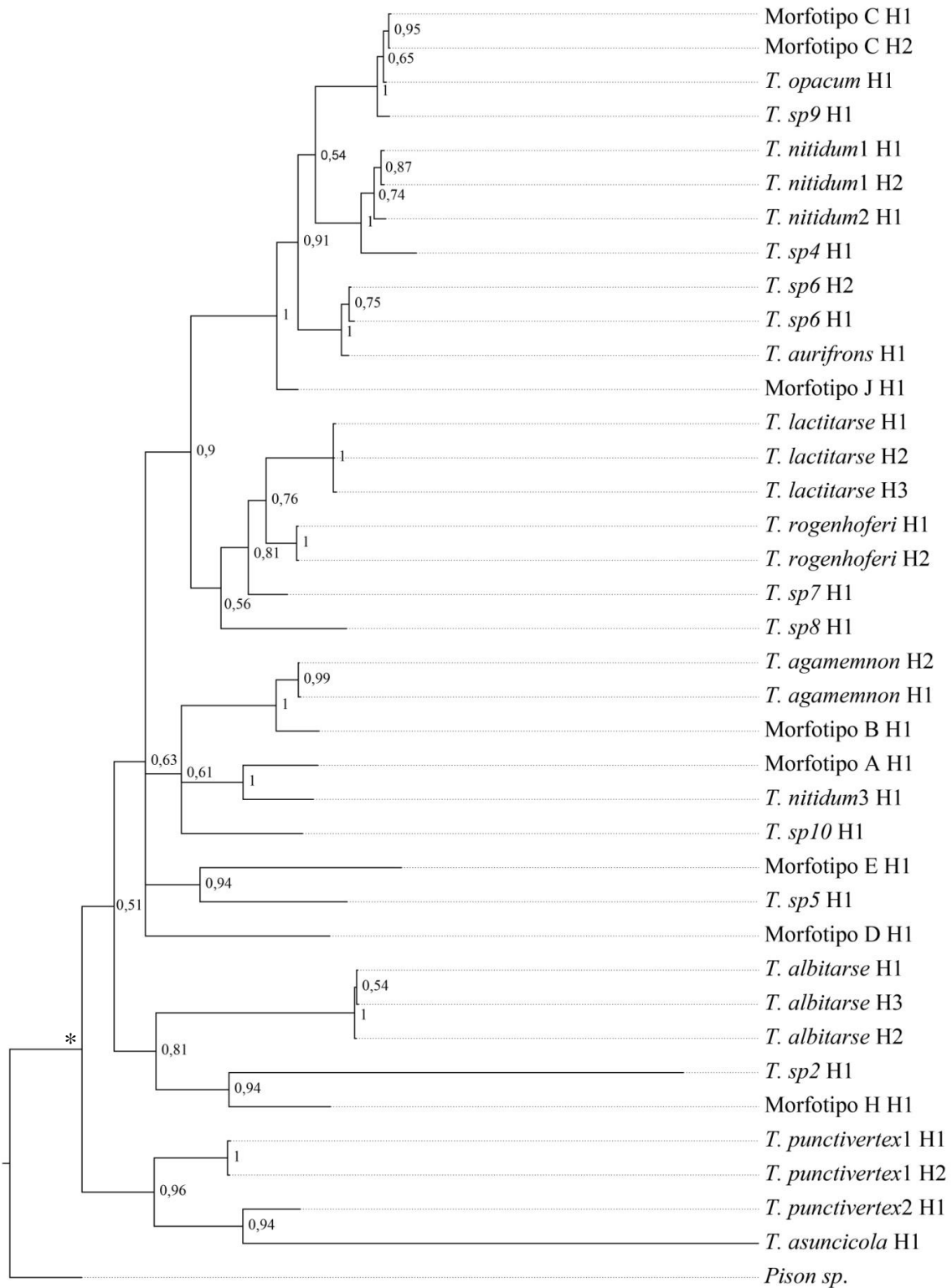
**Figura 15:** Rede de haplótipos do gene CytB. Rede de haplótipos gerada a partir das sequências da região mitocondrial CytB de amostras do gênero *Trypoxylon*. Os nomes dos haplótipos estão indicados na Tabela 9. As cores estão presentes para facilitar a identificação de haplótipos do mesmo tipo genético.



A árvore filogenética do gene CytB pelo método de IB foi gerada de forma particionada utilizando os modelos evolutivos TrN+G (nst=6) (TAMURA; NEI, 1993) para a primeira partição, TVM+G (nst=6) (POSADA, 2003) para a segunda partição e GTR+I+G (nst=6) (LANAVE et al., 1984; TAVARÉ, 1986; RODRÍGUEZ et al., 1990) para a terceira partição. A árvore não particionada foi gerada com o modelo evolutivo GTR+I+G (nst=6) (LANAVE et al., 1984; TAVARÉ, 1986; RODRÍGUEZ et al., 1990) (Apêndice C). Os valores de probabilidade *a posteriori* foram baixos em alguns ramos (abaixo de 0,90); porém, outros apresentaram valores de suporte significativamente aceitáveis (acima de 0,90) (Figura 16).

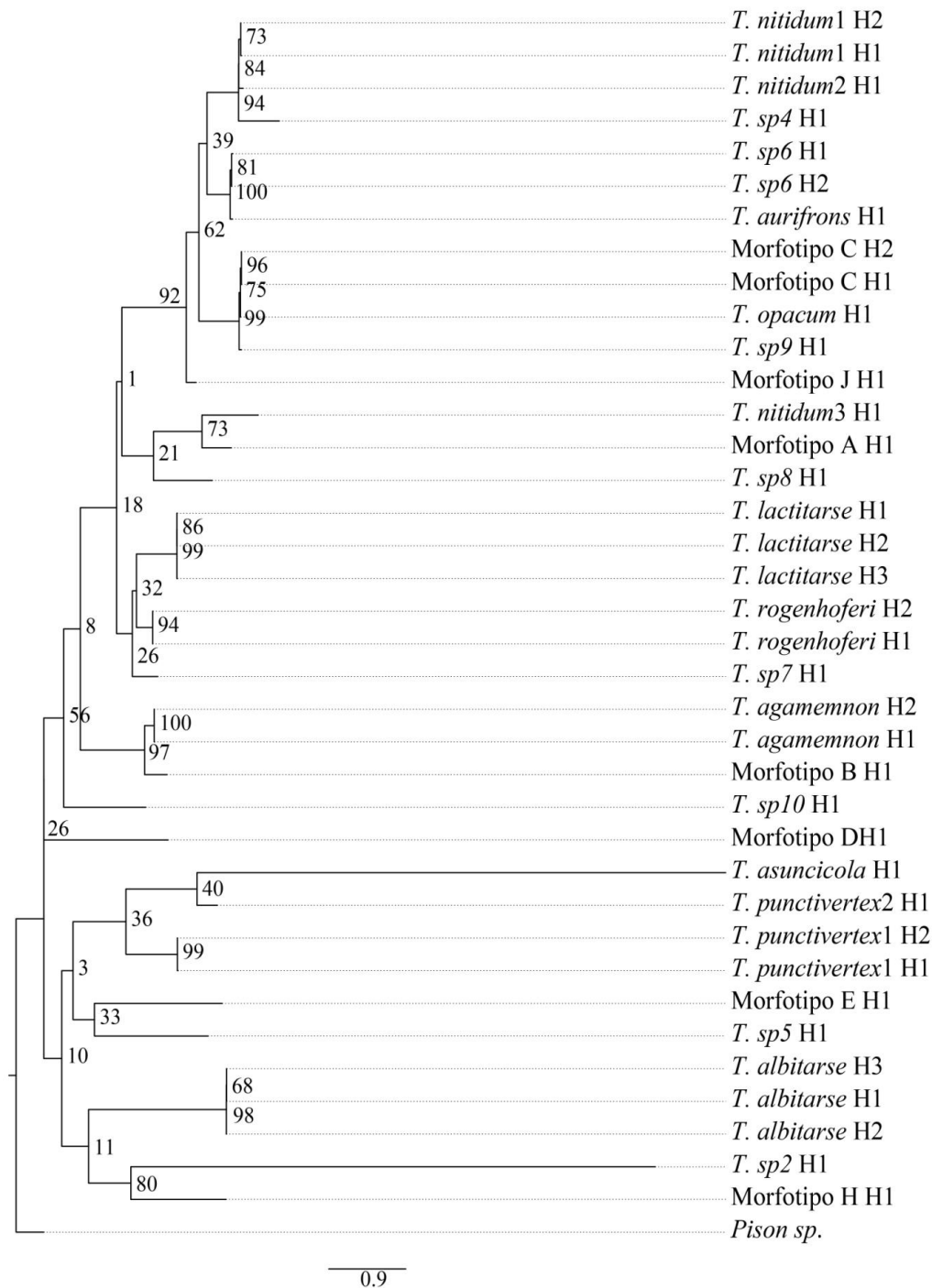
A árvore filogenética obtida por ML utilizou o mesmo grupo irmão da análise por IB e foi realizada com as sequências particionadas (Figura 17) e não particionadas (Apêndice D). Os valores de *bootstrap* foram menores do que os valores aceitos como significativos (acima de 85), gerando uma árvore com baixa sustentação dos ramos e de topologia diferente da árvore produzida pelo método de IB.

**Figura 16:** Árvore filogenética da região mitocondrial CytB de espécimes do gênero *Trypoxylon* elaborada com dados particionados utilizando o método de IB. O asterisco indica a divisão entre os subgêneros *Trypoxylon* (*Trypargilum*) e *Trypoxylon* (*Trypoxylon*).



0.2

**Figura 17:** Árvore filogenética da região mitocondrial CytB de espécimes do gênero *Trypoxylon* elaborada com dados particionados utilizando o método de ML.



Para o gene mitocondrial COI foram obtidas 173 sequências com 283 sítios polimórficos, 259 sítios parcimoniosamente informativos e 456 substituições nucleotídicas correspondentes a 25 morfotipos, sendo 21 do subgênero *Trypargilum* e 4 do subgênero *Trypoxylon* (Tabela 10). Após a elaboração da rede de haplótipos (Figura 18) e da estimativa da diversidade nucleotídica dentro e entre espécies (Apêndice E), foram caracterizados 42

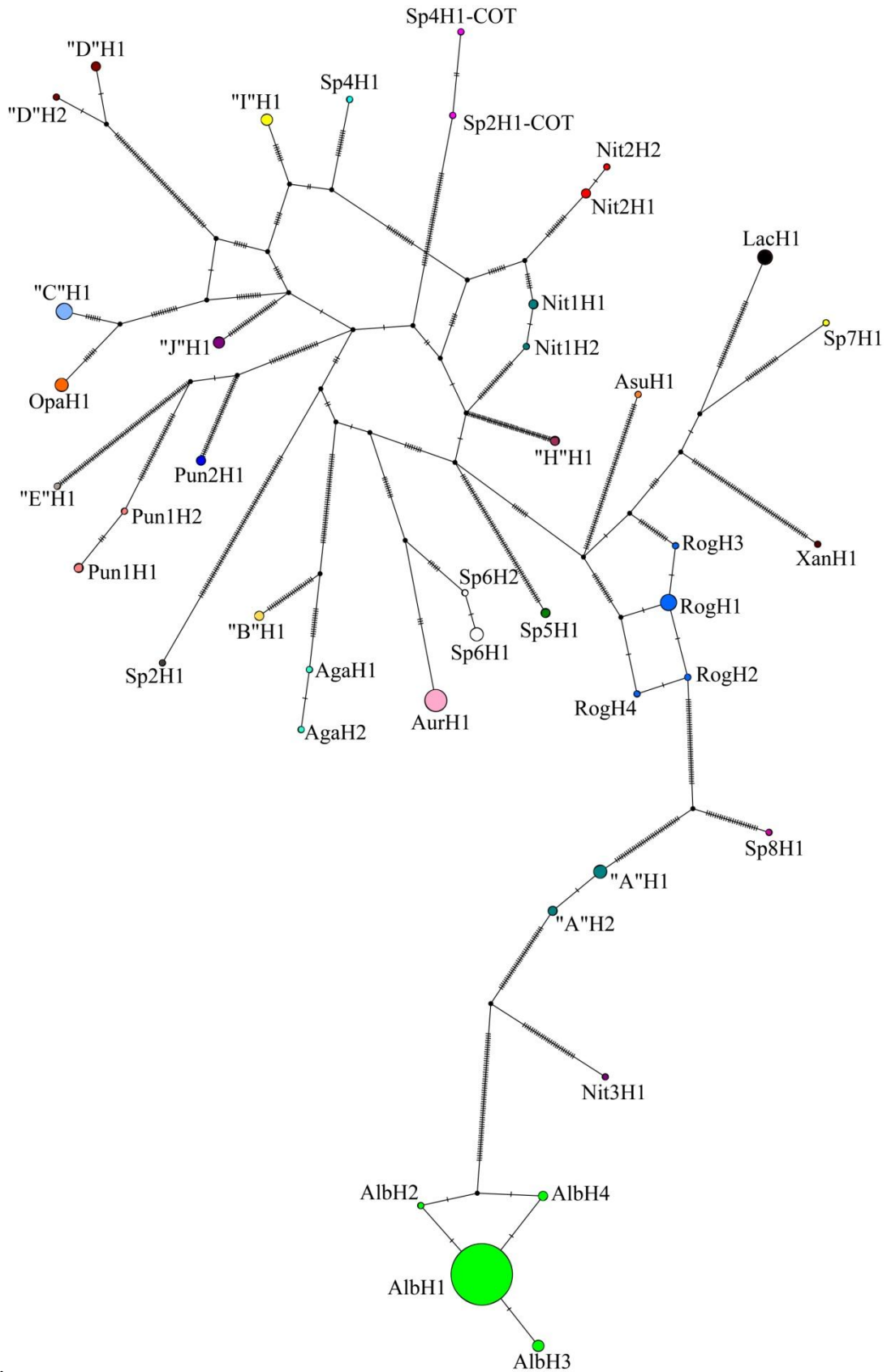
haplótipos correspondentes a 29 tipos genéticos, sendo 25 do subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) e 4 do subgênero *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) (Tabela 10). Os morfotipos *T. (Trypargilum)* Sp2-COT, *T. (Trypargilum)* Sp4-COT e *T. (Trypargilum) xanthandrum* apresentaram eletroferogramas de baixa qualidade para todos os indivíduos analisados, não sendo possível a obtenção de sequências de boa qualidade, mas sequências com picos sobrepostos, identificados como *missing data* (N) e com *gaps* no final das mesmas. Por esse motivo, esses morfotipos foram excluídos da análise filogenética, permanecendo 26 tipos genéticos para serem analisados.

**Tabela 10:** Identificação das amostras do gênero *Trypoxylon* analisadas para o gene COI, detalhando os morfotipos estudados e os tipos genéticos encontrados após a análise dos dados. N indica o número de sequências analisadas. SCL (São Carlos-SP), ARR (Araras-SP), RIF (Rifaina-SP), ITI (Itirapina-SP), COM (Ilha Comprida-SP), CAN (Cananeia-SP), CAR (Ilha do Cardoso-SP), SJC (São José dos Campos-SP), LAV (Lavras-MG), VIC (Viçosa-MG), CFO (Campo Formoso-BA), ILH (Ilhéus-BA), SMA (São Mateus-ES), GUA (Guarapuava-PR), PRU (Prudentópolis-PR), ARA (Aracaju-SE) e COT (Cotriguaçu-MT).

Subgênero	Morfotipos	N	Gaps/Missing data	Localidades	Tipos genéticos		
<i>Trypargilum</i>	Sp02	1	Não	ARA	<i>T. nitidum1</i> (Nit1H2)		
<i>Trypargilum</i>	Sp04	2	Não	ARA	<i>T. sp6</i> (Sp6H1)		
<i>Trypargilum</i>	Sp2 - COT	1	Sim	COT	Sp2 (Sp2H1-COT)		
<i>Trypargilum</i>	Sp4 - COT	1	Sim	COT	Sp4 (Sp4H1-COT)		
<i>Trypargilum</i>	<i>T. xanthandrum</i>	1	Sim	COT	Xan (XanH1)		
<i>Trypargilum</i>	<i>T. sp2</i>	1	Não	ITI	<i>T. sp2</i> (Sp2H1)		
<i>Trypargilum</i>	<i>T. sp4</i>	1	Não	SCL	<i>T. sp4</i> (Sp4H1)		
<i>Trypargilum</i>	<i>T. sp5</i>	2	Sim*	SJC	<i>T. sp5</i> (Sp5H1)		
<i>Trypargilum</i>	Morfotipo A	6	Sim*	CAN, CAR, COM	Morfotipo A (“A”H1 e H2)		
<i>Trypargilum</i>	Morfotipo B	2	Não	CAR	Morfotipo B (“B”H1)		
<i>Trypargilum</i>	Morfotipo C	9	Sim*	CAN, CAR, COM	Morfotipo C (“C”H1)	Morfotipo J (“J”H1)	
<i>Trypargilum</i>	Morfotipo D	3	Não	CAR	Morfotipo D (“D”H1 e H2)		
<i>Trypoxylon</i>	Morfotipo E	1	Não	CAR	Morfotipo E (“E”H1)		
<i>Trypargilum</i>	Morfotipo F	1	Não	CAN	Morfotipo D (“D”H1)		
<i>Trypoxylon</i>	Morfotipo H	2	Não	COM	Morfotipo H (“H”H1)		
<i>Trypargilum</i>	Morfotipo I	3	Não	ITI, RIF	Morfotipo I (“I”H1)		
<i>Trypargilum</i>	<i>T. aurifrons</i>	11	Não	RIF, ARR, SCL, SMA	<i>T. aurifrons</i> (AurH1)		
<i>Trypargilum</i>	<i>T. agamemnon</i>	3	Não	GUA	<i>T. agamemnon</i> (AgaH1 e H2)	<i>T. sp8</i> (Sp8H1)	
<i>Trypargilum</i>	<i>T. albitarse</i>	89	Não	SCL, LAV, VIC, ILH, GUA, PRU, CFO	<i>T. albitarse</i> (AlbH1, H2, H3 e H4)		
<i>Trypargilum</i>	<i>T. lactitarse</i>	6	Não	ITI, ARR, CAR	<i>T. lactitarse</i> (LacH1)	<i>T. sp7</i> (Sp7H1)	
<i>Trypargilum</i>	<i>T. nitidum</i>	6	Não	RIF, ARR	<i>T. nitidum1</i> (Nit1H1)	<i>T. nitidum2</i> (Nit2H1 e H2)	<i>T. nitidum3</i> (Nit3H1)
<i>Trypargilum</i>	<i>T. opacum</i>	4	Não	SCL	<i>T. opacum</i> (OpaH1)		
<i>Trypargilum</i>	<i>T. rogenhoferi</i>	11	Não	SCL, ITI, RIF, ARR, SJJ, SMA	<i>T. rogenhoferi</i> (RogH1, H2, H3 e H4)	<i>T. sp6</i> (Sp6H1)	<i>T. sp6</i> (Sp6H2)
<i>Trypoxylon</i>	<i>T. punctivertex</i>	5	Sim*	COM, SCL, ITI	<i>T. punctivertex1</i> (Pun1H1 e H2)	<i>T. punctivertex2</i> (Pun2H1)	
<i>Trypoxylon</i>	<i>T. asuncicola</i>	1	Não	ARR	<i>T. asuncicola</i> (AsuH1)		

\* Não foram todos os indivíduos analisados que apresentavam *missing data* e por esse motivo foram mantidos nas análises.

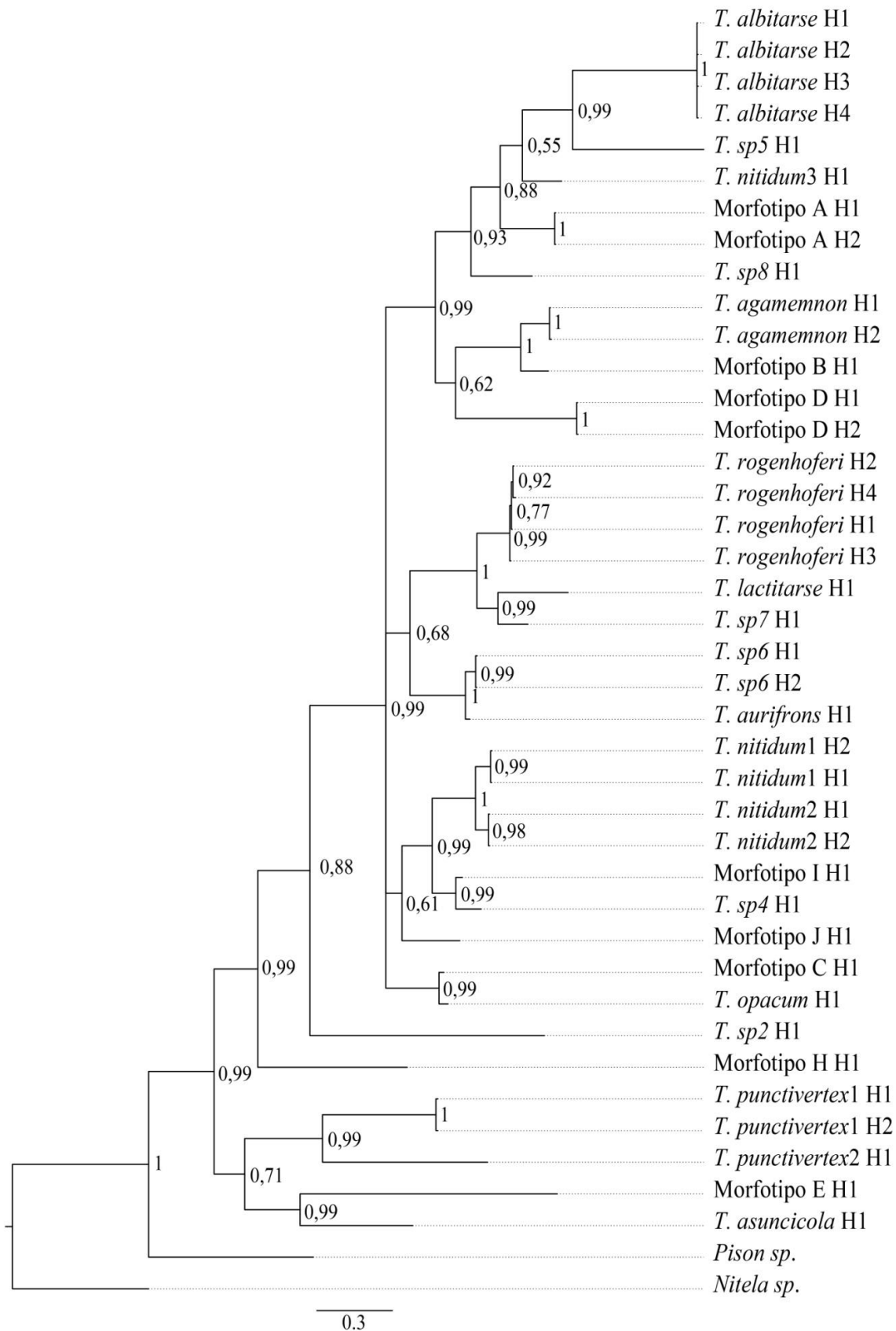
**Figura 18:** Rede de haplótipos do gene COI. Rede de haplótipos de sequências de espécimes do gênero *Trypoxylon* elaborada com o gene COI. Os nomes dos haplótipos estão indicados na Tabela 10. As cores estão presentes para facilitar a identificação de haplótipos do mesmo tipo genético.





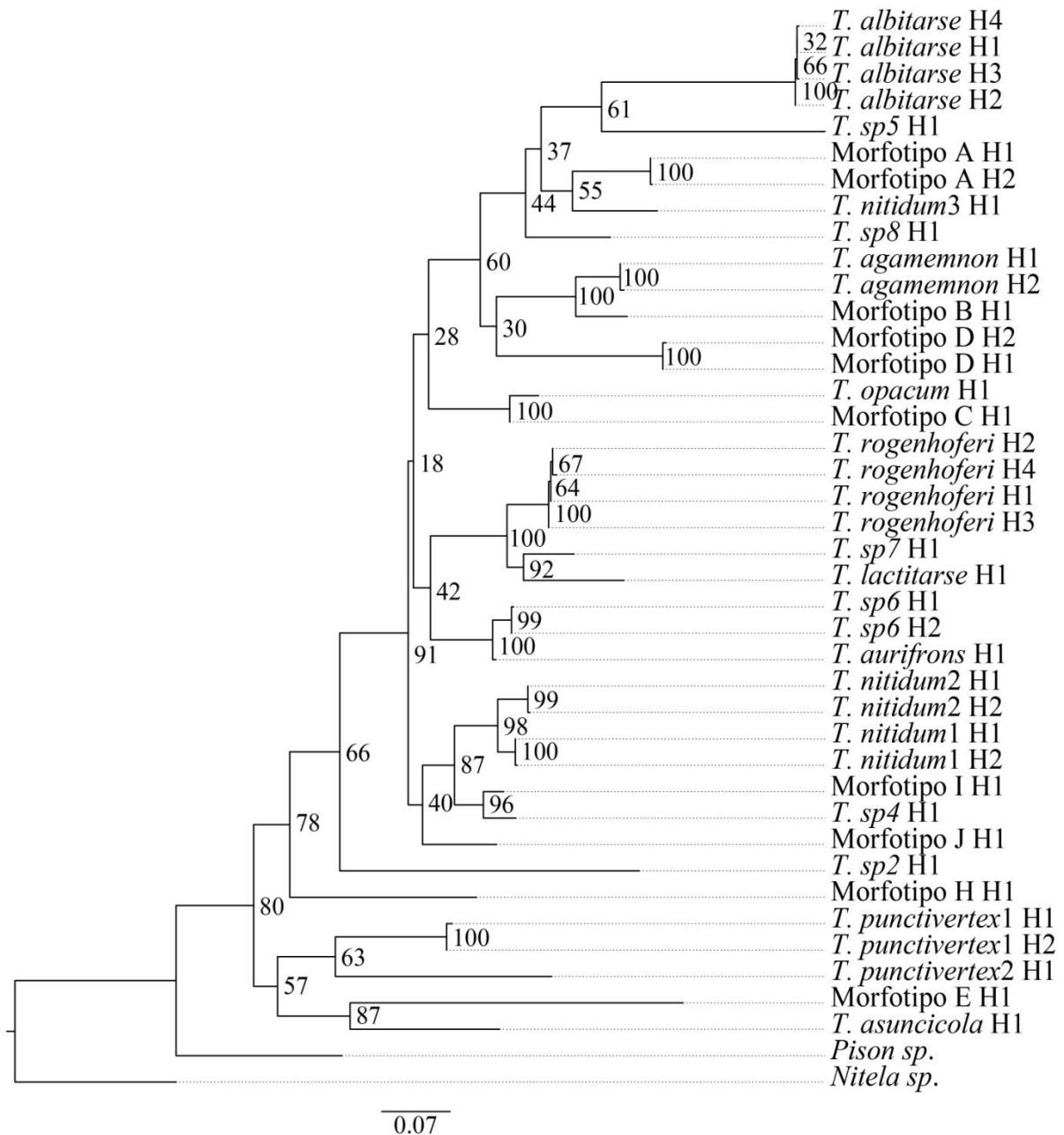
A análise filogenética para o gene COI pelo método de IB foi feita para 39 sequências em três partições, utilizando os modelos evolutivos TIM+G (nst=6) (POSADA, 2003) para a primeira partição e GTR+I+G (nst=6) (LANAVE et al., 1984; TAVARÉ, 1986; RODRÍGUEZ et al., 1990) para a segunda e terceira partições (Apêndice F) e não particionada com o modelo evolutivo GTR+I+G (nst=6) (LANAVE et al., 1984; TAVARÉ, 1986; RODRÍGUEZ et al., 1990) (Figura 19). Os grupos irmão utilizados foram espécies do gênero *Pison* e *Nitela*. A sustentação da maioria dos ramos foi alta, mostrando que os *priors* utilizados foram eficientes para a confecção de uma árvore filogenética informativa quanto à sustentação dos subgêneros *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) e *Trypoxylon* (*Trypargilum*) (Figura 19).

**Figura 19:** Árvore filogenética da região mitocondrial COI de espécimes do gênero *Trypoxylon* elaborada com dados particionados utilizando o método de IB.



A árvore filogenética elaborada pelo método de ML foi feita utilizando os mesmos grupos irmãos da análise por IB juntamente com sequências particionadas (Apêndice G) e não particionadas (Figura 20). Alguns ramos apresentaram altos valores de *bootstrap*, enquanto outros tiveram valores abaixo de 85 (Figura 20).

**Figura 20:** Árvore filogenética da região mitocondrial COI de espécimes do gênero *Trypoxylon* elaborada com dados particionados utilizando o método de ML.

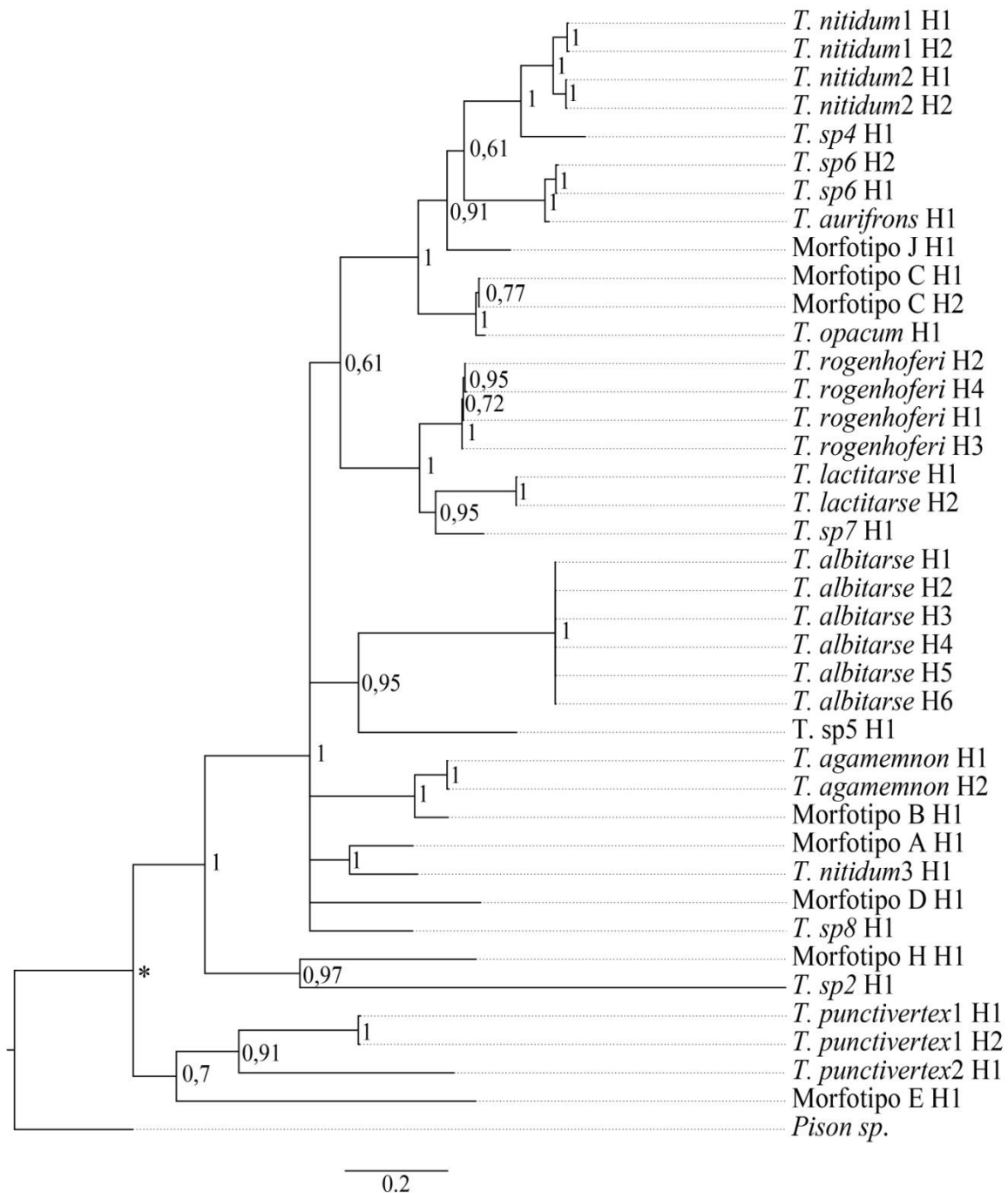


Os tipos genéticos que haviam sido analisados tanto para CytB quanto para COI tiveram suas sequências concatenadas gerando fragmentos com 1094 pb. Foram utilizadas 39 sequências que correspondiam a 24 tipos genéticos, sendo 20 do subgênero

*Trypoxylon (Trypargilum)* e quatro do subgênero *Trypoxylon (Trypoxylon)*. Como grupo irmão foi utilizada apenas uma sequência do gênero *Pison*, pois não foi possível sequenciar os indivíduos do gênero *Nitela*. Também não foram encontradas sequências de CytB que fossem próximas do gênero *Trypoxylon*.

A árvore filogenética gerada pela metodologia de IB foi feita em três partições. Os modelos evolutivos utilizados foram TIM+G (nst=6) (POSADA, 2003) para a primeira partição, GTR+I+G (nst=6) (LANAVE et al., 1984; TAVARÉ, 1986; RODRÍGUEZ et al., 1990) para a segunda partição e TrN+I+G (nst=6) (TAMURA; NEI 1993) para a terceira partição. Os valores de sustentação dos ramos foram altos, porém não foi possível identificar o valor de probabilidade *a posteriori* do ramo que separa os dois subgêneros, representado na árvore por um asterisco (Figura 21).

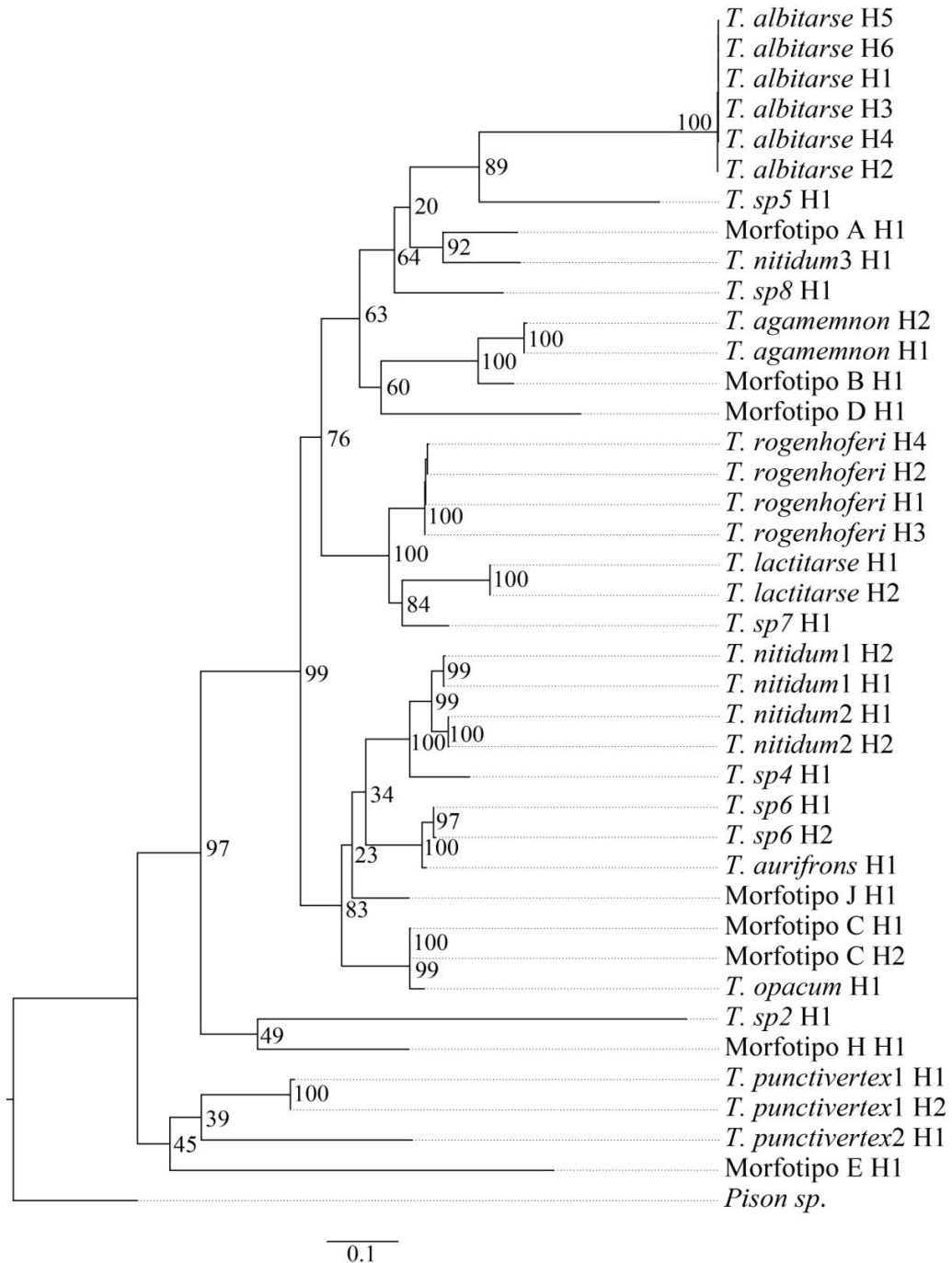
**Figura 21:** Árvore filogenética das regiões mitocondrial COI e CytB concatenadas de espécimes do gênero *Trypoxylon* elaborada pelo método de IB. O asterisco indica a divisão entre os subgêneros *Trypoxylon* (*Trypargilum*) e *Trypoxylon* (*Trypoxylon*).



A árvore filogenética gerada pela metodologia de ML apresentou topologia diferente da IB, porém as relações entre as espécies se mantiveram, de forma que os dois subgêneros continuaram separados. Na análise de ML também não foram vistas politomias, porém os ramos que correspondiam às politomias na análise por IB apresentaram baixos valores probabilidade de *bootstrap* na análise por ML. Também não foi possível estimar o

valor de *bootstrap* do ramo que separa os subgêneros *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) e *Trypoxylon* (*Trypargilum*) (Figura 22).

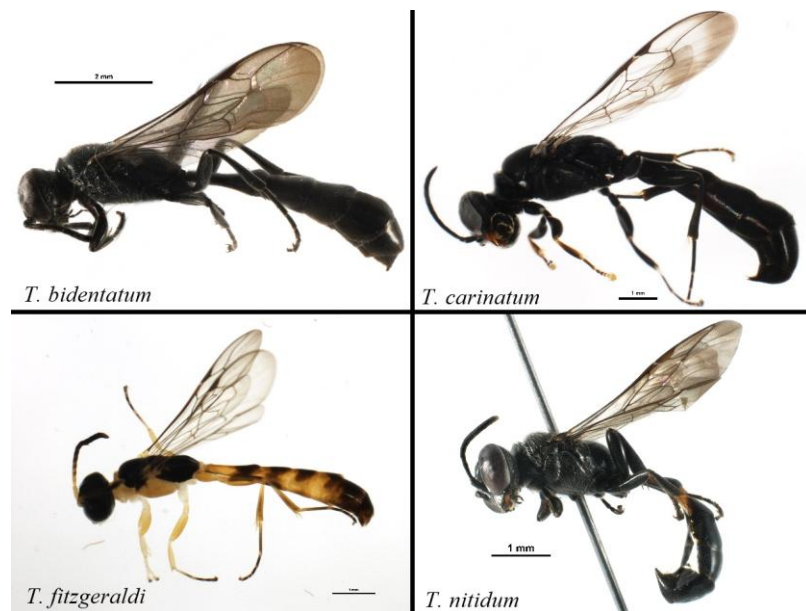
**Figura 22:** Árvore filogenética das regiões mitocondrial COI e CytB concatenadas de espécimes do gênero *Trypoxylon* elaborada pelo método de ML.



### 3.4 Seleção das sequências de bancos de dados, análises filogenéticas e estimativa de tempo de divergência dos subgêneros

Foram encontradas nos bancos de dados NCBI/GenBank e BOLD Systems v4 520 sequências referentes ao gene COI, correspondentes a 24 espécies do gênero *Trypoxylon* da região Neártica e Paleártica. Destas, quatro sequências foram excluídas por estarem identificadas como *affinis*, além de outras 95 sequências que não apresentavam o nome das espécies, sendo identificadas apenas como pertencentes ao gênero *Trypoxylon*. Ademais, a sequência referente ao espécime identificado como *T. (Trypoxylon) fitzgeraldi* apresentou resultados preliminares duvidosos após análise filogenética e ao comparar as fotos das demais espécies disponíveis no BOLD com a foto de *T. (Trypoxylon) fitzgeraldi* (Figura 23), foi possível observar diferenças morfológicas que levantam dúvidas sobre a correta identificação deste indivíduo. Portanto, com o intuito de não promover artefatos nas análises subsequentes, a sequência foi excluída, totalizando 421 sequências utilizadas.

**Figura 23:** Espécimes de *Trypoxylon* disponíveis no BOLD. Fotos de quatro espécimes identificados na plataforma BOLD Systems v4 como pertencentes ao gênero *Trypoxylon*. Apenas a escala da primeira foto (*T. (Trypoxylon) bidentatum*) é de 2 mm; as demais representam 1 mm.



Fotos: Retiradas do BOLD Systems v4 sem modificações.

Por fim, foram retiradas desse conjunto as sequências que apresentavam *indels* e/ou *missing data*, totalizando 173 sequências de 658 pb referentes a 18 espécies, as quais foram submetidas à análise de diversidade haplotípica nas espécies. Para as análises filogenéticas, apenas uma sequência por haplótipo foi utilizada, totalizando 63 haplótipos, enquanto que para as análises de delimitação de espécies por distância genética foram feitas

tanto as análises com todas as sequências de cada haplótipo como apenas uma sequência por haplótipo (Tabela 11).

**Tabela 11:** Informações das sequências obtidas de bancos de dados. Número de sequências (N), diversidade haplotípica (Hd), identificação dos haplótipos e número de identificação das sequências obtidas nos bancos de dados NCBI/GenBank e BOLD Systems v4.

Subgênero	Espécie	N	Hd	Haplótipo	BOLD Systems v4	NCBI/GenBank
<i>Trypoxylon</i>	<i>T. attenuatum</i>	11	0,18	AttH1	ASGLE1017-10	JN288384
				AttH2	JSJUL1744-11	KR808738
<i>Trypoxylon</i>	<i>T. bidentatum</i>	1	0	BidH1	BBHYA2762-12	
<i>Trypoxylon</i>	<i>T. carinatum</i>	6	0,33	CarH1	CNROF123-13	KR417862
				CarH2	OPPMO1458-17	
<i>Trypoxylon</i>	<i>T. clavicerum</i>	25	0,4	ClaH1	GBMIN11444-13	KC460790
				ClaH2	GBMIN11492-13	KC460783
				ClaH3	BBHYN095-10	JN294326
<i>Trypogilum</i>	<i>T. collinum</i>	3	0,66	ColH1	BBHYA1230-12	
				ColH2	BBHYA1293-12	
<i>Trypoxylon</i>	<i>T. figulus</i>	28	0,47	FigH1	CNW192-13	
				FigH2	CNW193-13	
				FigH3	CNW204-13	
				FigH4	BBHYL792-10	
<i>Trypoxylon</i>	<i>T. frigidum</i>	51	0,92	FriH1	ASAHY055-12	KM997506
				FriH2	JSYKA053-09	HM395410
				FriH3	JSYKA052-09	HM395409
				FriH4	JSYKA196-10	HM860368
				FriH5	ASGLE999-10	JN289137
				FriH6	ASGLE1000-10	JN288368
				FriH7	JSYKA054-09	HM395411
				FriH8	TWHYM031-09	GU675378
				FriH9	JSHYM804-11	KR804941
				FriH10	BBHYI172-10	JN292291
				FriH11	BBHYJ998-10	JF864624
				FriH12	BBHYI516-10	JN292518
				FriH13	BBHYI173-10	JN292292
				FriH14	PHMTV275-10	JN308036
				FriH15	ERPIR177-12	KR805957
				FriH16	BBHYA2780-12	
				FriH17	RRMFG2769-15	
				FriH18	JSYKA592-10	HQ569261
<i>Trypoxylon</i>	<i>T. johnsoni</i>	3	1	JohH1	ASGLF218-11	KM996017
				JohH2	ASGLF219-11	KM996525
				JohH3	TTMHY667-11	KR883303
<i>Trypogilum</i>	<i>T. lactitarse</i>	2	0	LacH1	TTHYW021-08	KR874003
<i>Trypoxylon</i>	<i>T. lissonotum</i>	1	0	LisH1	HYSAF086-12	
<i>Trypoxylon</i>	<i>T. medium</i>	1	0	MedH1	FBACA948-10	HQ947977
<i>Trypoxylon</i>	<i>T. minus</i>	1	0	MinH1	ARTNO183-17	



**Tabela 11:** Continuação

Subgênero	Espécie	N	Hd	Haplótipo	BOLD Systems v4	NCBI/GenBank
<i>Trypargilum</i>	<i>T. nitidum</i>	10	0,86	NitH1	BBHYA3337-12	
				NitH2	BBHYA850-12	
				NitH3	CNPPF1230-12	KJ166704
				NitH4	CNPPE1221-12	KJ090765
				NitH5	SYC1487-14	KX055172
				NitH6	OPPEO6415-17	
				NitH7	OPPQG256-17	
<i>Trypoxylon</i>	<i>T. pennsylvanicum</i>	10	0,62	PenH1	ASGLE1649-10	JN288868
				PenH2	OPPOC1344-17	
				PenH3	CNPPG203-12	KJ163327
<i>Trypargilum</i>	<i>T. politum</i>	10	0,91	PolH1	BBHYA336-12	
				PolH2	TTHYW902-08	KR895965
				PolH3	BBHY338-12	
				PolH4	BBHYA414-12	
				PolH5	BBHYA570-12	
				PolH6	OPPFS130-17	
				PolH7	OPPQQ074-17	
<i>Trypargilum</i>	<i>T. spinosum</i>	5	1	SpiH1	BBHYA1228-12	
				SpiH2	BBHYA1248-12	
				SpiH3	BBHYA1306-12	
				SpiH4	BBHYA1307-12	
				SpiH5	GMMCF066-14	
<i>Trypoxylon</i>	<i>T. stroudi</i>	1	0	StrH1	HYSAF121-12	
<i>Trypargilum</i>	<i>T. tridentatum</i>	1	0	TriH1	BBHYA1294-12	

Fonte: Do autor utilizando dados do BOLD Systems v.4 e GenBank/NCBI.

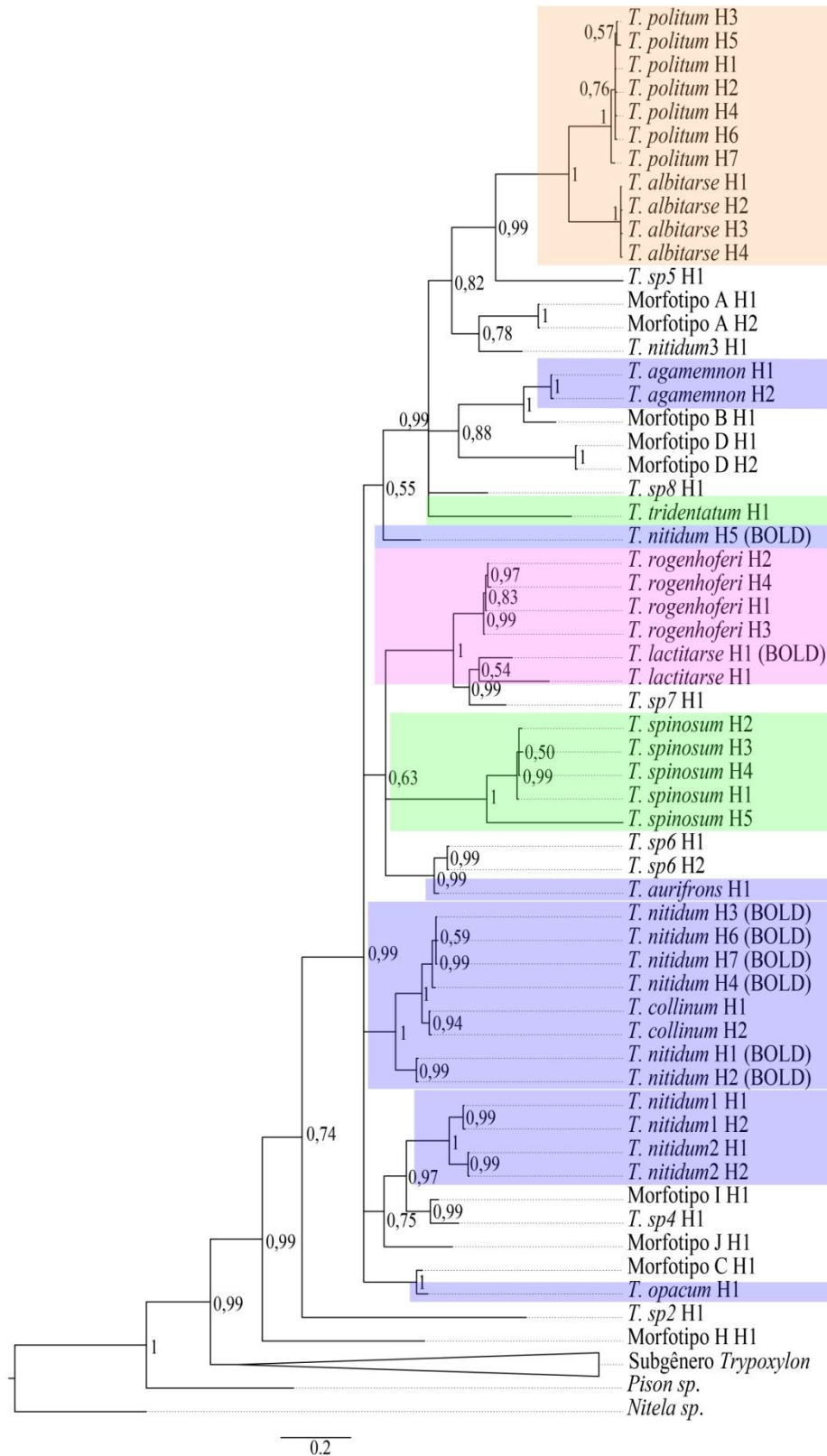
Essas sequências foram agrupadas às sequências de COI obtidas em nosso trabalho e a análise filogenética pelos métodos de IB e ML foi feita utilizando 81 sequências do gênero *Trypoxylon*, correspondendo a 26 tipos genéticos do subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) e 17 tipos genéticos do subgênero *Trypoxylon* (*Trypoxylon*). Os grupos irmãos utilizados nas duas metodologias foram sequências dos gêneros *Pison* e *Nitela*.

A árvore filogenética pelo método de IB foi feita sem partições utilizando o modelo evolutivo GRT+I+G (nst=6) (LANAVE et al., 1984; TAVARÉ, 1986; RODRÍGUEZ et al., 1990) (Figuras 24 e 25) e em três partições, utilizando os modelos evolutivos K81uf+G (nst=6) (KIMURA, 1981) para a primeira partição e GTR+I+G (nst=6) (LANAVE et al., 1984; TAVARÉ, 1986; RODRÍGUEZ et al., 1990) para a segunda e terceira partições (Apêndices H e I). Os valores de probabilidade *a posteriori* foram altos, sendo uma árvore com alta sustentação dos ramos e, apesar de haver muitas politomias em sua topologia, as

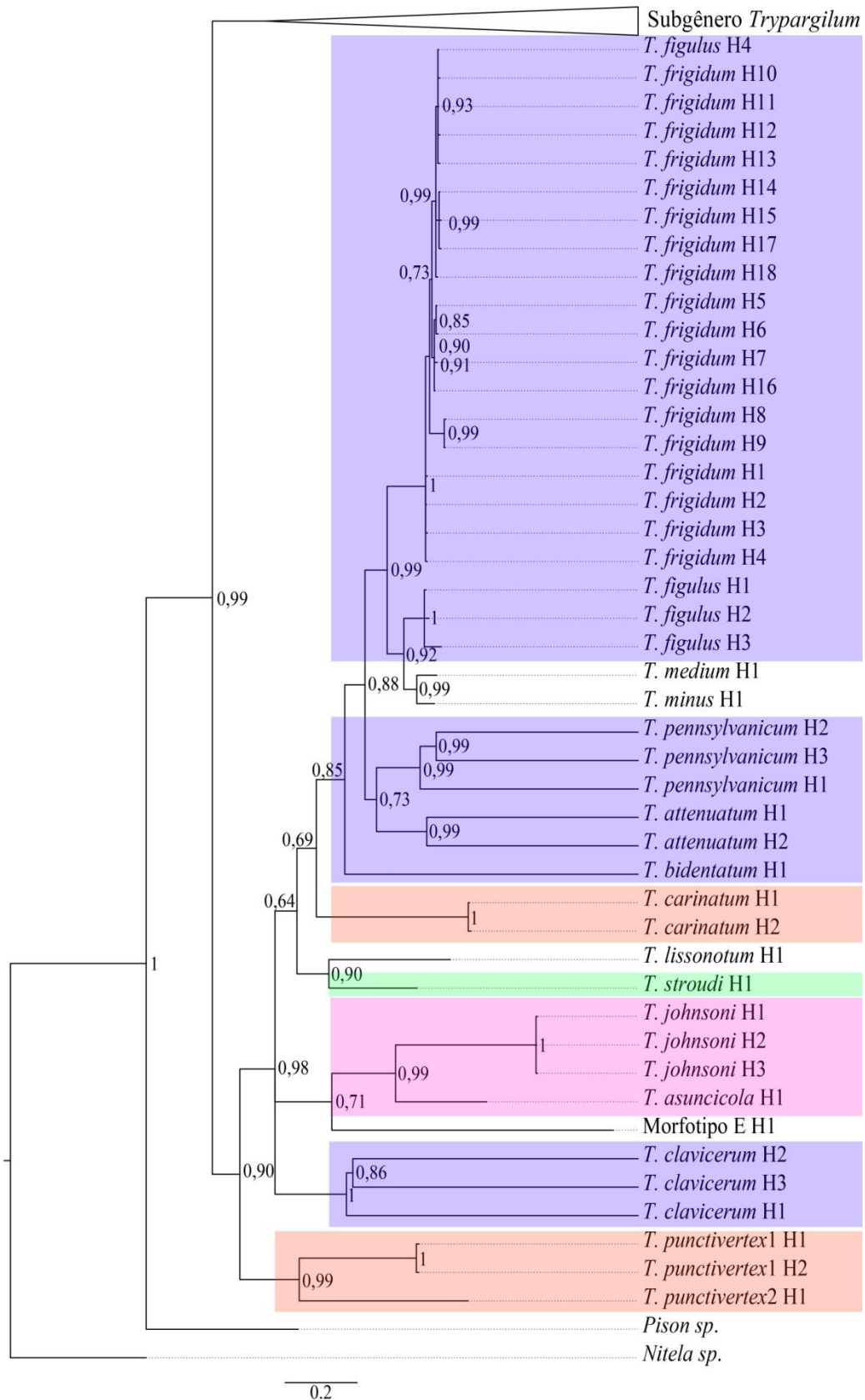
relações entre os subgêneros pode ser vista claramente juntamente com as a separação em grupos de espécies.

A árvore filogenética pela metodologia de ML também foi elaborada com os dados particionados (Apêndices J e K) e não particionados (Figuras 26 e 27), o que gerou uma topologia semelhante à obtida pela análise por IB, porém os valores de *bootstrap* foram baixos na maioria dos ramos.

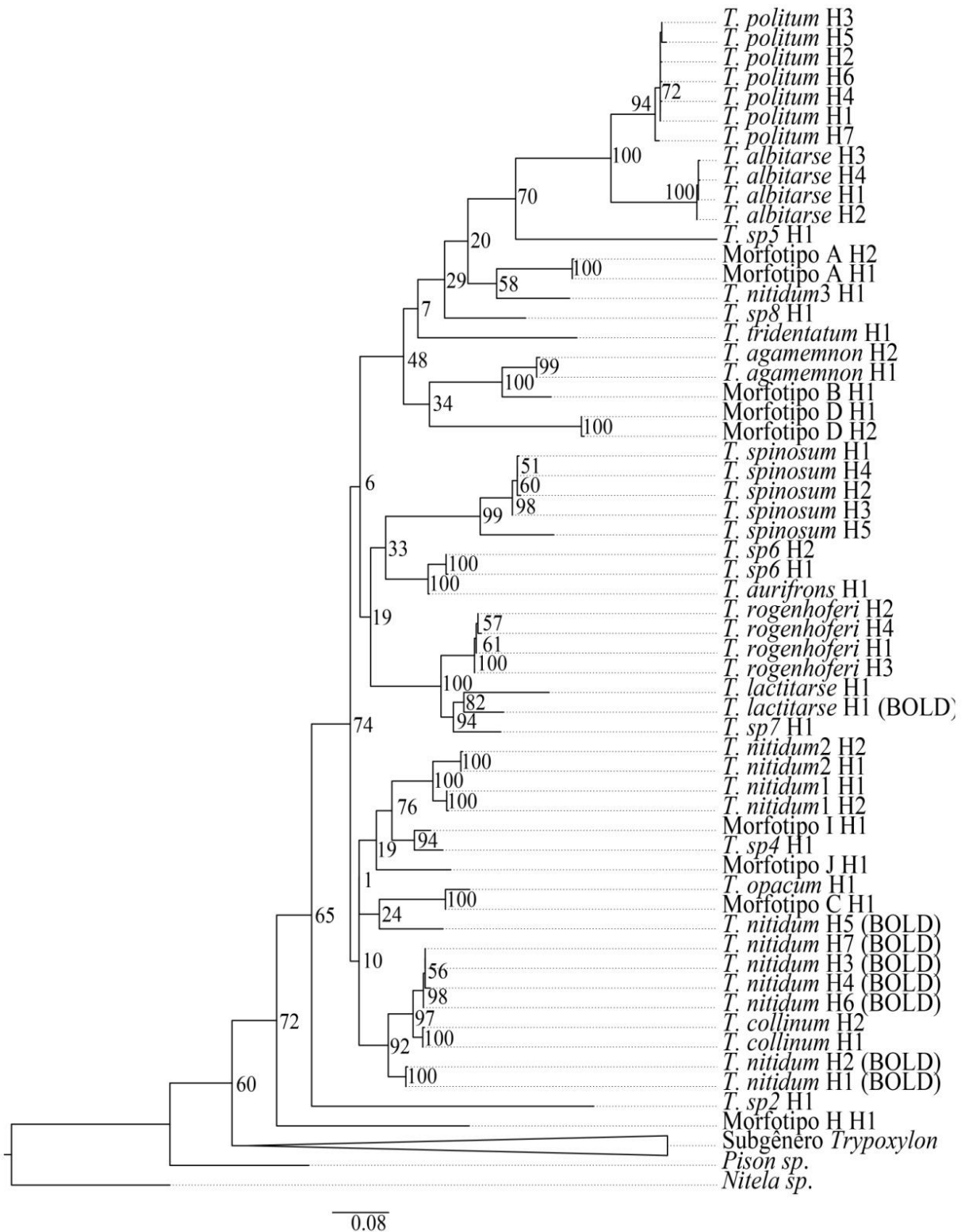
**Figura 24:** Árvore filogenética do gene COI com destaque para o subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*). Árvore elaborada pela metodologia de Inferência Bayesiana. Ramos destacados em vermelho correspondem às espécies do grupo *T. albitarse*, em azul ao grupo *T. nitidum*, em verde ao grupo *T. spinosum* e em rosa ao grupo *T. punctulatum*.



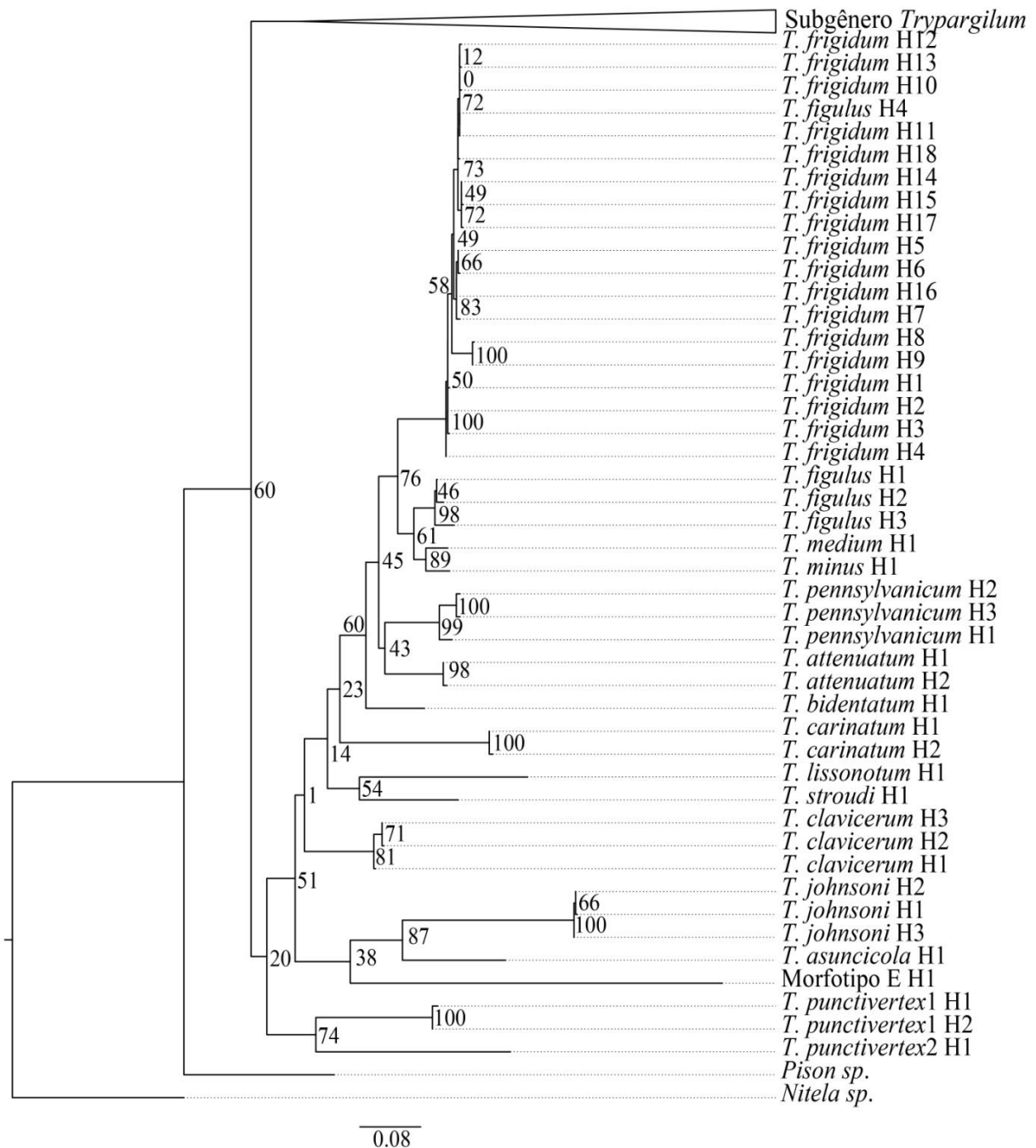
**Figura 25:** Árvore filogenética do gene COI com destaque para o subgênero *Trypoxylon* (*Trypoxylon*). Árvore elaborada pela metodologia de Inferência Bayesiana. Ramos destacados em vermelho correspondem às espécies do grupo *T. marginatum*, em azul ao grupo *T. figulus*, em verde ao grupo *T. scutatatum* e em rosa ao grupo *T. fabricator*.



**Figura 26:** Árvore filogenética do gene COI – subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) - gerada pela metodologia de ML utilizando seqüências do gene COI sem partições.

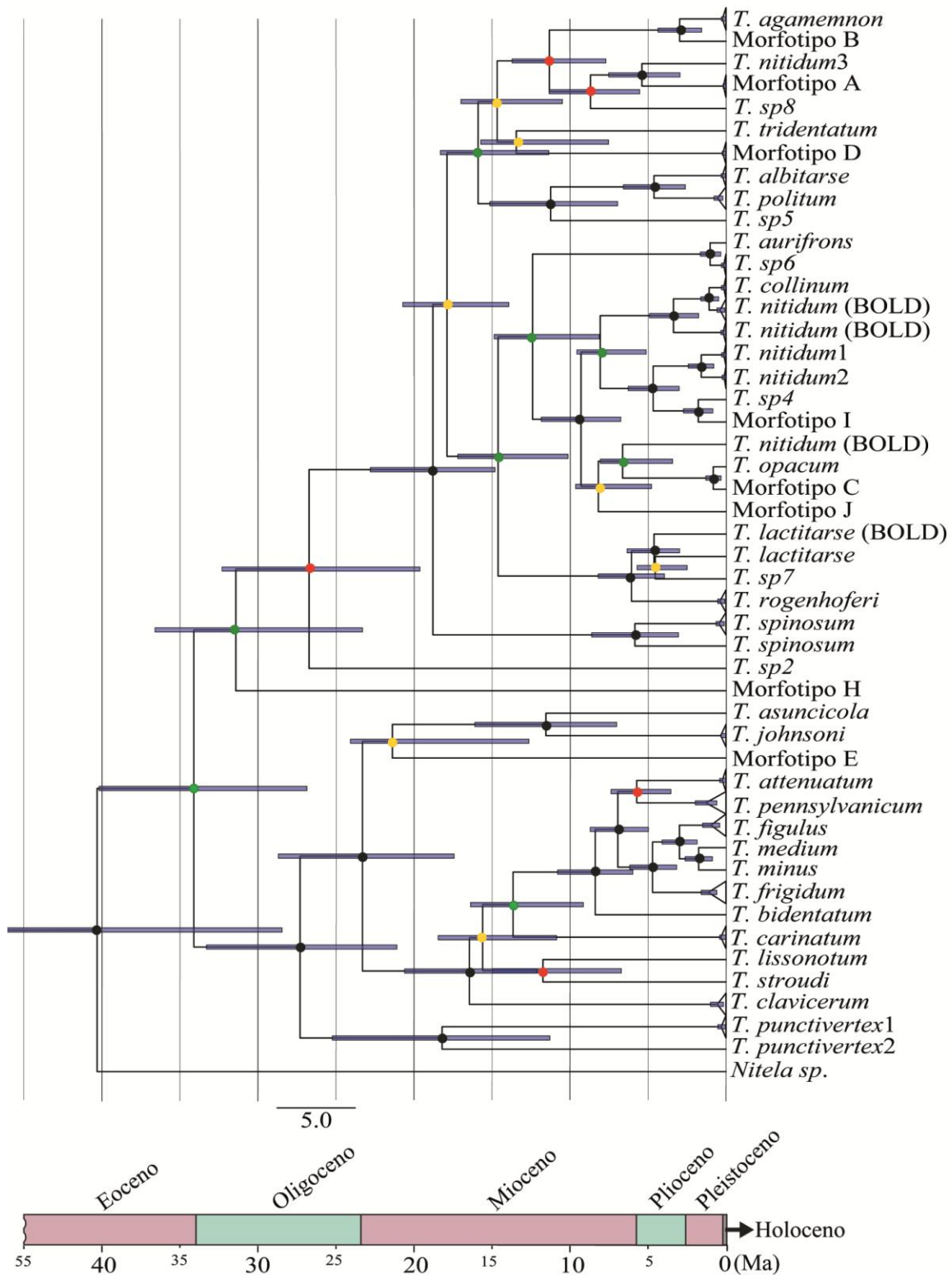


**Figura 27:** Árvore filogenética do gene COI – subgênero *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) - gerada pela metodologia de ML utilizando sequências do gene COI sem partições.



O resultado da análise de tempo de divergência revelou que os subgêneros *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) e *Trypoxylon* (*Trypargilum*) divergiram entre o Eoceno e o Oligoceno, há 36,5 milhões de anos, com intervalo de confiança (95% HPD) de 27,5 a 46,9 milhões de anos (Figura 28). Dessa forma, o gênero *Trypoxylon* teria surgido há cerca de 40 milhões de anos, com um intervalo de confiança (95% HPD) de 28,4 a 54,5 milhões de anos.

**Figura 28:** Árvore filogenética evidenciando o tempo de divergência do gênero *Trypoxylon*. Árvore elaborada por IB para o gene COI calibrada com a taxa de mutação de 1,9% Ma para a obtenção do tempo de divergência do gênero *Trypoxylon*. As barras azuis indicam 95% HPD dos valores estimados e os círculos coloridos representam os valores de probabilidade *a posteriori* de cada ramo. Preto (1,00 – 0,90), vermelho (0,89 – 0,70), verde (0,69 – 0,50) e amarelo (0,49 – 0,00).



### 3.5 Delimitação de espécies

Ao fazer a análise de delimitação e identificação de espécimes pelo método de distância genética com todas as sequências de COI obtidas no trabalho ( $n = 333$ ), o valor de ótimo *threshold* (OT) estimado foi de 0,0381 (3,81%) na análise com os grupos externos e 0,0388 (3,88%) na análise sem os grupos externos. Convertendo os valores de OT em número de substituições em sequências de 658 pb, temos 25,5 e 25 substituições nucleotídicas, respectivamente, o que não alterou a atribuição das sequências às MOTUs pelo programa jMOTU, recuperando 41 MOTUs.

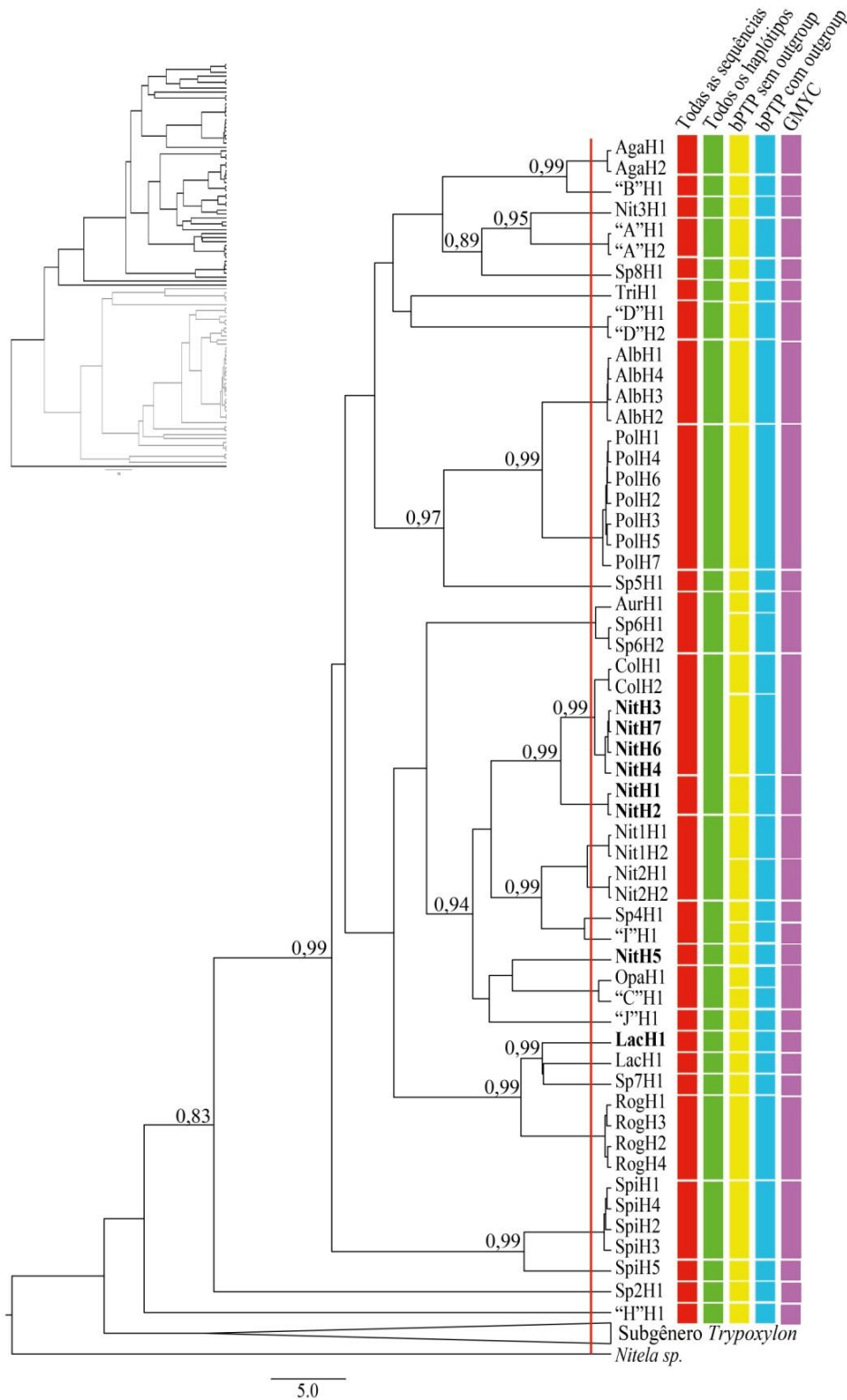
Os resultados obtidos utilizando uma sequência por haplótipo ( $n = 102$ ) foi diferente, apresentando o valor de OT de 0,0434 (4,34%) sem os grupos externos e 0,0483 (4,48%) com os grupos externos. Convertendo essa porcentagem para número de substituições, temos que o OT é de 28,6 e 29,5, respectivamente. Porém, ao atribuir as sequências às MOTUs, não há diferenças se utilizarmos os valores de 28 a 30 substituições nucleotídicas como valor de corte para determinar a diversidade interespecífica, pois da mesma forma foram recuperadas 39 MOTUs (Figuras 29 e 30).

A análise pelo método filogenético e coalescente feita utilizando o bPTP recuperou um total de 50 espécies ao considerar o grupo externo (grupos externos *Pison* sp. e *Nitela* sp. não inclusos nesse valor) e 52 espécies sem considerar os grupos externos (Figuras 29 e 30). As corridas convergiram (Apêndices L e M) e os valores de suporte das espécies estão indicados nos Apêndices N e O.

A análise pelo método GMYC teve como resultado o valor de máxima verossimilhança do modelo de GMYC significativamente superior ( $L = 160,68$ ) à verossimilhança do modelo nulo ( $L_0 = 125,01$ ,  $p$ -value 0.000), indicando que há mais de uma espécie no conjunto de dados. O ponto em que os processos de especiação passam a ser processos de coalescência está indicado pela linha vermelha nas Figuras 29 e 30, sugerindo a presença de 46 entidades com um intervalo de confiança de 42-53, incluindo o grupo externo *Nitela* sp.



**Figura 29:** Delimitação de espécies do subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*). Topologia de IB com detalhe ao subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) derivada da análise de delimitação de espécies. Os resultados da análise por distância genética são apresentados nas barras vermelha (todas as 333 sequências) e verde (todos os 102 haplótipos). As análises filogenética e de coalescência por bPTP estão representadas pelas barras amarela (sem os grupos externos) e azul (com os grupos externos) e a análise por GMYC está representada pela barra roxa. A linha horizontal vermelha indica o ponto em que os eventos de especiação passam a ser eventos de coalescência com base na análise de GMYC e os nomes em negrito são as sequências retiradas do BOLD Systems v4. São mostrados apenas os valores de probabilidade *a posteriori* acima de 0,80.



**Figura 30:** Delimitação de espécies do subgênero *Trypoxylon* (*Trypoxylon*). Topologia de IB com detalhe ao subgênero *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) derivada da análise de delimitação de espécies. Os resultados da análise por distância genética são apresentados nas barras vermelha (todas as 333 sequências) e verde (todos os 102 haplótipos). As análises filogenética e de coalescência por bPTP estão representadas pelas barras amarela (sem os grupos externos) e azul (com os grupos externos) e a análise por GMYC está representada pela barra roxa. A linha horizontal vermelha indica o ponto em que os eventos de especiação passam a ser eventos de coalescência com base na análise de GMYC e os nomes em negrito são as sequências retiradas do BOLD Systems v4. São mostrados apenas os valores de probabilidade *a posteriori* acima de 0,80.



## 4 Discussão

### 4.1 Caracterização da variação gênica

Considerando os três genes analisados (*pol*, CytB e COI), os genes CytB e COI se mostraram mais polimórficos. Tal fato é amplamente reconhecido por serem genes mitocondriais, porém, particularmente em vespas Crabronídeas, a evolução do genoma mitocondrial ocorre de maneira acelerada em relação ao genoma nuclear, apresentando maior taxa de substituição nucleotídica do genes mitocondriais em relação aos genes nucleares (KALTENPOTH et al., 2012).

Em relação ao número de sítios polimórficos e sítios parcimoniosamente informativos, vemos que *pol* apresenta 124 sítios polimórficos e 51% deles correspondem a sítios nos quais há substituição nucleotídica em mais de uma sequência (sítios parcimoniosamente informativos).

Nos genes mitocondriais CytB e COI, essa relação de sítios parcimoniosamente informativos foi consideravelmente maior, representando 85% dos sítios polimórficos em CytB e 91% dos sítios polimórficos em COI, indicando maior variação informativa nos genes mitocondriais.

Apesar da baixa diversidade nucleotídica do gene nuclear *pol* se comparado aos genes mitocondriais (Apêndices A, B e E), toda variação presente no gene *pol* encontra-se em regiões codificantes, pelo fato de não haver íntrons no fragmento de 771 pb, como descrito por Danforth et al. (2006) ao caracterizar este gene. Também foi vista variação dentro das espécies, apresentando inclusive sequências com picos duplos (Tabela 7), reflexo da possível heterozigotidade que pode ser identificada ao se analisar genes nucleares. Em contrapartida, foi possível observar que morfotipos diferentes como *T. (Trypargilum) agamemnon* e *T. (Trypargilum) Morfotipo B* e *T. (Trypargilum) nitidum1* e *T. (Trypargilum) nitidum 2* apresentaram o mesmo haplótipo (Figura 10), sendo que nas análises com os genes mitocondriais, estes espécimes possuíam número de substituições nucleotídicas relativamente altos, sendo 36 substituições entre AgaH1 e “B”H1 para o gene CytB e 43 substituições nucleotídicas para o gene COI, além de 8 substituições nucleotídicas para o gene CytB entre Nit1H1 e NitH2 e 20 substituições para o gene COI. Portanto, apesar de fornecer informações valiosas sobre a filogenia dos grupos por apresentar dados da evolução de uma região nuclear, o gene *pol* não possibilita que seja efetuada a separação de espécies.

Diferentemente, os genes CytB e COI apresentaram variação nucleotídica semelhante com 38 e 42 haplótipos, respectivamente. Os dois genes apresentaram alta

diversidade nucleotídica intra e interespecífica, embora a variação no interior das espécies tenha sido maior para o gene COI do que para o gene CytB (Apêndices B e E). No entanto, os dois genes podem ser considerados adequados para estimar a diversidade nucleotídica interespecífica e intraespecífica.

Foi observado também a presença de picos duplos na região CytB para os espécimes identificados como e *T. (Trypargilum)* Morfotipo I. Esse achado não é algo esperado em genes mitocondriais, uma vez que são de origem uniparental e, portanto, apresentam apenas uma cópia de seus genes (WILSON et al., 1985). Porém, casos como esses são descritos como prováveis heteroplasmias em que há mais de um tipo de DNA mitocondrial (DNAm) no indivíduo (ROBERTSON; WILLIAMS, 2009; MAGNACCA; BROWN, 2010) e que, em insetos, é atribuído à passagem do DNAm paterno para a prole (MEUSEL; MORITZ, 1993). Como os três indivíduos analisados do e *T. (Trypargilum)* Morfotipo I foram fêmeas, essa possibilidade não pode ser descartada.

Uma segunda explicação para este resultado é a presença de *Numts*, regiões do DNA nuclear que são parálogas ao DNAm e que são igualmente amplificadas durante a reação de PCR, gerando picos duplos (SONG; MOULTON; WHITING, 2014). Nesse caso, há boas chances de haver *Stop codons* nas sequências, o que não foi observado em nossos dados.

#### 4.2 Relações de parentesco entre os subgêneros

As análises filogenéticas realizadas demonstraram que assim como o estabelecido por Richards (1934), Bohart e Menke (1976) e Coville (1982) com base em dados morfológicos e comportamentais, a divisão subgenérica em *Trypoxylon (Trypoxylon)* e *Trypoxylon (Trypargilum)* foi bem sustentada pelos dados moleculares.

As árvores filogenéticas elaboradas com o gene *pol* pelos métodos de IB e ML apresentaram altos valores de sustentação dos ramos e topologia semelhante mantendo as relações entre os tipos genéticos. A única diferença entre elas foi a sustentação do ramo destacado com um asterisco que foi baixo (0,63) na análise por IB e que na análise por ML está representado por uma politomia (Figuras 11 e 12). O único tipo genético representante do subgênero *Trypoxylon (Trypoxylon)* nesta análise foi *T. (Trypoxylon) punctivertex* que se encontra como grupo irmão em relação às espécies do gênero *Trypoxylon (Trypargilum)*. Esse, por sua vez, apresenta dois clados, sendo um representado por *T. (Trypargilum) sp2* e o outro inclui os demais tipos genéticos pertencentes ao subgênero (Figuras 11 e 12).

Apesar do gene *pol* não fornecer informações muito robustas acerca da sustentação dos subgêneros devido à amostragem insuficiente de espécies para o subgênero *Trypoxylon* (*Trypoxylon*), ele parece reproduzir o que foi visualizado para os genes mitocondriais CytB e COI.

A sustentação da árvore filogenética elaborada pelo método IB com o gene CytB foi baixa em alguns ramos (abaixo de 0,95) e não foi possível obter o valor de sustentação do ramo que divide os dois subgêneros devido a ausência de um segundo grupo externo no conjunto de dados; porém, é possível observar dois clados principais, sendo um composto por tipos genéticos identificados como pertencentes ao subgênero *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) e outro correspondente aos tipos genéticos do subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) (Figura 16).

Assim como observado nas árvores do gene *pol* (Figuras 11 e 12), o tipo genético *T. (Trypargilum) sp2* encontra-se em um ramo separado dos demais representantes do subgênero, porém, agora mais espécimes permaneceram mais proximamente relacionados a ele formando um grupo monofilético com os tipos genéticos *T. (Trypargilum) albitarse* e *T. (Trypoxylon) Morfotipo H*. No entanto, devido à baixa sustentação do ramo que dá origem a esse grupo (0,51), essa relação permanece incerta (Figura 16).

A árvore elaborada pelo método de ML com o gene CytB apresentou valores predominantemente baixos nos ramos mais profundos da topologia, mostrando baixa robustez dos dados no que se diz respeito à relação de parentesco dos subgêneros (Figura 17). Algo semelhante foi visto nas topologias elaboradas pelo método de ML para o gene COI (Figuras 20, 26 e 27). Apesar de apresentar valores de sustentação mais altos do que a árvore filogenética de ML do gene CytB, os ramos mais profundos das árvores de COI apresentaram valores de sustentação menores do que os aceitáveis (acima de 85), impedindo a discussão a respeito das relações de parentesco entre os subgêneros.

Em contrapartida, as análises com o gene COI elaboradas pelo método de IB, apresentaram altos valores de sustentação dos ramos e os resultados referentes às relações filogenéticas entre subgêneros se manteve como nos demais genes.

Na análise pela metodologia IB utilizando apenas as amostras sequenciadas nesse trabalho (Figura 19) foi possível observar dois clados bem definidos com alta sustentação do ramo que o origina (1), corroborando a divisão entre os subgêneros. No subgênero *Trypoxylon (Trypargilum)*, *T. (Trypargilum) sp2* e *T. (Trypoxylon) Morfotipo H* se

mantêm como grupos mais ancestrais, enquanto que os demais tipos genéticos se encontram em um único clado (Figura 19).

Ao concatenar os genes CytB e COI, as árvores filogenéticas obtidas em ambos os métodos (IB e ML) apresentaram altos valores de sustentação dos ramos (Figuras 21 e 22), diferentemente do que foi visto para as análises com o gene CytB para ambos os métodos (Figuras 16 e 17) e pelo método de ML para o gene COI (Figura 20).

Concatenar ou não os dados são estratégias amplamente discutidas dentro da análise filogenética, uma vez que as estratégias distintas são indicadas – ou combinar toda a evidência em uma única análise (KLUGE, 1989), ou conduzir análises separadas para cada conjunto de dados e depois produzir uma árvore consenso (MIYAMOTO; FITCH, 1995), ou ainda testar a heterogeneidade dos dados para depois combiná-los (BULL et al., 1993; HUELSENBECK; BULL; CUNNINGHAM, 1996). Os nossos dados foram produzidos com o intuito de analisar as topologias geradas para cada gene antes de concatená-los; com isso, foi possível observar que os baixos valores de sustentação dos ramos mais profundos observados em CytB e COI (ML) aumentaram quando os dados foram concatenados, indicando que, como Hills (1987) sugere, combinar dados com baixa resolução em ramos externos com dados com alta resolução em ramos mais profundos aumenta a resolução da árvore final, a qual em nossos resultados teve topologia semelhante à observada para o gene COI (Figura 19).

O mesmo foi visto ao considerarmos as sequências de COI obtidas nos bancos de dados e analisadas pelo método de IB (Figuras 24 e 25). Em todas essas análises, novamente os tipos genéticos *T. (Trypargilum) sp2* e *T. (Trypoxylon) Morfotipo H* permaneceram como espécies mais ancestrais dentro do subgênero *Trypoxylon (Trypargilum)*. Esse resultado se revela uma evidência de que, assim como na classificação feita por caracteres morfológicos, há a possibilidade de que ocorram mais de dois subgêneros no gênero *Trypoxylon*, de forma que *Trypoxylon (Trypargilum)* possa ser dividido em outros subgêneros como sugerido por Bohart e Menke (1976), Coville (1982) e Amarante (2005).

Ao comparar a árvore produzida pelo método IB com o gene COI particionado (Apêndice F), foi possível identificar que os tipos genéticos *T. (Trypoxylon) punctivertex1* e *T. (Trypoxylon) punctivertex2* encontram-se no clado referente ao subgênero *Trypoxylon (Trypargilum)*. Essa diferença também foi vista na classificação morfológica para diversas espécies devido ao fato de não haver sinapomorfias que sustentem o subgênero *Trypoxylon*

(*Trypoxylon*) como um grupo monofilético (AMARANTE 2005), evidenciado a necessidade de ser elaborada uma revisão para o gênero.

As análises de tempo de divergência mostraram que o gênero *Trypoxylon* teria surgido há cerca de 43 milhões de anos no período Eoceno, enquanto que a divergência entre os subgêneros *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) e *Trypoxylon* (*Trypargilum*) provavelmente tenha ocorrido entre os períodos Eoceno e Oligoceno, há cerca de 36,5 milhões de anos. Os primeiros registros fósseis do gênero *Trypoxylon* datam de 45 a 25 milhões de anos e correspondem a três espécies do subgênero *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) do grupo de espécies *T. fabricator* (PRETENCE; PONAIR, 1993). Esses registros são concordantes com o tempo de divergência aqui estimado e, apesar de não ser possível calibrar os nossos dados com as informações de registros fósseis e taxa de mutação devido a não convergência das corridas realizadas no BEAST, é possível comparar nossos resultados com dados de transcriptoma produzidos por Peters e colaboradores (2017) que utilizaram uma espécie do gênero *Trypoxylon* para investigar a história evolutiva de Hymenoptera, sugerindo que o gênero *Trypoxylon* tenha surgido há cerca de 45 milhões de anos.

#### 4.3 Divisão dos subgêneros em grupos de espécies

O gênero *Trypoxylon*, além de ser dividido em subgêneros, também é separado em grupos de espécies que, por sua vez, são divididos em subgrupos (RICHARDS, 1934). As espécies do gênero com distribuição Neártica tiveram a classificação de grupos de espécies revisada por Sandhouse (1940), assim como as espécies do subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) da América do Norte que também foram revisadas por Coville (1982). Porém as espécies que ocorrem em outras regiões não tiveram modificações quanto à sua classificação.

A classificação elaborada por Richards (1934) levava em consideração principalmente caracteres morfológicos; estes passaram a ser muito diversos devido ao elevado número de espécies identificadas. Por esse motivo, as diferenças entre os grupos já não é clara, dificultando a identificação dos mesmos (BOHART; MENKE, 1976; COVILLE, 1982).

A utilização de dados moleculares possibilitou a observação, com base no gene COI, da relação filogenética entre os grupos de espécies, subgrupos e complexos de espécies a eles relacionados com base nas espécies aqui amostradas (Figuras 24 e 25).

No subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) (Figura 24), as espécies *T. (Trypargilum) politum* e *T. (Trypargilum) albitarse* pertencem ao grupo *T. albitarse* (subgrupo *T. albitarse*) pela classificação de Richards (1934). Para Sandhouse (1940) o grupo

*T. albitarse* corresponde ao grupo Politum que em Coville (1982) o mesmo grupo é denominado Albitarse. Os dados moleculares corroboram esta classificação, sendo o clado formado por *T. (Trypargilum) politum* e *T. (Trypargilum) albitarse*, um grupo monofilético (em vermelho na Figura 24).

As espécies apresentadas em ramos azuis (Figura 24) foram identificadas como do grupo *T. nitidum* que, com base no gene COI, corresponde a um grupo polifilético. Na classificação de Richards (1934) os demais ramos coloridos apresentados na Figura 24 pertenceriam cada cor a um grupo diferente, sendo estes *T. punctulatum* (laranja) e *T. spinosum* (verde). Porém, na revisão elaborada por Coville (1982), esses grupos foram denominados de complexos de espécies dentro do grupo Nitidum e algumas modificações aconteceram, como no caso da espécie *T. (Trypargilum) tridentatum* que está incluída na classificação de Richards (1934) como pertencente ao grupo *T. spinosum* por apresentar caracteres semelhantes ao grupo *T. nitidum*, mas possuir a genitália do macho diferente dos demais. Para Sandhouse (1940) e Coville (1982), *T. (Trypargilum) tridentatum* pertence ao grupo Nitidum assim como *T. (Trypargilum) opacum*, porém não apresentam um complexo de espécies definido devido a diversos caracteres morfológicos.

Analisando as relações entre as espécies dos grupos *T. punctulatum* e *T. spinosum*, temos que *T. punctulatum* corresponde a um grupo parafilético, porém com potencial a vir a ser monofilético se a espécie *T. (Trypargilum) sp7* for identificada como pertencente a esse grupo; já *T. spinosum* corresponde a um grupo polifilético abrangendo as espécies *T. (Trypargilum) tridentatum* e *T. (Trypargilum) spinosum*.

Em relação ao subgênero *Trypoxylon (Trypoxylon)* (Figura 25), o grupo classificado por Richards (1934) como *T. marginatum* permaneceu com a mesma descrição, porém foi renomeado para Marginatum em Sandhouse (1940); a espécie *T. (Trypoxylon) carinatum*, considerada por Richards (1934) como pertencente a *T. marginatum*, passou a ser considerada como do grupo Scutatatum (SANDHOUSE, 1940) juntamente com a espécie *T. (Trypoxylon) stroudi*.

Há poucas espécies conhecidas no grupo Marginatum pelo fato da sua maior diversidade estar localizada no extremo sul da América, apesar de sua distribuição atingir todo o continente (RICHARDS, 1934). Os dados moleculares mostraram que esse grupo, assim como *T. figulus* - grupo Figulus em Sandhouse (1940) - representam grupos parafiléticos (Figura 25), abarcando um grande número de espécies analisadas. Em contrapartida, o grupo *T. fabricator* aqui representado por *T. (Trypoxylon) johnsoni* e *T.*



*(Trypoxylon) asuncicola* (RICHARDS, 1934) corresponde a um grupo monofilético com base no gene COI.

Essas evidências mostram que à luz dos dados moleculares, a classificação que mais faz sentido é a elaborada por Richards (1934) ou ainda a análise das árvores feita com base nos complexos de espécies descritos por Coville (1982), pois se considerarmos apenas os grupos de espécies de Coville (1982), estaremos considerando grupos não monofiléticos na classificação. No entanto, ainda é necessário que sejam feitas revisões dos grupos de espécies, associando dados morfológicos e moleculares para que tenhamos uma classificação mais acurada desse grupo de vespas.

#### *4.4 Identificação molecular das espécies do gênero Trypoxylon*

Muitas vezes não é adequado atribuir a classificação de um organismo à sua identificação molecular. Isto se deve ao fato de que o conceito biológico de espécies definido por Mayr (1942) e amplamente utilizado por taxonomistas é diferente dos conceitos filogenéticos de espécies que consistem em “a menor agregação de populações (sexuadas) ou de linhagens (assexuadas) que é diagnosticável através de uma combinação exclusiva de modos de expressão dos caracteres nos indivíduos comparáveis” (NIXON; WHEELER, 1990), ou ainda, a definição mais atual de Groves e Grubb (2011) que consiste em “a menor população ou agrupamento de populações que apresentem diferenças hereditárias fixadas de outras populações ou agregações”.

Sendo assim, apesar de usarmos o conceito filogenético de espécies como base para as análises filogenéticas e coalescentes de delimitação e identificação de espécimes, utilizamos as unidades taxonômicas operacionais moleculares como identificação das entidades analisadas por não comprometer a nomenclatura vigente (GOLDSTEIN et al., 2000; BLAXTER et al., 2005).

Em todas as abordagens utilizadas, foi encontrado aproximadamente o mesmo número de unidades taxonômicas moleculares, variando de 39 a 52 MOTUs devido às incongruências entre as metodologias.

Para as análises de distância genética, considerar os grupos externos ou não considerá-los não afetou os nossos resultados; entretanto, identificamos que o valor de OT foi menor (3,80% e 3,88%) quando utilizamos todas as sequências de COI obtidas (n = 333) em comparação com a análise efetuada apenas com uma sequência por haplótipo (4,34% e 4,83%). Esses valores geraram uma diferença de duas MOTUs que correspondem às

sequências de *T. (Trypargilum) nitidum* e *T. (Trypargilum) colinum* obtidas do BOLD (Figura 29).

Quanto às análises de bPTP, a inclusão dos grupos externos resultou na redução do número de entidades analisadas, passando de 52 para 50, respectivamente. Essa diferença se deu devido às sequências de *T. (Trypoxylon) frigidum* que foram divididas em três entidades. A primeira delas agrupando os haplótipos de FriH1 a FriH4, a segunda correspondente aos haplótipos FriH8 e FriH9, e a terceira entidade representada pelos demais haplótipos identificados como da espécie *T. (Trypoxylon) frigidum* e o haplótipo FigH4 da espécie *T. (Trypoxylon) figulus*.

A análise de GMYC recuperou 45 entidades, porém o intervalo de confiança de 42 a 56 mostrou que os resultados se sobrepõem às demais análises e, apesar de haver algumas incongruências entre elas, a maioria das atribuições foram iguais.

Ao analisar o subgênero *Trypoxylon (Trypargilum)* observamos que, para os métodos de distância genética e GMYC, *T. (Trypargilum) aurifrons* e *T. (Trypargilum) sp6* correspondem a uma mesma MOTU; porém, para bPTP, *T. (Trypargilum) sp6* corresponde a uma MOTU diferente de *T. (Trypargilum) aurifrons*. Ao analisarmos os dados de outros genes produzidos nesse trabalho podemos ver que essas duas MOTUs apresentam pouca variação entre si - um sítio polimórfico em *pol*, cinco sítios polimórficos entre AurH1 e Sp6H2, e sete sítios polimórficos entre AurH1 e Sp6H1 (Figuras 10 e 15, Apêndices A e B) para o gene CytB, o que levanta a questão de representarem realmente uma única unidade taxonômica.

Os haplótipos OpaH1 e “C”H1 também foram agrupados como uma única unidade taxonômica pelos métodos de distância genética e pelo GMYC, porém as análises de bPTP indicaram que são entidades diferentes. Ao observar os dados de CytB em relação a essas sequências, é possível observar que não há muita variação entre elas (quatro sítios polimórficos entre OpaH1 e “C”H2); porém, pela rede de haplótipos constatamos a presença de dois *median vectors* entre *T. (Trypargilum) opacum* e o *T. (Trypargilum)* Morfotipo C, indicando que ainda faltam haplótipos intermediários para interligá-los (Figura 15 e Apêndice B).

Algo semelhante pode ser visto com os haplótipos Sp4H1 e “I”H1. Neste caso, a metodologia de distância genética considerou como sequências pertencentes à mesma MOTU, enquanto as metodologias filogenética e coalescente (bPTP e GMYC) separou-os em entidades diferentes (Figura 29). Os dados de CytB indicam que há 11 sítios polimórficos

entre os dois haplótipos e, comparando com os demais valores encontrados para o gene CytB, podemos considerá-lo um valor intermediário de substituições nucleotídicas.

Diferentemente, os espécimes *T. (Trypargilum) Morfotipo B* e *T. (Trypargilum) agamemnon* foram considerados MOTU diferentes em todas as metodologias. porém os dados de *pol* mostram que apresentam o mesmo haplótipo, exceto pela presença de uma substituição nucleotídica do tipo S (uma citosina por uma guanina) na posição 105. Em relação aos dados de variação nucleotídica para os genes CytB e COI entre *T. (Trypargilum) agamemnon* e *T. (Trypargilum) Morfotipo B*, vemos uma alta diversidade nucleotídica (0,05 e 0,06, respectivamente), levantando a questão se realmente são MOTUs diferentes.

Foram observadas também diferenças entre a delimitação de *T. (Trypargilum) colinum* e *T. (Trypargilum) nitidum* (sequências do BOLD) ao considerar todas as análises de delimitação de espécies realizadas. Os tipos genéticos Nit1 e Nit2 foram agrupados em uma mesma MOTU pelas análises de distância genética, porém para as análises de bPTP e GMYC, eles foram separados em entidades diferentes, corroborando a classificação em tipos genéticos realizada neste trabalho. O mesmo pode ser dito do haplótipo Nit3H1, que foi considerado uma única MOTU, como NitH5 (BOLD). O grupo Nitidum é extremamente diverso, apresentando o maior número de espécies do subgênero *Trypoxylon (Trypargilum)*. Trata-se de um grupo pouco definido na classificação de Bohart e Menke (1976) e Coville (1982), o que torna a identificação desses indivíduos difícil, gerando incongruências também reportadas aqui com base nos dados moleculares. Estas incongruências já haviam sido identificadas em estudo citogenético, no qual em uma mesma população, foram encontrados indivíduos com números cromossômicos diferentes, sugerindo que a espécie esteja em processo de isolamento reprodutivo e geração de novos táxons (SCHER; POMPOLO, 2003).

Outro exemplo é a espécie *T. (Trypoxylon) frigidum*, inclusa no grupo de espécies Figulus. Nesse grupo todas as espécies classificadas perderam os caracteres dos demais grupos de espécies do gênero *Trypoxylon* (SANDHOUSE, 1940), gerando dificuldade de identificação. As espécies analisadas por nós e identificadas como pertencentes ao grupo *T. (Trypoxylon) figulus* (Figura 25) apresentaram incongruências na delimitação de espécies, como o caso de *T. (Trypoxylon) pennsylvanicum* que foi considerada uma única MOTU pela análise de distância genética, enquanto que as análises bPTP e GMYC consideraram o haplótipo PenH1 como um entidade e PenH2 e PenH3 como outra entidade.

*T. (Trypoxylon) figulus* foi outro exemplo de espécie que foi dividida em três entidades pelas análises com bPTP sendo cada haplótipo (FigH1, FigH2 e FigH3)

considerado uma MOTU, enquanto que os métodos de distância e GMYC agruparam-os como uma única MOTU. O haplótipo FigH4 foi considerado em todas as análises como pertencente a MOTU representada pela maior quantidade de haplótipos de *T. (Trypoxylon) frigidum*. Ao blastar a sequência referente ao haplótipo FigH4 com as demais sequências de *T. (Trypoxylon) frigidum*, foi possível observar que FigH4 é exatamente o mesmo haplótipo de FriH11, podendo ser um caso de identificação errada no BOLD.

Outra incongruência de dados observada foi entre *T. (Trypoxylon) minus* e *T. (Trypoxylon) medium*. Nas análises de delimitação filogenética e coalescência representam entidades diferentes; nas análises de distância genética, representam uma única MOTU; quando utilizamos todas as sequências obtidas nesse trabalho e com a análise utilizando uma sequência por haplótipo, *T. (Trypoxylon) minus* e *T. (Trypoxylon) medium* corresponderam a um agrupamento juntamente com os haplótipos FigH1, FigH2 e FigH3.

A despeito da delimitação feita para *T. (Trypoxylon) punctivertex*, temos que todas as metodologias consideraram os tipos genéticos *T. (Trypoxylon) punctivertex1* e *T. (Trypoxylon) punctivertex2* como entidades diferentes, corroborando a divisão em tipos genéticos realizada no início deste trabalho.

## 5 Considerações finais

Ao dar início a este trabalho com a pergunta “A divisão subgenérica de *Trypoxylon* Latreille, 1796 (Hymenoptera: Crabronidae) é sustentada por marcadores moleculares?”, tínhamos como um dos propósitos aumentar o conhecimento acerca deste grupo de vespas para o qual encontrávamos na grande maioria, dados comportamentais de trabalhos relativamente antigos, mostrando a dificuldade de se trabalhar com um grupo extremamente diverso e com falta de especialistas em identificação desses organismos.

O nosso conhecimento se limitava à identificação de poucas espécies do subgênero *Trypoxylon (Trypargilum)* principalmente, e dados limitados sobre comportamento, parentesco e biologia de nidificação, pois todos os trabalhos que começavam a ser produzidos, apesar de muitas vezes apresentar uma boa amostragem de indivíduos, não havia como identificar os espécimes.

Nossos resultados contribuíram para o conhecimento genético desses organismos ao mostrarem que as espécies analisadas apresentam grande diversidade nucleotídica, principalmente para os genes mitocondriais, possibilitando que estes genes sejam utilizados como ferramentas para estudos de genética de populações, bem como para a

delimitação e identificação de espécies, sendo uma alternativa para as dificuldades aqui apontadas.

Quanto à divisão subgenérica de *Trypoxylon* elaborada por caracteres morfológicos e comportamentais, vimos que os genes *pol* e *CytB* corroboram a atual divisão, mas ainda deixam dúvidas quanto à acurácia dos dados por apresentar uma baixa amostragem de sequências do subgênero *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) no caso de *pol*. Ao concatenarmos os dados de *CytB* com COI, verificamos que a árvore filogenética produzida se torna robusta. Ao aumentarmos a amostragem com sequências obtidas do banco de dados para as análises com o gene COI foi possível corroborar a divisão subgenérica de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) e *Trypoxylon* (*Trypoxylon*).

Ademais, foi possível identificar que provavelmente o subgênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) representa mais de um clado, como já sugerido por Bohart e Menke (1976), Coville (1982) e Amarante (2005), mostrando a necessidade de que mais estudos com esses grupos sejam feitos incluindo dados morfológicos, comportamentais e moleculares.

Outra contribuição importante foi a estimativa do tempo de divergência realizada em nosso trabalho de que o gênero *Trypoxylon* provavelmente surgiu há cerca de 43 milhões de anos no período Eoceno, enquanto que a divergência entre os subgêneros ocorreu entre os períodos Eoceno e Oligoceno, há cerca de 36,5 milhões de anos. Não há registro semelhante na literatura que diz respeito ao gênero *Trypoxylon*, constituindo séria lacuna em nosso conhecimento sobre a evolução de um grupo extremamente importante na descendência de abelhas.

Também foi possível verificar que a divisão em grupos de espécies dentro de cada subgênero não é completamente corroborada pelos dados moleculares. Nossos achados indicaram que a classificação que aparenta fazer mais sentido é a proposta por Richards (1934); no entanto, enquanto alguns grupos são monofiléticos, como no caso de *T. albitarse* e *T. fabricator*, outros são polifiléticos como *T. nitidum* e *T. figulus*. Ainda há o caso de *T. punctulatum*, o qual pode vir a ser um grupo monofilético se a espécie sem identificação presente nesse clado for classificada como pertencente a ele.

Este trabalho possibilitou ainda que uma diversidade maior de espécies fosse amostrada e analisada molecularmente, graças às parcerias para coletas em diversas regiões brasileiras, o que culminou na amostragem e análise molecular de diversos morfotipos ainda não identificados pela classificação recorrente e que passaram por análises de delimitação e

identificação de espécimes, gerando uma estimativa de que foram analisadas de 39 a 52 unidades taxonômicas moleculares nesse trabalho.

As análises de delimitação de espécies mostraram que existem algumas incongruências entre as metodologias utilizadas, porém as maiores dificuldades de identificação se assemelham às dificuldades encontradas na classificação dos organismos do gênero *Trypoxylon*, em especial aqueles que estão inclusos em grupos diversos e pouco delimitados pelo fato de hoje em dia as características que identificam as espécies serem muito variadas, o que sugere fortemente a necessidade de revisão do grupo.

Outra barreira vencida foi a padronização de marcadores moleculares mitocondriais e nucleares para esse grupo, abrindo caminho para que novos trabalhos de genética de populações sejam feitos ampliando ainda mais o conhecimento do grupo não só molecularmente, como também em outras áreas. Pois, as análises aqui realizadas demonstraram que unindo a informação de diversos genes é possível chegar a delimitações de espécies. No entanto, acreditamos que associar dados de caracteres morfológicos a essa metodologia, possibilitará uma maior acurácia dos resultados, chegando a identificações mais seguras, que nos possibilitarão desenvolver estudos para entender como se deu a grande diversificação desse grupo que ocupa tantas regiões de climas variados do planeta.

## 6 Referências bibliográficas

ABOUHEIF, E.; WRAY, G. A. Evolution of the gene network underlying wing polyphenism in ants. *Science*, v. 297, p. 249-252, 2002.

ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; CONTE, H. Controle biológico por insetos parasitoides em culturas agrícolas no Brasil: Revisão de literatura. *Revista UNINGÁ Review*, v. 22, n. 2, p. 22-25, 2015.

AGUIAR A. P.; DEANS, A. R.; ENGEL, M. S.; FORSHAGE, M.; HUBER, J. T.; JENNINGS, J. T.; JOHNSON, N. F.; LELEJ, A. S.; LONGINO, J. T.; LOHRMANN, V.; MIKÓ, I.; OHL, M.; RASMUSSEN, C.; TAEGER, A.; KI YU, D. Y. S. Order Hymenoptera. *Zootaxa*, v. 3703, p. 1–82, 2013.

ALCOCK, J.; BARROWS, E. M.; GORDH, G.; HUBBARD, L. J.; KIRKENDALL, L.; PYLE, D. W.; PONDER, T. L.; ZALOM, F. G. The ecology and evolution of male reproductive behaviour in the bees and wasps. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 64, p. 293-326, 1978.

ALEXANDER, B. A. An exploratory analysis of cladistic relationships within the superfamily Apoidea, with special reference to sphecid wasps (Hymenoptera). *Journal of Hymenoptera Research*, v. 1, p. 25–61, 1992.

ALMEIDA, J. C. Biologia de nidificação e estrutura sociogenética de ninhos de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera: Crabronidae): comportamento de guarda do macho e paternidade. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2010.

ALMEIDA, J. C.; BERGAMASCHI, A. C. B.; SANCHEZ, A.; HATANAKA, T.; DEL LAMA, M. A. A Isolation and characterization of microsatellite loci for the mud-dauber wasp *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius, 1804 (Hymenoptera: Crabronidae). *European Journal of Entomology*, v. 110, p. 541-543, 2013.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, p. 403-410, 1990.

AMARANTE S. T. P. Biologia e comportamento reprodutivo de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* F. (Hymenoptera: Sphecidae). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 1991a.

AMARANTE S. T. P. Three new Neotropical species of *Trypoxylon (Trypargilum)* (Hymenoptera, Sphecidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 35, p. 429-437, 1991b.

AMARANTE S. T. P. A synonymic catalog of the Neotropical Crabronidae and Sphecidae (Hymenoptera, Apoidea). *Arquivos de Zoologia*, v. 37, p. 1-139, 2002.

AMARANTE, S. T. P. On the Systematics of *Trypoxylon scrobiferum* Richards and *T. anapaikae* Amarante with the recognition of a new species group in the subgenus *Trypoxylon* (Hymenoptera: Crabronidae: Trypoxylini). *Papéis Avulsos de Zoologia*, v. 45, p. 91-101, 2005.

ARAÚJO, S. M. S. R.; POMPOLO, S. G.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J. P. M. Integration of a B chromosome into the A genome of a wasp. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 268, p. 1475-1478, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ESTUDO DAS ABELHAS. Abelhas e Polinização. 2018. Disponível em: <http://abelha.org.br/abelhas-e-a-polinizacao/>. Acesso em: 1 de maio de 2018.

AVISE, J. C. *Molecular markers, natural history and evolution*. Londres: Chapman & Hall, 1994.

BERGAMASCHI, A. C. B. Comportamento reprodutivo de espécies de *Trypargilum* e análises de parentesco genético intranidal e genética de populações de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera: Crabronidae). Tese de Doutorado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 2013.

BERGAMASCHI, A. C. B.; ALMEIDA, J. C.; CAMPOS, L. O.; DEL LAMA, M. A. Sociogenetic structure in nests of the mud dauber wasp *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera: Crabronidae). *European Journal of Entomology*, v. 112, p. 722-727, 2015.

BERGAMASCHI, A. C. B.; DEL LAMA, M. A. Gene variation and genetic differentiation among populations of the solitary mud dauber wasp *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera, Crabronidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 38, p. 519-523, 2015.

BLAXTER, M. Molecular systematics: counting angels with DNA. *Nature*, v. 421, p. 122–124, 2003.

BLAXTER, M.; MANN, J.; CHAPMAN, T.; THOMAS, F.; WHITTON, C.; FLOYD, R.; ABEBE, E. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 360, p. 1935-1943, 2005.

BOHART, R. M.; MENKE, A. S. *Sphecid Wasps of the World: a Generic Revision*. 1. Ed. Berkeley: University of California Press, 1976.

BOUCKAERT, R.; HELED, J.; KÜHNERT, D.; VAUGHAN, T.; WU, C-H.; XIE, D.; SUCHARD, M. A.; RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology*, v. 10, n. 4, e1003537, 2014.

BROCKMANN, H. J. Diversity in the nesting behavior of mud-daubers *Trypoxylon politum* Say (Sphecidae). *Florida Entomologist*, v. 63, p. 53-64, 1980.

BROCKMANN, H. J.; GRAFEN, A. Mate conflict and male behavior in a solitary wasp, *Trypoxylon (Trypargilum) politum* (Hymenoptera: Sphecidae). *Animal Behavior*, v. 37, p. 232-255, 1989.

BROTHERS, D. J. Phylogeny and classification of the aculeate Hymenoptera, with special reference to Mutillidae. *The University of Kansas Science Bulletin*, v. 50, p. 483-648, 1975.

BROTHERS, D. J. Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). *Zoologica Scripta*, v. 28, p. 233–249, 1999.

BROWN, S. D. J.; COLLINS, R. A.; BOYER, S.; LEFORT, M-C.; MALUMBRES-OLARTE, J.; VINK, C. J.; CRUICKSHANK, R. H. Spider: An R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, v. 12, p. 562-565, 2012.

BROWN, W. M.; PRAGER, E. M.; WANG, A.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA Sequences of Primates: Tempo and Mode of Evolution. *Journal of Molecular Evolution*, v. 18, p. 225-239, 1982.



BULL, J. J.; HUELSENBECK, J. P.; CUNNINGHAM, C. W.; SWOFFORD, D. L.; WADDEL, P. J. Partitioning and Combining Data in Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology*, v. 42, n. 3, p. 384-397, 1993.

BUSCHINI, M. L. T. Species diversity and community structure in trap-nesting bees in Southern Brazil. *Apidologie*, v. 37, p. 58-66, 2006.

BUSCHINI, M. L. T.; BERGAMASCHI, A. C. B. Strongly female-biased sex allocation in a trivoltine population of *Trypoxylon (Trypargilum) opacum* Brèthes (Hymenoptera, Crabronidae). *Acta Zoologica*, v. 91, p. 433-439, 2010.

BUSCHINI, M. L. T.; DONATTI, A. J. Nesting behavior of *Trypoxylon (Trypargilum) agamemnom* Richards (Hymenoptera: Crabronidae). *Brazilian Journal of Biology*, v. 72, p. 353-362, 2012.

BUSCHINI, M. L. T.; WOLF, L. L. Notes on the biology of *Trypoxylon (Trypargilum) opacum* Brèthes (Hymenoptera; Crabronidae) in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 66, p. 915-926, 2006.

CARPENTER, J. C.; WHEELER, W. C. Towards simultaneous analysis of morphological and molecular data in Hymenoptera. *Zoologica Scripta*, v. 28, p. 251-260, 1999.

CLEMENT, M.; SNELL, Q.; WALKER, P.; POSADA, D.; CRANDALL, K. TCS: Estimating gene genealogies. *Parallel and Distributed Processing Symposium, International Proceedings*, v. 2, 2002.

COLLINS, R. A.; CRUICKSHANK, R. H. The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resource*, v. 13, n. 6, p. 969-975, 2012.

COVILLE, R. E. Wasps of the genus *Trypoxylon* subgenus *Trypargilum* in the North America. Berkeley: University of California Press, 1982.

COVILLE, R. E.; GRISWOLD, C.; COVILLE, P. L. Notes on the habits of the spider hunting wasps *Trypoxylon lactitarse* Saussure, 1867 and *T. menkeanum* Coville, 1982 (Hymenoptera: Crabronidae) in Costa Rica. *The Pan-Pacific Entomologist*, v. 91, n. 3, p. 257-273, 2015.

CROZIER, R. H. Advanced eusociality, kin selection and male haploidy. *Australian Journal of Entomology*, v. 47, p. 2-8, 2008.

DANFORTH, B. N.; CARDINAL, S.; PRAZ, C.; ALMEIDA, E. A. B.; MICHEZ, D. The Impact of Molecular Data on Our Understanding of Bee Phylogeny and Evolution. *Annual Review of Entomology*, v. 58, p. 57-78, 2013.

DANFORTH, B. N.; FANG, J.; SIPES, S. 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*, v. 39, p. 358-372, 2006.

DEBEVEC, A. H.; CARDINAL, S.; DANFORTH, B. N. Identifying the sister group to the bees: a molecular phylogeny of Aculeata with an emphasis on the superfamily Apoidea. *Zoologica Scripta*, v. 41, p. 527-535, 2012.

DOWTON, M.; AUSTIN, A. J. Simultaneous analysis of 16S, 28S, COI and morphology in the Hymenoptera: Apocrita – evolutionary transitions among parasitic wasps. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 74, p. 87–111, 2001.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, v. 17, n. 6, p. 368-76, 1981.

FERNANDES-SALOMÃO, T. M.; ROCHA, R. B.; CAMPOS, L. A. O.; ARAÚJO, E. E. The first internal transcribed spacer (ITS-1) from *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis. *Insect Sociaux*, v. 52, p. 11-18, 2005.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, v. 3, p. 294–299, 1994.

FUJISAWA, T.; BARRACLOUGH, T. G. Delimiting Species Using Single-Locus Data and the Generalized Mixed Yule Coalescent Approach: A Revised Method and Evaluation on Simulated Data Sets. *Systematic Biology*, v. 62, n. 5, p. 707-724, 2013.

GOLDSTEIN, P.Z.; DESALLE, R.; AMATO, G.; VOGLER, A. P. Conservation genetics at the species boundary. *Conservation Biology*, v. 14, p. 120–131, 2000.

GOMES, L. F.; POMPOLO, S. G.; CAMPOS, L. A. O. Cytogenetic analysis of three species of *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) (Hymenoptera, Sphecidae, Larrinae). *Revista Brasileira de Genética*, v. 18, p. 173-176, 1995.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. *Evolution of the Insects*. Cambridge: Cambridge University Press, 2005.

GRISSEL, E. E. Hymenopteran Biodiversity: Some Alien Notions. *American Entomologist*, v. 45, n. 4, p. 235-244, 1999.

GROVES, C.; GRUBB, P. *Ungulate Taxonomy*. Baltimore: Johns Hopkins Press, 2011.

HALL, H. G. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMILTON, W. D. The Genetical Evolution of Social Behavior II. *Journal of Theoretical Biology*, v. 7, p. 17-52, 1964.

HANSON, P. E.; MENKE, A. S. Las avispa apoideas: Ampulicidae, Sphecidae, Crabronidae. In: HANSON, P. E.; GAULD, I. D. (Eds). *Hymenoptera de la Region Neotropical*. *Memoirs of the American Entomological Institute*, v. 77, p. 694–733, 2006.

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

HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 41, p. 4812–4817, 2004.

HERRON, J. C.; FREEMAN, S. The Evolution of Social Behavior. In: *Evolutionary Analysis*. 15. Ed. Person, p. 455-490, 2014.

HILLIS, D. M. Molecular versus morphological approaches to systematics, *Annual. Review of Ecology and Systematic*, v. 18, p. 23-42, 1987.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. The importance of ants. In: *The ants*. 1. Ed. Cambridge: Harvard University Press, p. 1-5, 1990.

HUELSENBECK, J. P.; BULL, J. J.; CUNNINGHAM, C. W. Combining data in phylogenetic analysis. *TREE*, v. 11, n. 4, 153-158, 1996.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, v. 17, p. 754–755, 2001.

JONES, M.; GHOORAH, A.; BLAXTER, M. JMOTU and Taxonerator: turning DNA barcode sequences into annotated operational taxonomic units. *PLoS ONE*, v. 6, n. 4, e19259, 2011.

KALTENPOTH, M.; CORNELI, P. S.; DUNN, D. M.; WEISS, R. B.; STROHM, E.; SEGER, J. Accelerated Evolution of Mitochondrial but Not Nuclear Genomes of Hymenoptera: New Evidence from Crabronid Wasps. *PLoS One*, v. 7, n. 3, e32826, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0032826

KIMURA, M. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 78, n. 1, p. 454-458, 1981.

KLEIN A. M.; STEFFAN-DEWENTER, I.; BUCHORI, D.; TSCHARNTKE, T. Effects of land-use intensity in tropical agroforestry systems on coffee flower-visiting and trap-nesting bees and wasps. *Conservation Biology*, v. 16, p. 1003–1014, 2002.

KLUGE, A.G. A concern for evidence, and a phylogenetic hypothesis of relationships among *Epicrates* (Boidae, Serpentes). *Systematic Zoology*, v. 38, p. 7-25, 1989.

KNOWLTON, N.; WEIGT, L. A. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 265, p. 2257–2263, 1998.

KROMBEIN K. V. Trap-nesting wasps and bees: life histories, nests and associates. Washington: Smithsonian Press, 1967.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016. doi: 10.1093/molbev/msw054

LANAVE, C.; PREPARATA, G.; SACCONI, C.; SERIO, G. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *Journal of Molecular Evolution*, v. 20, n. 1, p. 86-96, 1984.

LANFEAR, R.; CALCOTT, B.; HO, S. Y. W.; GUINDON, S. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, v. 29, p. 1695-1701, 2012.

LIBRADO P.; ROZAS J. DnaSP v7.1.2: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

LOHRMANN, V.; OHL, M.; BLEIDORN, C.; PODSIALOWSKI, L. Phylogenie der "Sphecidae" (Hymenoptera: Apoidea) basierend auf molekularen Daten. *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie*, v. 16, p. 99–102, 2008.

LOMHOLDT, O. On the origin of the bees (Hymenoptera: Apidae, Sphecidae). *Entomologica Scandinavica*, v. 13, p. 185–190, 1982.

LOPES, S. G. B. C.; CHOW HO, F. F. Panorama histórico da classificação dos seres vivos e os grandes grupos dentro da proposta atual de classificação. USP/Univesp: Licenciatura em Ciências, 2018. Disponível em: <<http://eaulas.usp.br/portal/video.action?idItem=1615>>. Acesso em: 4 de fevereiro de 2018.

MACHADO, C. A.; JOUSSELIN, E. KJELLBERG, F.; COMPTON, S. G.; HERRE, E. A. Phylogenetic relationships, historical biogeography and character evolution of five-pollinating wasps. *Proceedings of the Royal Society*, v. 268, p. 685-694, 2001.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. *Microrganismos e Microbiologia*. In: *Microbiologia de Brock*. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 1-24, 2016.

MAGNACCA, K. N.; BROWN, M. J. Mitochondrial heteroplasmy and DNA barcoding in Hawaiian *Hylaeus* (Nesoprosopis) bees (Hymenoptera: Colletidae). *BMC Evolutionary Biology*, v. 10, p. 1-16, 2010.

MATTHEWS, R. W.; MATTHEWS, J. R. A note on *Trypargilum arizonense* in trap nests from Arizona, with a review of prey preferences and cocoon structure in the genus. *Psyche*, v. 75, p. 285-293, 1968.

MAYR, E. *Systematics and the Origin of Species from the Viewpoint of a Zoologist*. Nova Iorque: Columbia University Press, 1942.

MELO G. A. R. Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera), with emphasis on the crabronid wasps. Scientific Papers - Natural History Museum The University of Kansas, v. 14, p. 1–55, 1999.

MELO, G. A. R. Comportamento social em vespas da família Sphecidae (Hymenoptera, Apoidea). In: MARTINS, R.; LEWINSOHN, T. M.; BARBEITOS, M. S. (Eds). Ecologia e comportamento de insetos. Oecologia Brasiliensis, v. 8, p. 85-130, 2000.

MEUSEL, M. S.; MORITZ, R. F. Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. Current Genetics, v. 24, p. 539–543, 1993.

MEYER, C.; PAULAY, P. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. PLoS Biology, v. 3, n. 12, p. e422, 2005.

MICHENER C. D. Comparative external morphology, phylogeny, and a classification of the bees (Hymenoptera). Bulletin of the American Museum of Natural History, v. 82, p. 151-326, 1944.

MICHENER, C. D. A review of the tribes Diphaglossini and Dissoglottini (Hymenoptera, Colletidae). University of Kansas Science Bulletin, v. 53, p. 183-214, 1986.

MICHENER, C. D. The bees of the world. 2. Ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2007.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), Nova Orleans, Los Angeles, p. 1-8, 2010.

MIYAMOTO, M. M.; FITCH, W. M. Testing the Covarion Hypothesis of Molecular Evolution. Molecular Biology and Evolution, v. 12, n. 3, p. 503-513, 1995.

MONAGHAN, M.; WILD, R.; ELLIOT, M.; FUJISAWA, T.; BALKE, M.; INWARD, D. J. G.; LEES, D. C.; RAVANAIVOSOLO, R.; EGGLETON, P.; BARRACLOUGH, T. G.; VOGLER, A. P. Accelerated Species Inventory on Madagascar Using Coalescent-Based Models os Species Delineation. Systematic Biology, v. 53, p. 298-311, 2009.

MOREIRA, P. A. Morfologia do sistema reprodutor masculino e aspectos do comportamento reprodutivo de *Trypoxylon (Trypargilum)* (Hymenoptera: Crabronidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2007.

MORITZ, C. DOWLING, T. E.; BROWN, W. M. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. Annual Review of Ecology and Systematics, v. 18, p. 269-292, 1987.

MÜLLER J. Lichenum species et varietates novae. Flora (Regensburg), v. 55, p. 497-508, 1872.

NIXON, K. C.; WHEELER, Q. D. An Amplification of the Phylogenetic Species Concept. *Cladistics*, v. 6, p. 211–223, 1990.

OHL M.; BLEIDORN C. The phylogenetic position of the enigmatic wasp family Heterogynaidae based on molecular data, with description of a new, nocturnal species (Hymenoptera: Apoidea). *Systematic Entomology*, v. 31, p. 321-337, 2006.

PERUQUETTI, R. C. Aspectos da biologia, estrutura populacional e parentesco intranidal em vespas do gênero *Trypoxylon* (Hymenoptera: Sphecidae). Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2003.

PERUQUETTI, R. C. Use of trap nests with a Neotropical mud-dauber, *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *albitarse* Fabricius, 1804 (Hymenoptera: Sphecidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, v. 78, p. 84-87, 2005.

PERUQUETTI, R. C.; DEL LAMA, M. A. Alocação sexual e seleção sexo-dependente para tamanho de corpo em *Trypoxylon rogenhoferi* Kohl (Hymenoptera, Sphecidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 47, p. 581-588, 2003.

PETERS, R. S.; KROGMANN, L.; MAYER, C.; DONATH, A.; GUNKEL, S.; MEUSEMANN, K.; KOZLOV, A.; PODSIADLOWSKI, L.; PETERSEN, M.; LANFEAR, R.; DIEZ, P. A.; HERATY, J.; KJER, K. M.; KLOPFSTEIN, S.; MEIER, R.; POLIDORI, C.; SCHMITT, T.; LIU, S.; ZHOU, X.; WAPPLER, T.; RUST, J.; MISOF, B.; NIEHUIS, O. Evolutionary History of the Hymenoptera. *Current Biology*, v. 27, p. 1013-1018, 2017.

PILGRIM, E. F.; VON DOHLEN, C. D.; PITTS, J. P. Molecular phylogenetics of Vespoidea indicate paraphyly of the superfamily and novel relationships of its component families and subfamilies. *Zoologica Scripta*, v. 37, p. 539–560, 2008.

PONS, J.; BARRACLOUGH, T. G.; GOMEZ-ZURITA, J.; CARDOSO, A.; DURAN, D. P.; HAZELL, S.; KAMOUN, S.; SUMLIN, W. D.; VOGLER, A. P. Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Systematic Biology*, v. 55, p. 595-609, 2006.

POSADA D. Using MODELTEST and PAUP\* to Select a Model of Nucleotide Substitution. *Current Protocols in Bioinformatics*. Capítulo 6: Unidade 6.5, 2003.

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, v. 25, p. 1253-1256, 2008.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*, v. 53, n. 5, p. 793-808, 2004.

PRENTICE, M. A. The Comparative Morphology and Phylogeny of Apoid Wasps (Hymenoptera: Apoidea). 1998. Tese de Doutorado, University of California, Berkeley, California, 1998.

PRETENCE, M. A.; PONAIR, J. R. O. Three Species of *Trypoxylon* Latreille from Dominican Amber (Hymenoptera: Sphecidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, v. 66, n. 3, p. 280-291, 1993.

PULAWSKY W. J. Catalog of Sphecidae. Disponível em: <<https://www.calacademy.org/scientists/projects/catalog-of-sphecidae>>. Acesso em: 5 de janeiro de 2018.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria : the R Foundation for Statistical Computing. ISBN: 3-900051-07-0. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. 2011.

RASNITSYN, A. P. An outline of evolution of hymenopterous insects (order Vespida). *Oriental Insects*, v. 22, p. 115–145, 1988.

RICHARDS, O. W. The American species of the genus *Trypoxylon*. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, v. 82, p. 173-362, 1934.

ROBERTSON, D.; WILLIAMS, G. H. *Clinical and translational science: principles of human research*. Nova Iorque: Oxford University Press, 2009.

RODRÍGUEZ, F.; OLIVER, J. L.; MARÍN, A.; MEDINA, J. R. The general stochastic model of nucleotide substitution, *Journal of Theoretical Biology*, v. 142, n. 4, p. 485-501, 1990.

RONQUIST, F. Phylogeny of the Hymenoptera (Insecta): The state of the art. *Zoologica Scripta*, v. 28, p. 3-11, 1999.

RONQUIST, F.; RASNITSYN, A. P.; ROY, A.; ERIKSSON, K.; LINDGREN, M. Phylogeny of the Hymenoptera: A cladistic reanalysis of Rasnitsyn's (1988) data. *Zoologica Scripta*, v.28, p. 13-50, 1999.

ROSA, B. B. Revisão taxonômica e análise filogenética das espécies neotropicais do gênero *Psenulus* Kohl, 1897 (Hymenoptera, Crabronidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 2015.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. *Perspectivas na Filogenia dos Invertebrados*. In: *Zoologia dos invertebrados*. 6. Ed. São Paulo: Roca, p. 910-925, 1996.

SACCONE, C.; DE GIORGI, C.; GISSI, C.; PESOLE, G.; REYES, A. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, v. 238, p. 195–209, 1999.

SANDHOUSE G. A. A review of the Nearctic Wasps of the Genus *Trypoxylon* (Hymenoptera: Sphecidae). *American Naturalist*, v. 24, p. 133-176, 1940.

SANTONI, M. M. Biologia de Nidificação e Estrutura Sociogenética Intranidal em Espécies de *Trypoxylon* (Hymenoptera: Crabronidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2008.

SANTONI, M. M.; BRESCOVIT, A. D.; DEL LAMA, M. A. Ocupação diferencial do habitat por vespas do gênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) Latreille (Hymenoptera, Crabronidae). Revista Brasileira de Entomologia, v. 53, p. 107-114, 2009.

SANTONI, M. M.; DEL LAMA, M. A. Nesting biology of the trap-nesting Neotropical wasp *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *aurifrons* Shuckard (Hymenoptera, Crabronidae). Revista Brasileira de Entomologia, v. 51, p. 369-376, 2007.

SCHER, R.; POMPOLO, S. G. Evolutionary dynamics of the karyotype of the wasp *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *nitidum* (Hymenoptera, Sphecidae) from the Rio Doce State Park, Minas Gerais, Brazil. Genetics and Molecular Biology, v. 26, n. 3, p. 307-311, 2003.

SHARKEY, M. J. Phylogeny and classification of Hymenoptera. Zootaxa, v. 1668, p. 521–548, 2007.

SHARKEY, M. J.; CARPENTER, J. M.; VILHELMSSEN, L.; HERATY, J.; LILJEBLAD, J.; DOWLING, A. P. G.; SCHULMEISTER, S.; MURRAY, D.; DEANS, A. R.; RNQUIST, F.; KROGMANN, L.; WHEELER, W. C. Phylogenetic relationships among superfamilies of Hymenoptera. Cladistics, v. 28, p. 80-112, 2012.

SIMMONS, R. B.; WELLER, S. J. Utility and evolution of cytochrome b in insects. Molecular Phylogenetics Evolution, v. 20, n. 2, p. 196-210, 2001.

SONG, H.; MOULTON, M. J.; WHITING, M. F. Rampant nuclear insertion of mtDNA across diverse lineages within Orthoptera (Insecta). PLoS One, v. 9, p. e110508, 2014.

STAMATAKIS, A.; HOOVER, P.; ROUGEMONT, J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. Systematic Biology, v. 57, p. 758–771, 2008.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution, v. 10, n. 3, p. 512-26, 1993. DOI:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023

TAVARÉ, S. Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences. Lectures on Mathematics in the Life Sciences, v. 17, 1986.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, v. 22, p. 4673–4680, 1994.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. O Mundo Microbiano e Você. In: Microbiologia. 10. Ed. Porto Alegre: Artmed, p. 1-25, 2012.



TTSCHARNTKE, T.; GATHMANN, A.; STEFFAN-DEWENTER, I. Bioindication using trap-nesting bees and wasps and their natural enemies: Community structure and interactions. *Journal of Applied Ecology*, v. 35, p. 708–719, 1998.

VILHELMSSEN, L.; MIKÓ, I.; KROGMANN, L. Beyond the wasp-waist: structural diversity and phylogenetic significance of the mesosoma in apocritan wasps (Insecta: Hymenoptera). *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 159, p. 22–194, 2010.

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, v. 10, p. 506-513, 1991.

WARD, P. S.; DOWINIE, D. A. The ant subfamily Pseudomyrmecinae (Hymenoptera: Formicidae): phylogeny and evolution of big-eyed arboreal ants. *Systematic Entomology*, v. 30, p. 310-335, 2005.

WILSON, A. C.; CANN, R. L.; CARR, A. M.; GEORGE, M.; GYLLENSTEN, U. B.; HELM-BYCHOWSKI, K. M.; HIGUCHI, R. G.; PALUMBI, S. R.; PRAGER, E. M.; SAGE, R. D.; STONEKING, A. M. Mitochondrial DNA and two perspective on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 26, p. 375-400, 1985.

ZHANG, A. B.; MUSTER, C.; LIANG, H. B. A fuzzy-set-theory-based approach to analyse species membership in DNA barcoding. *Molecular Ecology*, v. 21, p. 1848–1863, 2012.

ZHANG, D.-X.; HEWITT, G. M. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial primers in insects. *Insect Molecular Biology*, v. 6, p. 143–150, 1997.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A: DIVERSIDADE NUCLEOTÍDICA (DIAGONAL INFERIOR) E NÚMERO DE SÍTIOS POLIMÓRFICOS (DIAGONAL SUPERIOR) ENTRE ESPÉCIES ANALISADAS PARA A REGIÃO NUCLEAR *POL*, DEMONSTRANDO OS HAPLÓTIPOS UTILIZADOS PARA TAL ANÁLISE. OS VALORES EM NEGRITO REPRESENTAM A DIVERSIDADE NUCLEOTÍDICA INTRAESPECÍFICA.**

	Sp7 H1	Sp2 H1	Sp6 H1	“A” H1	“B” H1	“C” H1	“I” H1	“J” H1	AlbH1	AurH1	LacH2	NitH1	RogH1	AgaH1	PunH1
Sp7 H1	<b>0,0000</b>	48	29	16	20	23	22	23	41	28	6	20	6	20	71
Sp2 H1	0,0623	<b>0,0000</b>	38	44	43	38	36	38	49	37	45	36	50	44	64
Sp6 H1	0,0376	0,0493	<b>0,0000</b>	24	26	8	9	7	34	1	32	9	31	27	66
“A” H1	0,0208	0,0571	0,0311	<b>0,0000</b>	14	18	17	18	2	23	21	15	20	15	67
“B” H1	0,0259	0,0558	0,0337	0,0182	<b>0,0000</b>	20	19	19	34	25	23	17	22	1	68
“C” H1	0,0298	0,0493	0,0104	0,0233	0,0259	<b>0,0000</b>	2	2	30	7	26	3	25	21	62
“I” H1	0,0285	0,0467	0,0117	0,0220	0,0246	0,0026	<b>0,0000</b>	3	29	8	25	2	24	20	60
“J” H1	0,0298	0,0493	0,0091	0,0233	0,0246	0,0026	0,0039	<b>0,0000</b>	30	6	26	3	25	21	62
AlbH1	0,0532	0,0636	0,0441	0,0026	0,0441	0,0389	0,0376	0,0389	<b>0,0039</b>	35	40	27	43	35	73
AurH1	0,0363	0,0480	0,0013	0,0298	0,0324	0,0091	0,0104	0,0078	0,0454	<b>0,0000</b>	31	8	30	26	65
LacH2	0,0078	0,0584	0,0415	0,0272	0,0298	0,0337	0,0324	0,0337	0,0519	0,0402	<b>0,0013*</b>	23	7	23	72
NitH1	0,0259	0,0467	0,0117	0,0195	0,0220	0,0039	0,0026	0,0039	0,0350	0,0104	0,0298	<b>0,0000</b>	22	18	62
RogH1	0,0078	0,0649	0,0402	0,0259	0,0285	0,0324	0,0311	0,0324	0,0558	0,0389	0,0091	0,0285	<b>0,0000</b>	22	75
AgaH2	0,0259	0,0571	0,0350	0,0195	0,0013	0,0272	0,0259	0,0272	0,0454	0,0337	0,0298	0,0233	0,0285	<b>0,0013**</b>	69
PunH1	0,0921	0,0830	0,0856	0,0869	0,0882	0,0804	0,0778	0,0804	0,0947	0,0843	0,0934	0,0804	0,0973	0,0895	<b>0,0026**</b>

\* A diferença entre as sequências corresponde a uma região de *missing data* e a um sítio polimórfico.

\*\* A diferença entre as sequências corresponde a regiões de *missing data*.

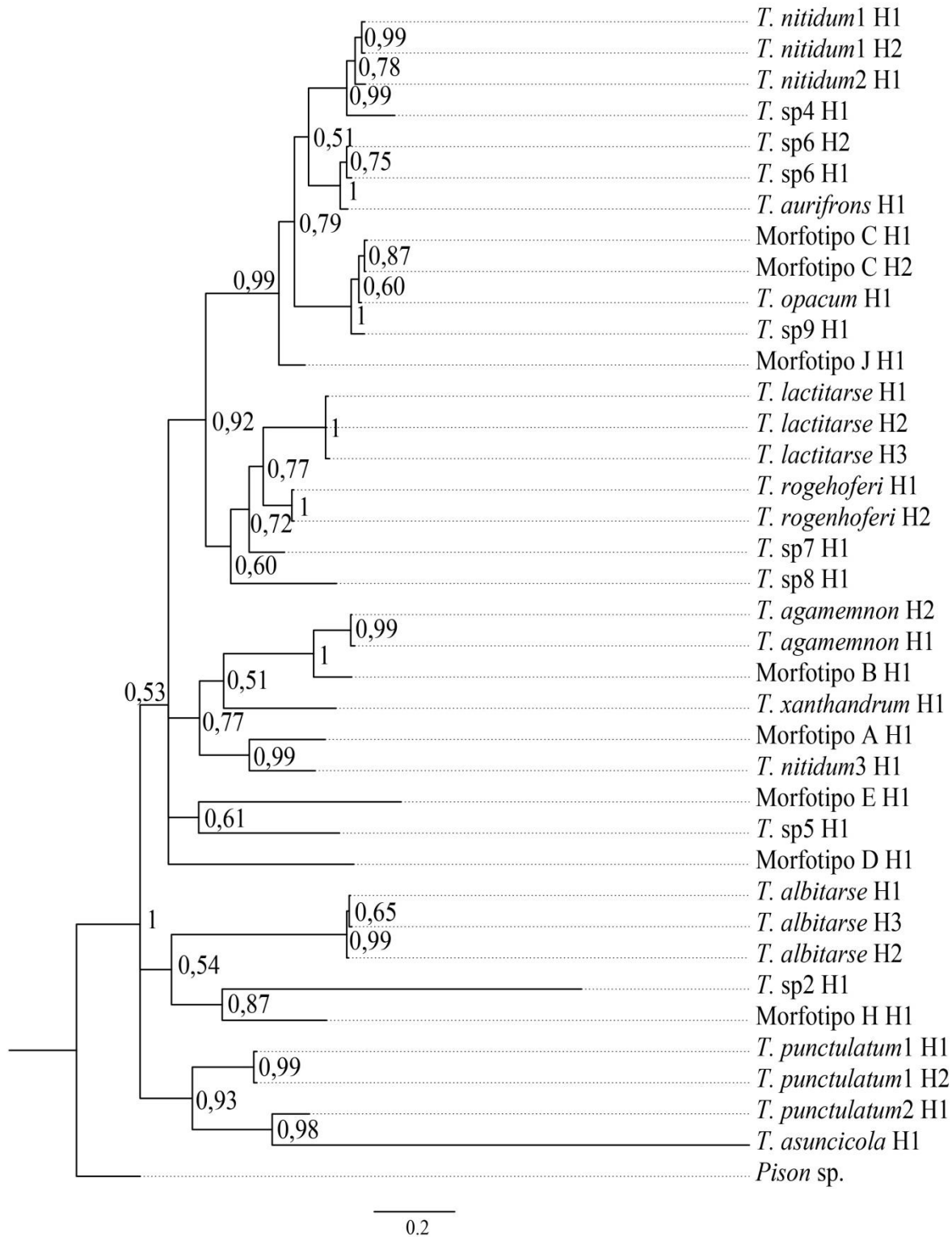
**APÊNDICE B: DIVERSIDADE NUCLEOTÍDICA PAR-A-PAR DAS SEQUÊNCIAS DO GENE CYTB DE AMOSTRAS DO GÊNERO *TRYPOXYLON*.**

	"A"H1	"B"H1	"C"H1	"D"H1	"E"H1	"H"H1	"I"H1	"J"H1	Sp2H1	Sp4H1	Sp5H1	Sp6H1	Sp7H1	Sp8H1
"A"H1														
"B"H1	0,176													
"C"H1	0,193	0,212												
"D"H1	0,244	0,230	0,211											
"E"H1	0,268	0,257	0,252	0,276										
"H"H1	0,227	0,195	0,203	0,245	0,281									
"I"H1	0,226	0,195	0,113	0,253	0,274	0,162								
"J"H1	0,183	0,160	0,089	0,215	0,258	0,146	0,096							
Sp2H1	0,354	0,352	0,313	0,348	0,328	0,242	0,295	0,287						
Sp4H1	0,225	0,182	0,116	0,248	0,274	0,168	0,026	0,096	0,298					
Sp5H1	0,220	0,218	0,201	0,237	0,238	0,199	0,232	0,193	0,316	0,224				
Sp6H1	0,175	0,177	0,094	0,216	0,241	0,167	0,101	0,068	0,276	0,103	0,212			
Sp7H1	0,176	0,176	0,148	0,186	0,219	0,173	0,153	0,121	0,324	0,152	0,195	0,137		
Sp8H1	0,159	0,184	0,187	0,251	0,242	0,186	0,183	0,153	0,337	0,180	0,214	0,177	0,134	
Sp9H1	0,191	0,212	0,028	0,230	0,270	0,210	0,094	0,094	0,325	0,102	0,211	0,099	0,151	0,194
AgaH1	0,180	0,089	0,213	0,228	0,272	0,214	0,202	0,187	0,365	0,196	0,247	0,206	0,193	0,209
AlbH1	0,264	0,268	0,201	0,255	0,259	0,246	0,238	0,225	0,310	0,230	0,245	0,213	0,227	0,229
AsuH1	0,380	0,368	0,360	0,400	0,401	0,388	0,377	0,352	0,431	0,390	0,378	0,362	0,359	0,379
AurH1	0,184	0,175	0,099	0,219	0,251	0,165	0,098	0,066	0,276	0,101	0,216	0,016	0,135	0,174
LacH1	0,167	0,181	0,172	0,257	0,233	0,215	0,194	0,151	0,337	0,194	0,214	0,166	0,112	0,158
Nit1H1	0,203	0,181	0,102	0,216	0,248	0,149	0,053	0,079	0,259	0,053	0,223	0,073	0,147	0,170
Nit2H1	0,206	0,175	0,105	0,221	0,243	0,164	0,058	0,082	0,269	0,061	0,225	0,078	0,152	0,156
Nit3H1	0,136	0,203	0,195	0,226	0,269	0,220	0,224	0,189	0,375	0,224	0,199	0,201	0,188	0,185
RogH1	0,141	0,155	0,141	0,215	0,217	0,176	0,152	0,117	0,294	0,152	0,188	0,123	0,073	0,145
Pun1H1	0,222	0,210	0,193	0,226	0,220	0,169	0,192	0,169	0,266	0,188	0,203	0,174	0,174	0,206
Pun2H1	0,261	0,220	0,233	0,242	0,235	0,174	0,213	0,208	0,259	0,213	0,190	0,213	0,212	0,230
OpaH1	0,191	0,208	0,012	0,213	0,257	0,210	0,110	0,094	0,317	0,113	0,201	0,101	0,150	0,187
XanH1	0,208	0,215	0,211	0,238	0,257	0,264	0,253	0,236	0,365	0,252	0,241	0,225	0,196	0,217

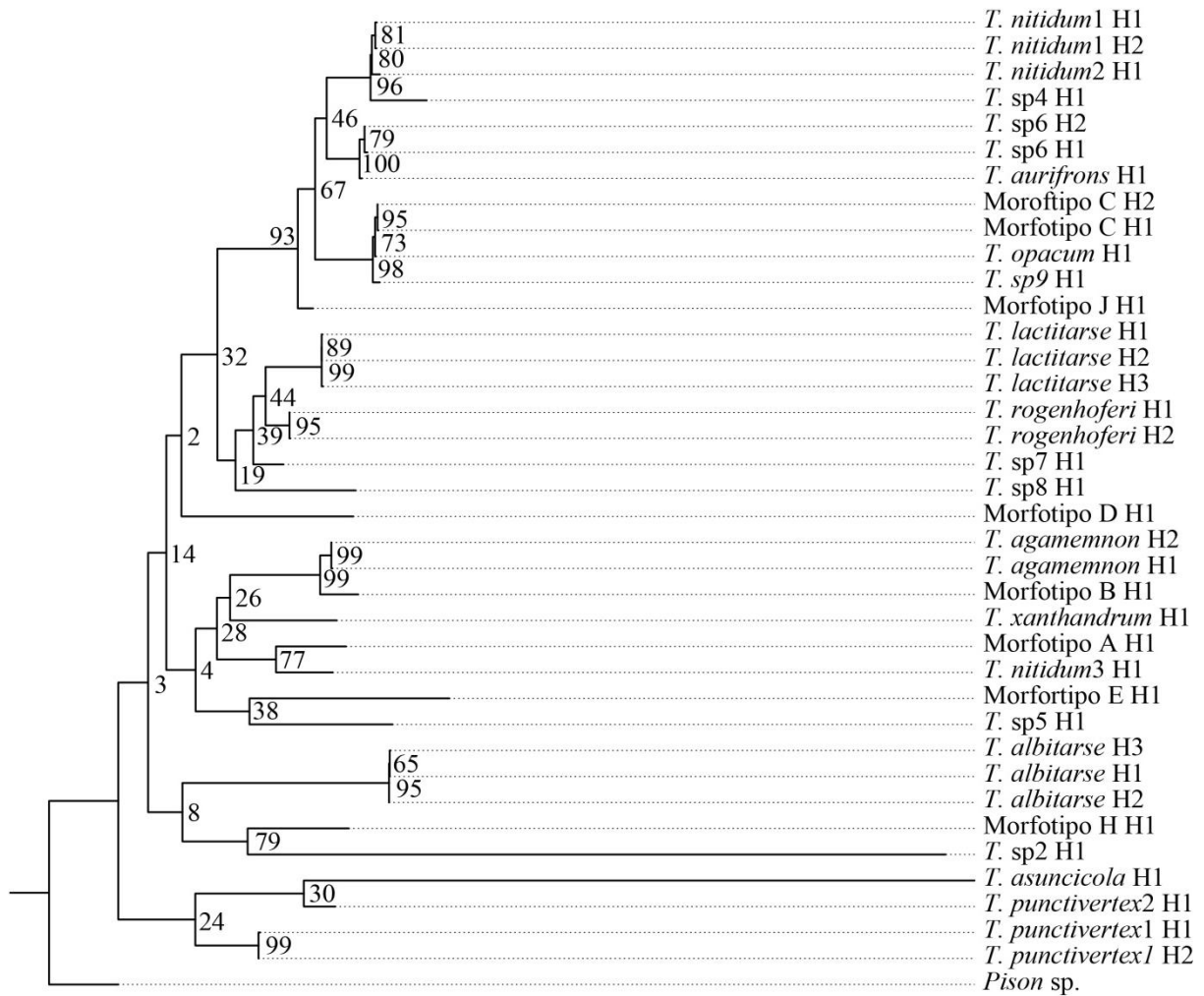
APÊNDICE B: CONTINUAÇÃO

	Sp9H1	AgaH1	AlbH1	AsuH1	AurH1	LacH1	Nit1H1	Nit2H1	Nit3H1	RogH1	Pun1H1	Pun2H1	OpaH1
"A"H1													
"B"H1													
"C"H1													
"D"H1													
"E"H1													
"H"H1													
"I"H1													
"J"H1													
Sp2H1													
Sp4H1													
Sp5H1													
Sp6H1													
Sp7H1													
Sp8H1													
Sp9H1													
AgaH1	0,217												
AlbH1	0,201	0,265											
AsuH1	0,358	0,399	0,334										
AurH1	0,099	0,209	0,207	0,362									
LacH1	0,172	0,190	0,257	0,408	0,164								
Nit1H1	0,100	0,196	0,224	0,385	0,071	0,175							
Nit2H1	0,099	0,196	0,220	0,368	0,076	0,178	0,019						
Nit3H1	0,200	0,211	0,266	0,366	0,210	0,199	0,210	0,213					
RogH1	0,150	0,183	0,232	0,375	0,120	0,091	0,132	0,140	0,178				
Pun1H1	0,193	0,214	0,226	0,343	0,178	0,213	0,166	0,175	0,216	0,164			
Pun2H1	0,240	0,240	0,243	0,314	0,223	0,225	0,199	0,202	0,229	0,211	0,139		
OpaH1	0,023	0,210	0,198	0,360	0,101	0,172	0,097	0,102	0,192	0,147	0,196	0,236	
XanH1	0,223	0,196	0,232	0,379	0,234	0,192	0,225	0,216	0,179	0,201	0,238	0,245	0,214

APÊNDICE C: ÁRVORE FILOGENÉTICA DO GÊNERO *TRYPOXYLON* ELABORADA COM A METODOLOGIA IB PARA SEQUÊNCIAS DE CYTB NÃO PARTICIONADAS.



**APÊNDICE D: ÁRVORE FILOGENÉTICA DO GÊNERO *TRYPOXYLON* ELABORADA COM A METODOLOGIA ML PARA SEQUÊNCIAS DE CYTB NÃO PARTICIONADAS.**



**APÊNDICE E: DIVERSIDADE NUCLEOTÍDICA PAR-A-PAR DAS SEQUÊNCIAS DO GENE COI DE AMOSTRAS DO GÊNERO *TRYPOXYLON*.**

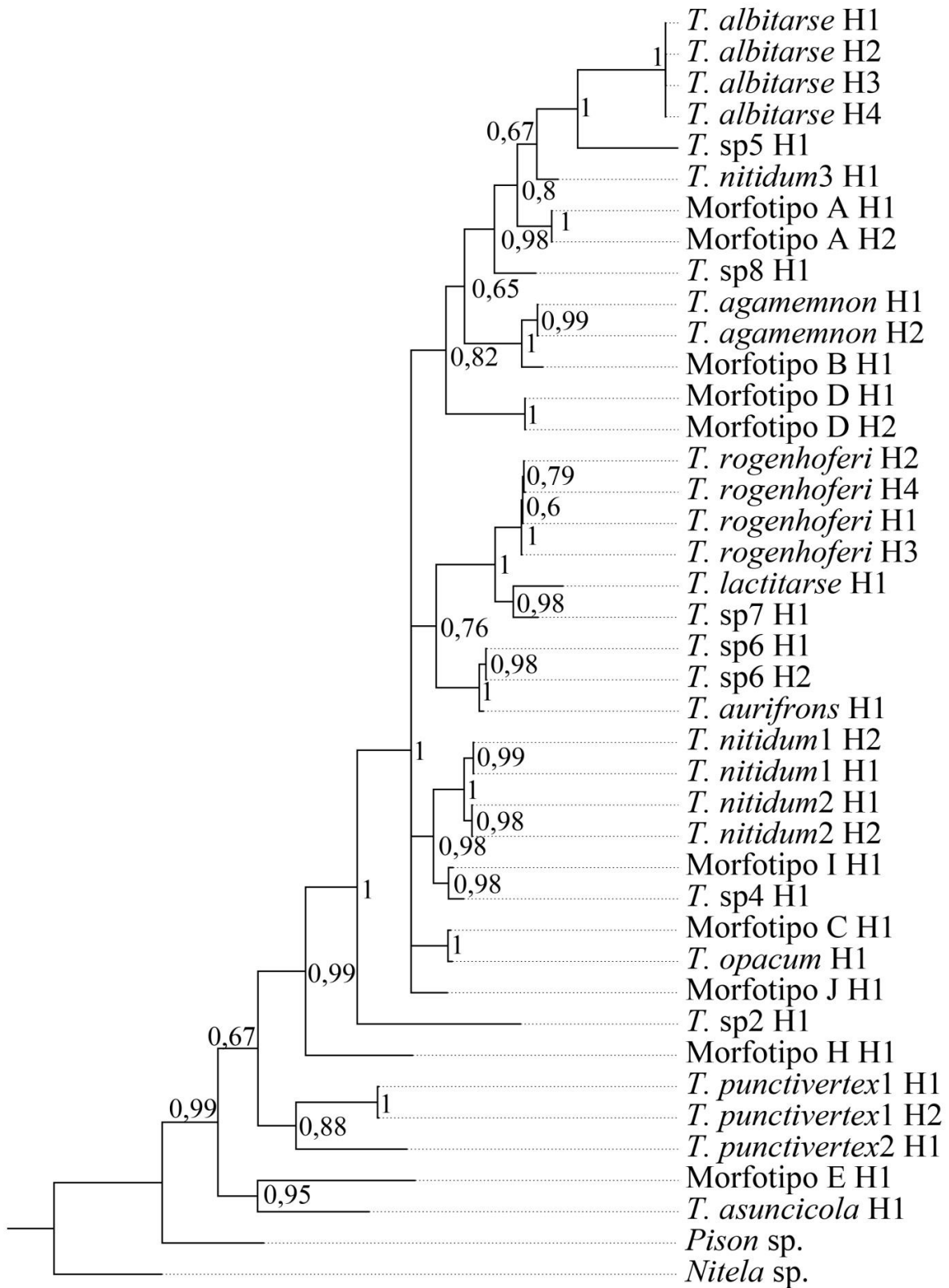
	AlbH1	AsuH1	"A"H1	"B"H1	"C"H1	"D"H1	"E"H1	"H"H1	"I"H1	"J"H1	Pun1H1	Pun2H1	Sp2H1	Sp4H1	Sp5H1
AlbH1															
AsuH1	0,236														
"A"H1	0,177	0,223													
"B"H1	0,193	0,224	0,143												
"C"H1	0,164	0,180	0,133	0,137											
"D"H1	0,190	0,213	0,161	0,159	0,144										
"E"H1	0,296	0,223	0,270	0,281	0,271	0,273									
"H"H1	0,257	0,185	0,220	0,234	0,183	0,232	0,261								
"I"H1	0,197	0,187	0,155	0,146	0,090	0,141	0,278	0,165							
"J"H1	0,177	0,191	0,153	0,142	0,097	0,155	0,255	0,173	0,081						
Pun1H1	0,249	0,174	0,216	0,220	0,175	0,235	0,220	0,165	0,180	0,152					
Pun2H1	0,295	0,191	0,221	0,239	0,177	0,247	0,249	0,168	0,174	0,186	0,148				
Sp2H1	0,262	0,229	0,240	0,239	0,185	0,245	0,325	0,187	0,178	0,182	0,201	0,196			
Sp4H1	0,210	0,204	0,151	0,148	0,099	0,159	0,290	0,163	0,038	0,094	0,191	0,172	0,193		
Sp5H1	0,193	0,241	0,170	0,203	0,172	0,203	0,266	0,245	0,170	0,183	0,234	0,245	0,244	0,174	
Sp6H1	0,158	0,181	0,149	0,150	0,096	0,168	0,247	0,168	0,100	0,092	0,159	0,183	0,180	0,104	0,167
Sp7H1	0,181	0,191	0,155	0,178	0,112	0,175	0,273	0,187	0,133	0,130	0,180	0,231	0,203	0,142	0,173
Sp8H1	0,172	0,188	0,104	0,143	0,119	0,162	0,271	0,206	0,126	0,123	0,215	0,225	0,225	0,124	0,167
AurH1	0,166	0,179	0,147	0,142	0,092	0,164	0,243	0,160	0,091	0,085	0,153	0,172	0,172	0,094	0,167
Nit1H1	0,191	0,200	0,151	0,139	0,099	0,159	0,276	0,159	0,072	0,092	0,165	0,179	0,170	0,074	0,183
Nit2H1	0,197	0,213	0,152	0,153	0,108	0,163	0,283	0,174	0,077	0,096	0,180	0,192	0,174	0,084	0,189
Nit3H1	0,158	0,227	0,108	0,138	0,151	0,165	0,249	0,233	0,175	0,152	0,225	0,263	0,250	0,175	0,172
RogH1	0,179	0,165	0,141	0,157	0,123	0,163	0,254	0,165	0,123	0,117	0,173	0,206	0,209	0,127	0,171
AgaH1	0,184	0,211	0,147	0,068	0,126	0,154	0,288	0,233	0,147	0,139	0,211	0,258	0,250	0,151	0,198
LacH1	0,186	0,218	0,164	0,175	0,146	0,187	0,277	0,220	0,152	0,138	0,214	0,234	0,238	0,152	0,197
OpaH1	0,172	0,186	0,147	0,145	0,023	0,161	0,273	0,183	0,090	0,103	0,183	0,190	0,188	0,107	0,177
Sp2H1-COT	0,237	0,220	0,192	0,190	0,153	0,221	0,306	0,178	0,126	0,138	0,197	0,221	0,203	0,128	0,201
Sp4H1-COT	0,241	0,224	0,196	0,194	0,157	0,225	0,311	0,182	0,130	0,142	0,202	0,226	0,207	0,132	0,205
XanH1	0,199	0,220	0,159	0,163	0,157	0,167	0,294	0,239	0,167	0,154	0,244	0,248	0,260	0,161	0,207

APÊNDICE E: CONTINUAÇÃO

	Sp6H1	Sp7H1	Sp8H1	AurH1	Nit1H1	Nit2H1	Nit3H1	RogH1	AgaH1	LacH1	OpaH1	Sp2H1-COT	Sp4H1-COT
AlbH1													
AsuH1													
"A"H1													
"B"H1													
"C"H1													
"D"H1													
"E"H1													
"H"H1													
"I"H1													
"J"H1													
Pun1H1													
Pun2H1													
Sp2H1													
Sp4H1													
Sp5H1													
Sp6H1													
Sp7H1	0,105												
Sp8H1	0,120	0,131											
AurH1	0,018	0,103	0,120										
Nit1H1	0,085	0,134	0,131	0,080									
Nit2H1	0,090	0,138	0,135	0,083	0,033								
Nit3H1	0,154	0,164	0,125	0,156	0,164	0,169							
RogH1	0,090	0,070	0,118	0,083	0,119	0,129	0,156						
AgaH1	0,131	0,149	0,142	0,124	0,147	0,148	0,143	0,141					
LacH1	0,130	0,086	0,152	0,130	0,156	0,164	0,153	0,095	0,163				
OpaH1	0,103	0,124	0,129	0,099	0,103	0,107	0,159	0,130	0,133	0,157			
Sp2H1-COT	0,118	0,155	0,166	0,116	0,120	0,132	0,213	0,141	0,183	0,186	0,149		
Sp4H1-COT	0,122	0,159	0,170	0,120	0,124	0,136	0,218	0,145	0,187	0,190	0,153	0,003	
XanH1	0,157	0,147	0,148	0,153	0,175	0,173	0,174	0,152	0,157	0,170	0,173	0,197	0,202

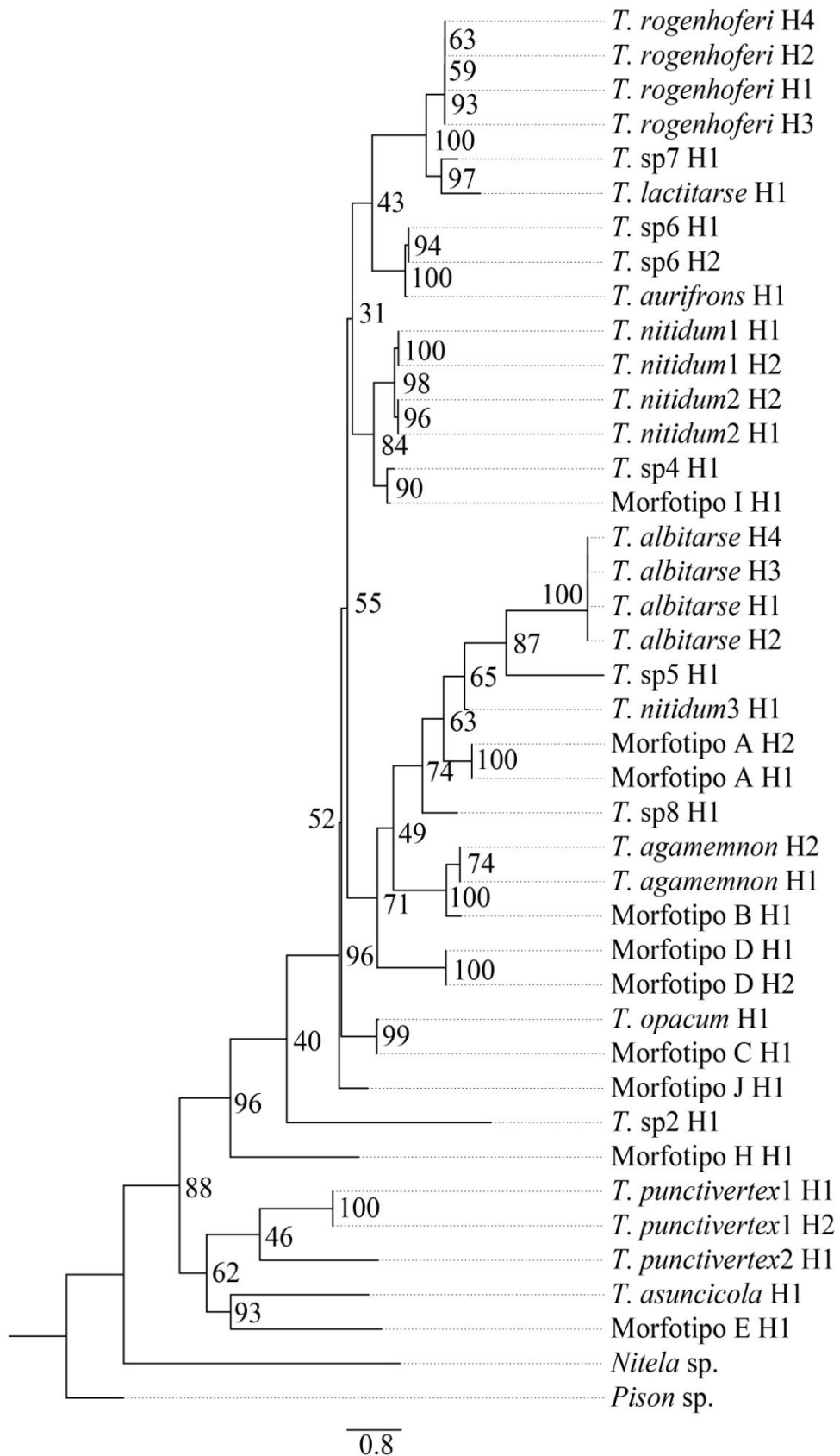


**APÊNDICE F:** ÁRVORE FILOGENÉTICA DO GÊNERO *TRYPOXYLON* ELABORADA COM A METODOLOGIA IB PARA SEQUÊNCIAS DE COI PARTICIONADAS.

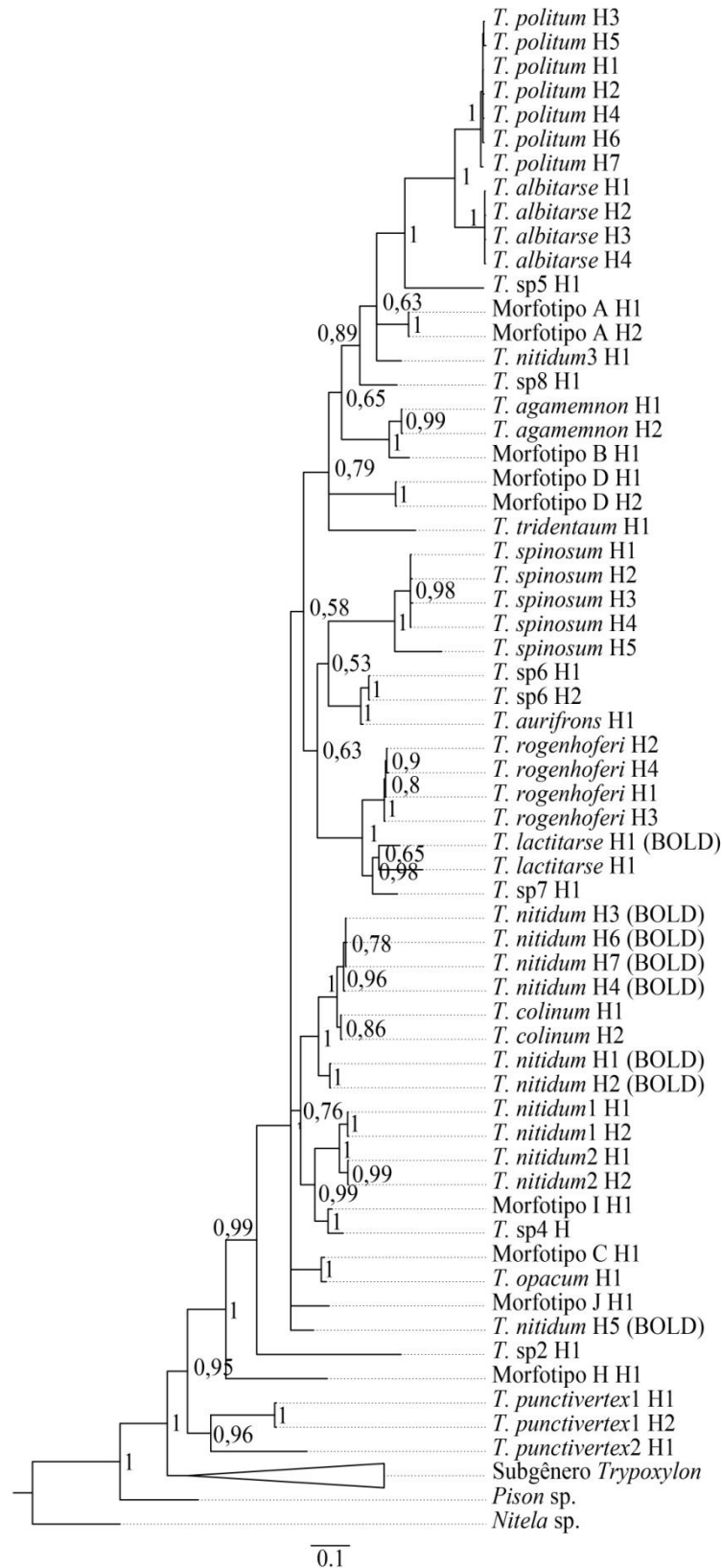


0.2

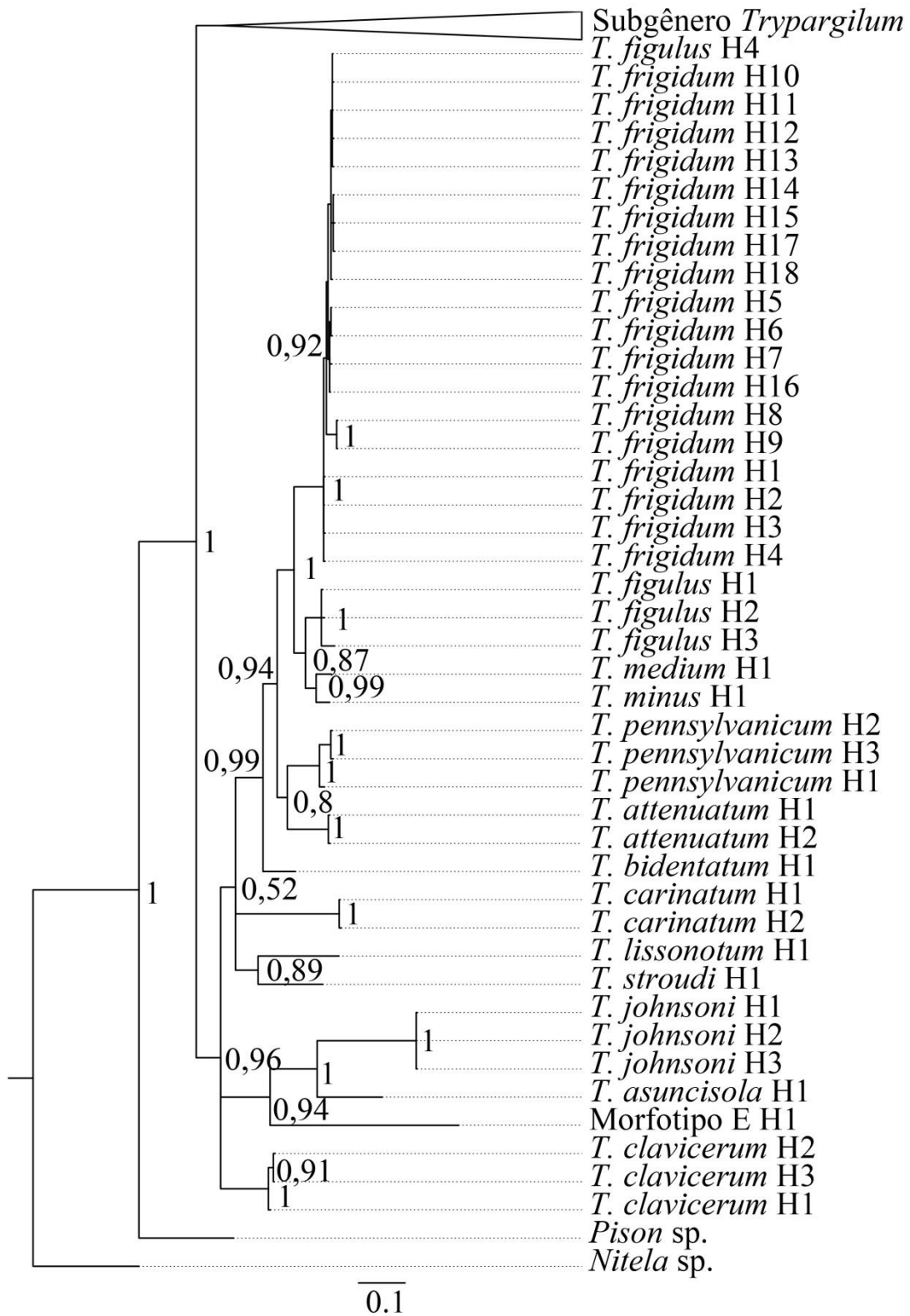
**APÊNDICE G: ÁRVORE FILOGENÉTICA DO GÊNERO *TRYPOXYLON* ELABORADA COM A METODOLOGIA ML PARA SEQUÊNCIAS DE COI PARTICIONADAS.**



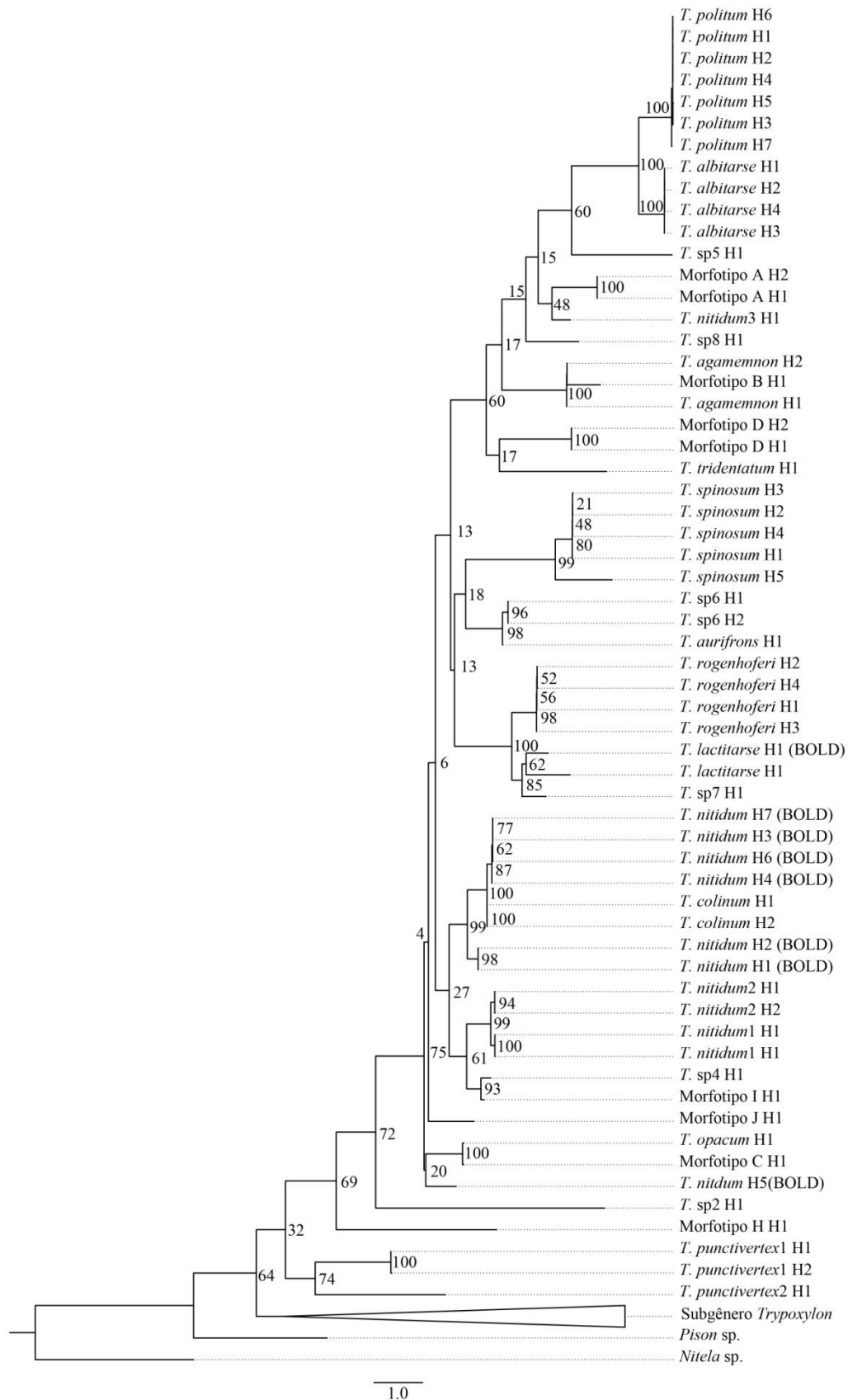
**APÊNDICE H: ÁRVORE FILOGENÉTICA ELABORADA COM A METODOLOGIA IB PARA SEQUÊNCIAS DE COI PARTICIONADAS. EM DESTAQUE O SUBGÊNERO *TRYPARGILUM*.**



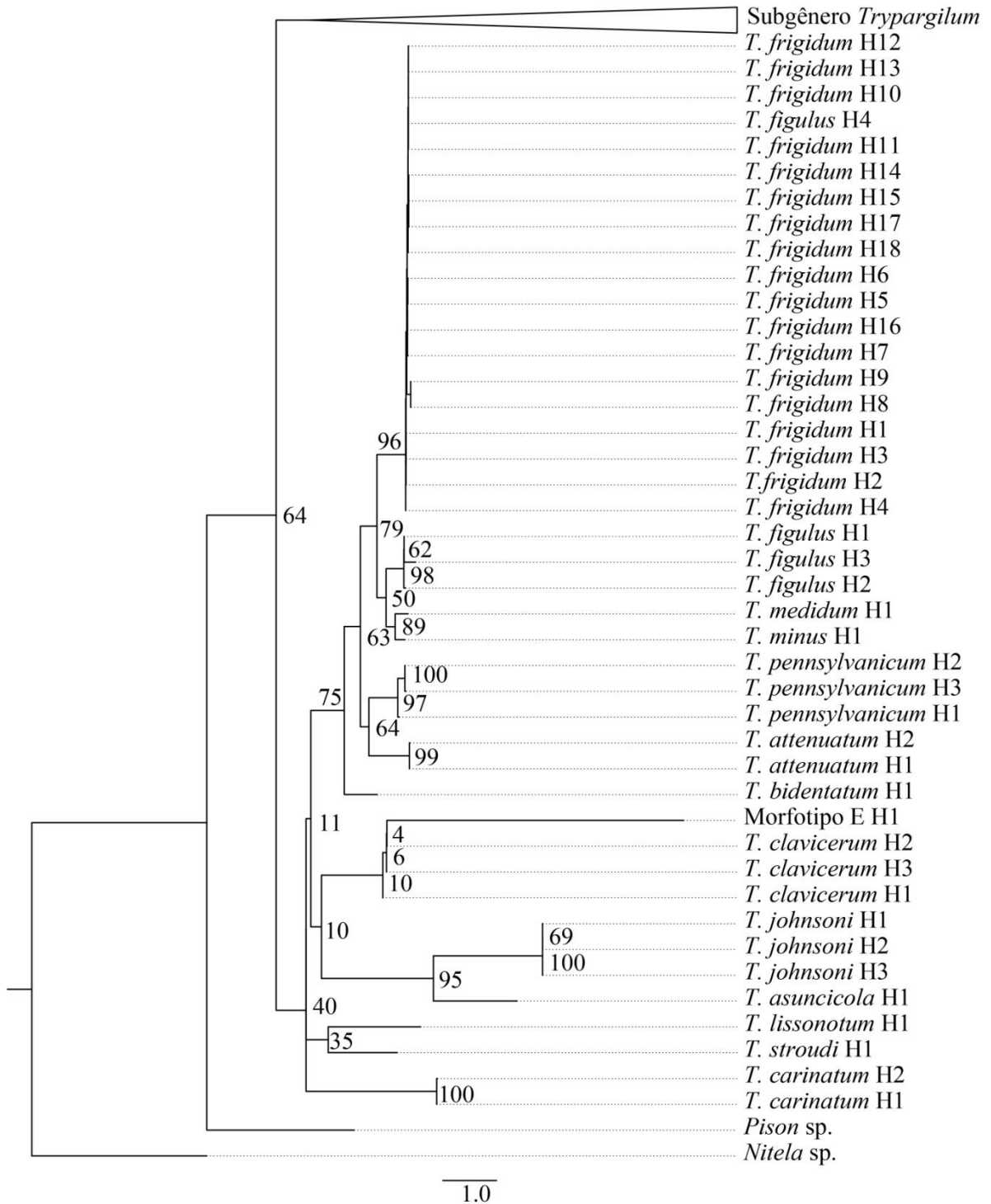
**APÊNDICE I:** ÁRVORE FILOGENÉTICA ELABORADA COM A METODOLOGIA IB PARA SEQUÊNCIAS DE COI PARTICIONADAS. EM DESTAQUE O SUBGÊNERO *TRYPOXYLON*.



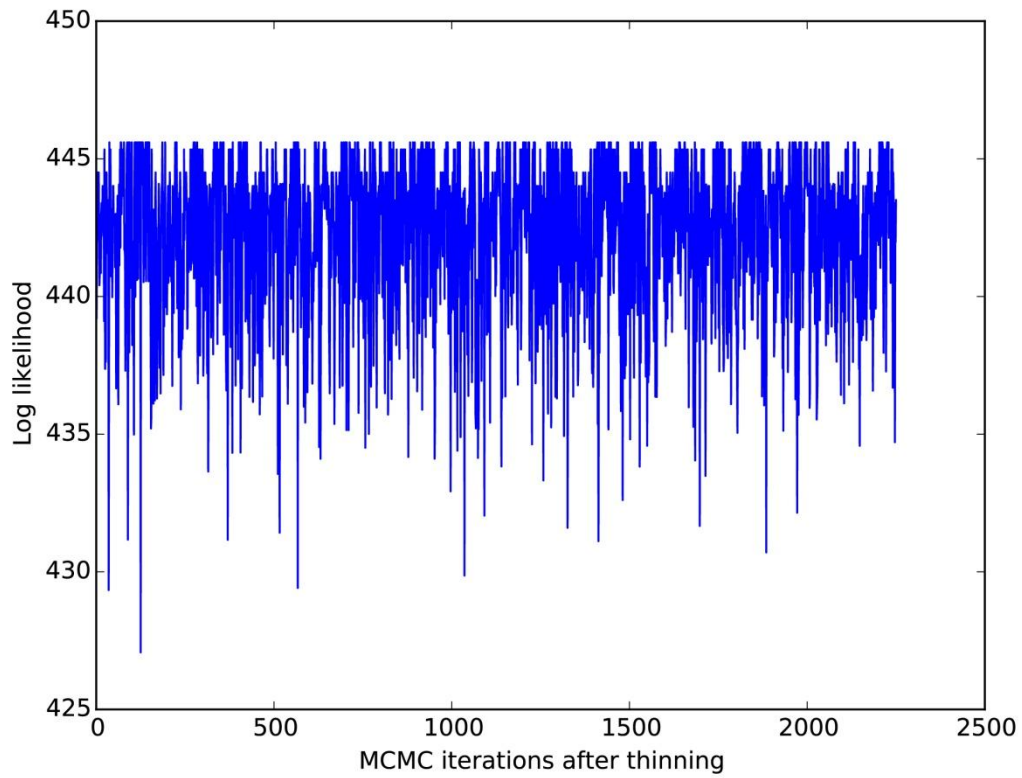
**APÊNDICE J: ÁRVORE FILOGENÉTICA ELABORADA COM A METODOLOGIA ML PARA SEQUÊNCIAS DE COI PARTICIONADAS. EM DESTAQUE O SUBGÊNERO *TRYPARGILUM*.**



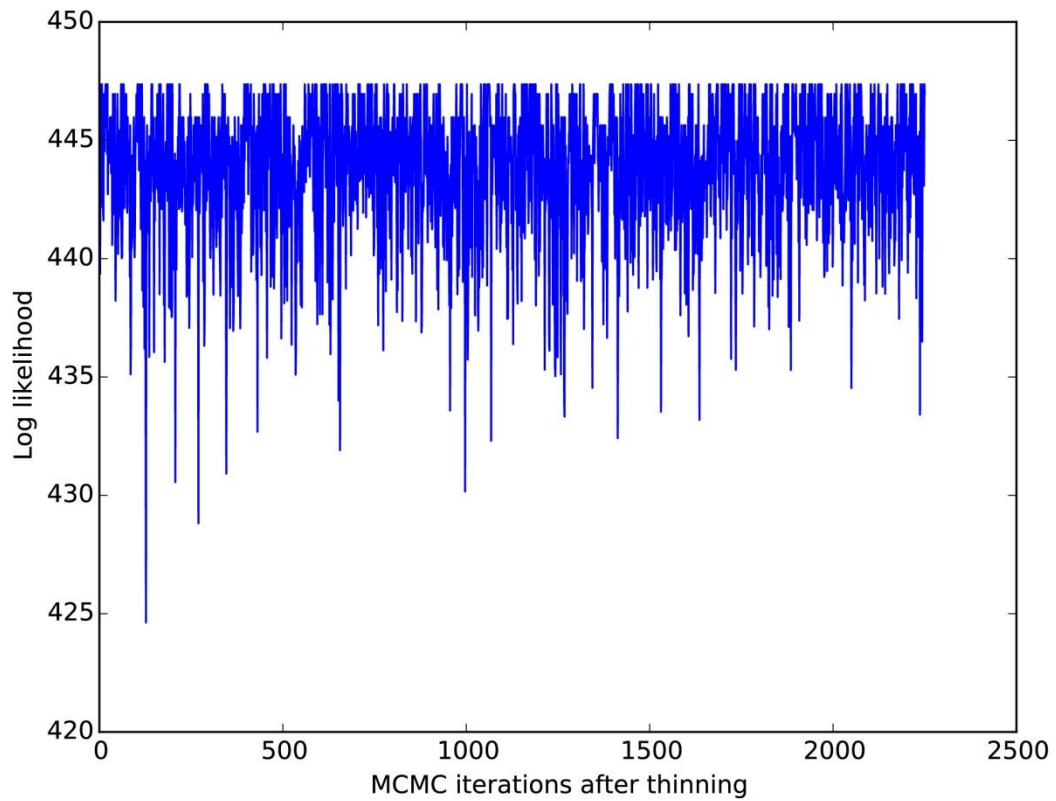
**APÊNDICE K: ÁRVORE FILOGENÉTICA ELABORADA COM A METODOLOGIA ML PARA SEQUÊNCIAS DE COI PARTICIONADAS. EM DESTAQUE O SUBGÊNERO *TRYPOXYLON*.**



**APÊNDICE L: CONVERGÊNCIA DA ANÁLISE BPTP COM OS GRUPOS EXTERNOS.**



**APÊNDICE M: CONVERGÊNCIA DA ANÁLISE BPTP SEM OS GRUPOS EXTERNOS.**



**APÊNDICE N:** RESULTADO DA DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES ELABORADA PELA METODOLOGIA FILOGENÉTICA E COALESCENTE UTILIZANDO O PROGRAMA BPTP INCLUINDO OS GRUPOS EXTERNOS *PISON SP.* E *NITELA SP.*. OS NOMES EM NEGRITO REPRESENTAM AS SEQUÊNCIAS RETIRADAS DO BOLD SYSTEMS V4 E GENBANK/NCBI.

Espécie	Morfotipo	Haplótipos	Valor de suporte
1	<i>Nitela sp.</i>	Nitela	1,00
2	<i>Pison sp.</i>	Pison	1,00
3	Morfotipo E	"E"H1	1,00
4	<i>T. clavicerum</i>	<b>ClaH1, ClaH2, ClaH3</b>	0,86
5	<i>T. sp2</i>	Sp2H1	1,00
6	Morfotipo H	"H"H1	1,00
7	<i>T. punctivertex</i>	Pun1H1, Punc1H2	0,98
8	<i>T. punctivertex</i>	Pun2H1	1,00
9	Morfotipo D	"D"H1, "D"H2	0,99
10	<i>T. tridentatum</i>	<b>TriH1</b>	1,00
11	<i>T. carinatum</i>	<b>CarH1, CarH2</b>	0,99
12	<i>T. johnsoni</i>	<b>JohH1, JohH2, JohH3</b>	0,92
13	<i>T. asuncicola</i>	AsuH1	1,00
14	<i>T. sp5</i>	Sp5H1	1,00
15	<i>T. sp8</i>	Sp8H1	1,00
16	<i>T. lissonotum</i>	<b>LisH1</b>	1,00
17	<i>T. stroudi</i>	<b>StrH1</b>	1,00
18	<i>T. spinosum</i>	<b>SpiH1, SpiH2, SpiH3, SpiH4</b>	0,99
19	<i>T. spinosum</i>	<b>SpiH5</b>	1,00
20	<i>T. lactitarse</i>	<b>LacH1</b>	1,00
21	<i>T. lactitarse</i>	LacH1	1,00
22	<i>T. sp7</i>	Sp7H1	1,00
23	<i>T. rogenhoferi</i>	RogH1, RogH2, RogH3, RogH4	0,99
24	Morfotipo C	"J"H1	1,00
25	<i>T. nitidum</i>	<b>NitH5</b>	1,00



APÊNDICE N: CONTINUAÇÃO

<b>Espécie</b>	<b>Morfotipo</b>	<b>Haplótipos</b>	<b>Valor de suporte</b>
26	<i>T. attenuatum</i>	<b>AttH1, AttH2</b>	0,98
27	<i>T. bidentatum</i>	<b>BidH1</b>	1
28	Morfotipo A	"A"H1, "A"H2	0,99
29	<i>T. nitidum</i>	Nit3H1	1
30	<i>T. politum</i>	<b>PolH1, PolH2, PolH3, PolH4, PolH5, PolH6, PolH7</b>	0,94
31	<i>T. albitarse</i>	AlbH1, AlbH2, AlbH3, AlbH4	0,93
32	<i>T. agamemnon</i>	AgaH1, AgaH2	0,99
33	Morfotipo B	"B"H1	1
34	<i>T. nitidum</i>	<b>NitH1, NitH2</b>	0,99
35	Morfotipo I	"I"H1	1
36	<i>T. sp4</i>	Sp4H1	1
37	<i>T. medium</i>	<b>MedH1</b>	1
38	<i>T. minus</i>	<b>MinH1</b>	1
39	<i>T. nitidum</i>	Nit1H1, Nit1H2	0,99
40	<i>T. nitidum</i>	Nit2H1, Nit2H2	0,99
41	<i>T. pennsylvanicum</i>	<b>PenH2, PenH3</b>	0,93
42	<i>T. pennsylvanicum</i>	<b>PenH1</b>	0,96
43	<i>T. figulus</i>	<b>FigH1</b>	0,65
44	Sp04-ARA e <i>T. rogenhoferi</i>	Sp6H1, Sp6H2	0,79
45	<i>T. aurifrons</i>	AurH1	0,79
46	<i>T. figulus</i>	<b>FigH2</b>	0,62
47	<i>T. nitidum</i>	<b>NitH3, NitH4, NitH6, NitH7</b>	0,79
48	<i>T. collinum</i>	<b>ColH1, ColH2</b>	0,82
49	Morfotipo C	"C"H1	0,75
50	<i>T. opacum</i>	OpaH1	0,75

APÊNCIDE N: CONTINUAÇÃO

Espécie	Morfotipo	Haplótipos	Valor de suporte
51	<i>T. figulus</i> e <i>T. frigidum</i>	<b>FigH4, FriH1, FriH2, FriH3, FriH4, FriH5, FriH6, FriH7, FriH8, FriH9, FriH10, FriH11, FriH12, FriH13, FriH14, FriH15, FriH16, FriH17, FriH18</b>	0,47
52	<i>T. figulus</i>	<b>FigH3</b>	0,62

**APÊNDICE O: RESULTADO DA DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES ELABORADA PELA METODOLOGIA FILOGENÉTICA E COALESCENTE UTILIZANDO O PROGRAMA BPTP SEM OS GRUPOS EXTERNOS. OS NOMES EM NEGRITO REPRESENTAM AS SEQUÊNCIAS RETIRADAS DO BOLD SYSTEMS V4 E GENBANK/NCBI.**

<b>Espécie</b>	<b>Morfotipo</b>	<b>Haplótipos</b>	<b>Valor de suporte</b>
1	Morfotipo E	"E"H1	1,00
2	<i>T. clavicerum</i>	<b>ClaH1, ClaH2, ClaH3</b>	0,84
3	<i>T. sp2</i>	Sp2H1	1,00
4	Morfotipo H	"H"H1	1,00
5	<i>T. punctivertex</i>	Pun1H1, Pun1H2	0,98
6	<i>T. punctivertex</i>	Pun2H1	1,00
7	Morfotipo D	"D"H1, "D"H2	0,99
8	<i>T. tridentatum</i>	<b>TriH1</b>	1,00
9	<i>T. carinatum</i>	<b>CarH1, CarH2</b>	0,98
10	<i>T. johnsoni</i>	<b>JohH1, JohH2, JohH3</b>	0,91
11	<i>T. asuncicola</i>	AsuH1	1,00
12	<i>T. sp5</i>	Sp5H1	1,00
13	<i>T. sp8</i>	Sp8H1	1,00
14	<i>T. lissonotum</i>	<b>LisH1</b>	1,00
15	<i>T. stroudi</i>	<b>StrH1</b>	1,00
16	<i>T. spinosum</i>	<b>SpiH1, SpiH2, SpiH3, SpiH4</b>	0,99
17	<i>T. spinosum</i>	<b>SpiH5</b>	1,00
18	<i>T. lactitarse</i>	<b>LacH1</b>	1,00
19	<i>T. lactitarse</i>	LacH1	1,00
20	<i>T. sp7</i>	Sp7H1	1,00
21	<i>T. rogenhoferi</i>	RogH1, RogH2, RogH3, RogH4	0,99

APÊNDICE O: CONTINUAÇÃO

Espécie	Morfotipo	Haplótipos	Valor de suporte
22	Morfotipo J	"J"H1	1,00
23	<i>T. nitidum</i>	<b>NitH5</b>	1,00
24	<i>T. attenuatum</i>	<b>AttH1, AttH2</b>	0,98
25	<i>T. bidentatum</i>	<b>BidH1</b>	1,00
26	Morfotipo A	"A"H1, "A"H2	0,99
27	<i>T. nitidum</i>	Nit3H1	1,00
28	<i>T. politum</i>	<b>PolH1, PolH2, PolH3, PolH4, PolH5, PolH6, PolH7</b>	0,94
29	<i>T. albitarse</i>	AlbH1, AlbH2, AlbH3, AlbH4	0,95
30	<i>T. agamemnon</i>	AgaH1, AgaH2	0,99
31	Morfotipo B	"B"H1	1,00
32	<i>T. nitidum</i>	<b>NitH1, NitH2</b>	0,99
33	Morfotipo I	"I"H1	1,00
34	<i>T. sp4</i>	Sp4H1	1,00
35	<i>T. medium</i>	<b>MedH1</b>	1,00
36	<i>T. minus</i>	<b>MinH1</b>	1,00
37	<i>T. nitidum1</i>	Nit1H1, Nit1H2	0,99
38	<i>T. nitidum2</i>	Nit2H1, Nit2H2	0,99
39	<i>T. pennsylvanicum</i>	<b>PenH2, PenH3</b>	0,93
40	<i>T. pennsylvanicum</i>	<b>PenH1</b>	0,96
41	<i>T. figulus</i>	<b>FigH1</b>	0,71
42	<i>Sp04-ARA e T. rogenhoferi</i>	Sp6H1, Sp6H2	0,78
43	<i>T. aurifrons</i>	AurH1	0,79
44	<i>T. figulus</i>	<b>FigH2</b>	0,69
45	<i>T. nitidum</i>	<b>NitH3, NitH4, NitH6, NitH7</b>	0,79
46	<i>T. collinum</i>	<b>ColH1, ColH2</b>	0,83
47	Morfotipo C	"C"H1	0,78
48	<i>T. opacum</i>	OpaH1	0,78

APÊNDICE O: CONTINUAÇÃO

<b>Espécie</b>	<b>Morfotipo</b>	<b>Haplótipos</b>	<b>Valor de suporte</b>
49	<i>T. frigidum</i>	<b>FriH1, FriH2, FriH3, FriH4</b>	0,53
50	<i>T. figulus e T. frigidum</i>	<b>FigH4, FriH5, FriH6, FriH7, FriH10, FriH11, FriH12, FriH13, FriH14, FriH15, FriH16, FriH17, FriH18</b>	0,47
51	<i>T. frigidum</i>	<b>FriH8, FriH9</b>	0,48
52	<i>T. figulus</i>	<b>FigH3</b>	0,69