

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

ANÁLISES FILOGEOGRÁFICAS DE *EXAERETE SMARAGDINA*  
(Guérin-Méneville, 1845) (HYMENOPTERA, APIDAE,  
EUGLOSSINI) E SUA HOSPEDEIRA *EULAEMA NIGRITA*  
(Lepelletier, 1841) (HYMENOPTERA, APIDAE,  
EUGLOSSINI) E O *STATUS* DE *EXAERETE LEPELETIERI*  
(Oliveira & Nemésio, 2003).

Otávio Lino e Silva

SÃO CARLOS

2009

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

ANÁLISES FILOGEOGRÁFICAS DE *EXAERETE SMARAGDINA*  
(Guérin-Méneville, 1845) (HYMENOPTERA, APIDAE,  
EUGLOSSINI) E SUA HOSPEDEIRA *EULAEMA NIGRITA*  
(Lepeletier, 1841) (HYMENOPTERA, APIDAE,  
EUGLOSSINI) E O *STATUS* DE *EXAERETE LEPELETIERI*  
(Oliveira & Nemésio, 2003).

Otávio Lino e Silva

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação  
em Genética e Evolução da  
Universidade Federal de São  
Carlos como parte dos  
requisitos para a obtenção  
do Título de Mestre em  
Genética e Evolução, Área  
de Concentração: Genética e  
Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Marco  
Antonio Del Lama

SÃO CARLOS

2009

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar

L758af

Lino e Silva, Otávio.

Análises filogeográficas de *Exaerete smaragdina* (Guérin-Méneville, 1845) (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) e sua hospedeira *Eulaema nigríta* (Lepeletier, 1841) (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) e o status de *Exaerete lepeletieri* (Oliveira & Nemésio, 2003) / Otávio Lino e Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

57 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Genética de populações. 2. Genética. 3. Abelha. 4. Parasitismo. 5. Evolução. I. Título.

CDD: 575.15 (20<sup>a</sup>)

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

Análises filogeográficas de *Exaerete smaragdina* (Guérin-Méneville, 1845)  
(Hymenoptera, Apidae, Euglossini) e sua hospedeira *Eulaema nigrita* (Lepeletier,  
1841) (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) e o status de *Exaerete lepeletieri* (Oliveira  
& Nemésio, 2003)

Dissertação de Mestrado de Otávio Lino e Silva

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito

Prof. Dr. Fernando Amaral da Silveira

Handwritten signatures in blue ink of the three examiners: Marco Antonio Del Lama, Reinaldo Alves de Brito, and Fernando Amaral da Silveira. Each signature is written over a horizontal dotted line.

"Um homem precisa viajar por sua conta (...)  
Precisa viajar por si, com seus olhos e pés,  
para entender o que é seu (...)"

Amyr Klink

Conhece-te a ti mesmo e conhecerás  
o universo e os deuses.

Sócrates

Dedico este trabalho aos meus pais, Nilson e  
Lúcia, e aos meus irmãos, Gabriel e Gustavo.  
A eles, pelo amor e pela paciência.

## **Agradecimentos**

Eis a parte mais importante deste trabalho. Sem estas pessoas, individualmente ou no conjunto, muito ou pouco, de perto ou não, certamente nada do que virá nas próximas páginas estaria hoje concretizado e verbalizado.

De tão importante, decidi que não caberia a mim escolher as palavras que as agradeceria. Passei a responsabilidade a um garoto e uma raposa, de um livro que leio desde criança.

Aos meus pais Nilson e Lúcia e aos meus irmãos Gabriel e Gustavo. Vocês serão sempre como a flor. *"Se tu amas uma flor que se acha numa estrela, é doce, de noite, olhar o céu. Todas as estrelas estão floridas."*

Ao meu orientador Marco Antônio Del Lama. *"Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que fez tua rosa tão importante."*. E tenho certeza que ele me diria: *"Nunca estamos contentes onde estamos."* (talvez na segunda pessoa do singular!). Mas acredito que concluiríamos juntos: *"O significado das coisas não está nas coisas em si, mas sim em nossa atitude com relação a elas"*.

A todos os meus professores. *"Há milhões e milhões de anos que as flores fabricam espinhos. Há milhões e milhões de anos que os carneiros as comem, apesar de tudo. E não será sério procurar compreender por que perdem tanto tempo fabricando espinhos inúteis? Não terá importância a guerra dos carneiros e das flores?"*

À minha namorada, amiga e companheira, Loany. *"Se alguém ama uma flor da qual só existe um exemplar em milhões de estrelas, isso basta para que seja feliz quando a contempla."*

Aos meus amigos e companheiros de laboratório e do departamento de Genética: Camila, Carol Mino, Cintia, Iderval, Isabel, Juliana, Juliano, Kátia, Keize, Luana, Mariana, Naná, Regina, Rogério, Samanta, Thais, Thais Collet. *"Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós."*

Aos meus amigos de longa data: João, Fabinho e Xandão. Aos meus amigos distantes (geograficamente): Aninha, Diego e Gisele. E aos grandes amigos da Biologia: Pedro, Marcelo, Cammy, Marina, Lia, Giovana, Val, Naná, Raquel, Julia, Helena, André, Andressa, Lorão, Grá e todos aqueles que compartilharam destes últimos tantos anos. A alguns eu diria: *"É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas. Dizem que são tão belas!"*. A outros: *"Para enxergar claro, basta mudar a direção do olhar."*. E a todos: *"Num mundo que se faz deserto, temos sede de encontrar um amigo."*. Tenho vocês!

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução e à Capes (pela bolsa concedida). *"Não exijas de ninguém senão aquilo que realmente pode dar."*

**Frases de "O Pequeno Príncipe"  
de A. de Saint Exupéry**

## Resumo

A tribo Euglossini possui cerca de 200 espécies de abelhas descritas, distribuídas em cinco gêneros considerados monofiléticos. Os gêneros *Exaerete* e *Aglae* apresentam comportamento cleptoparasita, atacando outras espécies de Euglossini. Para a espécie *Exaerete smaragdina*, os únicos relatos na literatura referem-se ao parasitismo de *Eulaema nigrita*. Porém, há indícios de que esta não seja sua única hospedeira. Desta forma, a filogeografia destas duas espécies foi comparada, com o intuito de analisar se há concordância entre as suas histórias evolutivas, pois, quanto maior a obrigatoriedade da relação parasita-hospedeiro, mais congruente espera-se que sejam suas filogeografias. Para *Ex. smaragdina*, foram observadas populações estruturadas geograficamente e os testes de neutralidade não foram significantes. Para *El. nigrita*, não foi observada estruturação populacional, havendo uma baixa variabilidade genética e a maioria das populações compartilhando um mesmo haplótipo. Estes dados, associados a testes de neutralidade estatisticamente significantes, indicam que as populações desta espécie sofreram uma expansão populacional recente. A comparação dos padrões filogeográficos indica ainda que *El. nigrita* não deva ser a única hospedeira de *Ex. smaragdina*. Também foi analisado o *status* de espécie da *Exaerete lepeletieri*, considerada recentemente uma sinonímia de *Ex. frontalis*. Os resultados indicam que *Ex. lepeletieri* apresenta monofilia para o loco 16S, enquanto dois clados foram observados para o loco Citocromo B (CytB).

## Lista de Tabelas

**Tabela 1:** Localidades amostradas no presente estudo, seguidas da sigla do estado e da região geográfica, quando referentes ao Brasil, ou pelo nome do país quando não. As amostras de outros países, com exceção de Villavencio (CO), foram extraídas do trabalho de Dick et al. (2004). O código refere-se à abreviatura utilizada no mapa (Figura 6), onde as localidades estão designadas segundo sua latitude e longitude. Para cada localidade está representado o número de indivíduos analisados para cada loco e espécie. **Pág. 16**

**Tabela 2** - Primers utilizados para amplificação por PCR dos locos analisados neste trabalho e seus respectivos autores. **Pág. 18**

**Tabela 3:** Composição nucleotídica dos locos 16s, Citocromo B e COI para *Exaerete smaragdina*. **Pág. 23**

**Tabela 4** - Índices de diversidade gênica (variância) para os locos analisados em *Exaerete smaragdina*. **Pág. 23**

**Tabela 5** - Valores obtidos para os testes de neutralidade de Tajima (D) e Fu (Fs) e os respectivos valores de P (entre parênteses) para os três locos analisados de *Exaerete smaragdina*. **Pág. 24**

**Tabela 6** - Valores obtidos para a AMOVA a partir dos locos concatenados 16S e CytB para *Exaerete smaragdina*. **Pág. 30**

**Tabela 7:** Composição nucleotídica dos locos Citocromo B e COI para *Eulaema nigrita*. **Pág. 30**

**Tabela 8:** Índices de diversidade gênica (variância) para os locos analisados em *Exaerete smaragdina*. **Pág. 31**

**Tabela 9** - Valores obtidos para os testes de neutralidade de Tajima (D) e Fu (Fs) e seus respectivos valores de P para os dois locos analisados de *Eulaema nigrita*. **Pág. 31**

**Tabela 10** - Valores obtidos para a AMOVA a partir dos locos concatenados COI e CytB de *Eulaema nigrita*. **Pág. 35**

**Tabela 11** - Diversidade genética (desvio padrão, 5.000 reamostragens) observada para as 3 espécies para 364pb do gene mitocondrial Citocromo B. **Pág. 38**

**Tabela 12** - Diversidade nucleotídica e número médio de substituições (desvio padrão, 5.000 reamostragens) observada para as três espécies para 463pb do gene mitocondrial 16S. **Pág. 38**

**Tabela 13 - Diagonal inferior:** Diversidade genética (Desvio padrão, 5.000 re-amostragens) observada entre as 3 espécies para 364pb do gene mitocondrial Citocromo B. **Diagonal superior:** Fst par-a-par (Desvio padrão, 5.000 re-amostragens) observada entre as 3 espécies para 364pb do gene mitocondrial Citocromo B. **Pág. 39**

**Tabela 14 - Diagonal inferior:** Diversidade genética (Desvio padrão, 5.000 re-amostragens) observada entre as 3 espécies para 463pb do loco mitocondrial 16S. **Diagonal superior:** Fst par-a-par (Desvio padrão, 5.000 re-amostragens) observada entre as 3 espécies para 463pb do gene mitocondrial Citocromo B. **Pág. 39**

## Lista de Figuras

**Figura 1:** Machos dos cinco gêneros de Euglossini. (a) *Euglossa mixta*. (b) *Euglossa* sp. com a probóscide estendida. (c) *Eufriesea pulchra*. (d) *Eulaema meriana*. (e) *Exaerete frontalis*. (f) *Aglae caerulea*. Fotos de E. Ross. Extraído de Cameron (2004). **Pág. 2**

**Figura 2.** Relações filogenéticas do grupo de abelhas corbiculadas, estabelecidas a partir dos genes citocromo B, 16S, 28S e opsina, usando grupos externos. O asterisco ao lado do nome da tribo indica que, para aquela filogenia, esta tribo não demonstrou ser monofilética. Extraído de Cameron & Mardulyn (2001). **Pág. 4**

**Figura 3.** Relações filogenéticas entre os gêneros da tribo Euglossini. (a) Primeira e (b) Segunda filogenias propostas por Kimsey (1982, 1987) com base em caracteres morfológicos; (c) filogenia de Michener, também baseada em caracteres morfológicos; (d) filogenia de Engel (1999) com base na morfologia e dados de fósseis; (e) filogenia molecular baseada nas sequências de quatro genes reportadas por Michel-Salzat *et al.* (2004) e em dados morfológicos de Oliveira (2000). **Pág. 5**

**Figura 4.** Relações filogenéticas das espécies de *Exaerete*. Retirada de Anjos-Silva *et al.* (2007). Pontos pretos indicam mudanças únicas e não ambíguas; pontos brancos indicam reversões e convergências. **Pág. 8**

**Figura 5.** Células de *Eulaema nigrita* sendo provisionadas (a, b) e parasitada (c) por *Exaerete smaragdina*. A seta (d) indica a marca deixada pelo orifício aberto para a oviposição por *Exaerete smaragdina*. Extraído de Garófalo & Rozen (2001). **Pág. 10**

**Figura 6:** Mapa com as localidades amostradas neste trabalho. Os códigos referem-se ao nome de cada localidade, referidas na Tabela 1. **Pág. 17**

**Figura 7:** Análise da reconstrução filogenética para a espécie *Exaerete smaragdina*. Acima: à esquerda, loco 16S, e à direita CytB. Ao lado loco COI. Análises feitas a partir do método de Neighbour-Joining, com 5000 réplicas. **Pág. 27**

**Figura 8 -** Análise filogenética de Neighbour-Joining (5000 réplicas) para os locos 16S, CytB e COI concatenados (1246pb) de *Exaerete smaragdina*. **Pág. 28**

**Figura 9 -** Análise de clados aninhados para o loco COI das amostras analisadas da espécie *Exaerete smaragdina*. **Pág. 29**

**Figura 10:** Análise da reconstrução filogenética para a espécie *Eulaema nigríta*. À esquerda, loco COI, e à direita CytB. Análises feitas a partir do método de Neighbour-Joining, com 5000 réplicas. **Pág. 33**

**Figura 11** - Análise filogenética de Neighbour-Joining (5000 réplicas) para os locos CytB e COI concatenados (832pb) de *Eulaema nigríta*. **Pág. 34**

**Figura 12** - Rede de haplótipos para o loco COI de *Eulaema nigríta*: (PAN: Panamá, GFRC: Guiana Francesa, RIF: Rifaina, SC: São Carlos, MAN: Manaus, VIC: Viçosa, GUAR: Guarapari, JPES: João Pessoa, UBAT: Ubatuba, CAC: Cáceres). **Pág. 34**

**Figura 13** - Análise de clados aninhados para o loco CytB de *Eulaema nigríta*. (RIF: Rifaina, SC: São Carlos, MAN: Manaus, MARL: Marliéria, JPES: João Pessoa, GUAR: Guarapari, UBAT: Ubatuba, CAC: Cáceres, CGUI: Chapada dos Guimarães, CRIS: Cristalino, VIC: Viçosa). **Pág. 35**

**Figura 14** - Reconstrução filogenética para o loco 16S para as espécies *Ex. smaragdina*, *Ex. frontalis* e para a possível espécie *Ex. lepeletieri*, pelo método de Neighbour-Joining (5000 réplicas). **Pág. 41**

**Figura 15** - Reconstrução filogenética para o loco Citocromo B para as espécies *Ex. smaragdina*, *Ex. frontalis* e para a possível espécie *Ex. lepeletieri*, pelo método de Neighbour-Joining (5000 réplicas). **Pág. 41**

## SUMÁRIO

1	Introdução	1
1.1	As abelhas Euglossíneas	1
1.2	Origem da tribo Euglossini	3
1.3	Relações filogenéticas dentro da tribo Euglossini	5
1.4	Caracterização do gênero <i>Exaerete</i>	6
1.5	Origem do cleptoparasitismo em Euglossini	8
2	Objetivos	13
3	Material e Métodos	15
3.1	Material	15
3.2	Extração de DNA e amplificação	15
3.3	Seqüenciamento do DNA mitocondrial	18
3.4	Análises populacionais	19
3.5	Análises filogeográficas	20
3.6	Análises filogenéticas de <i>Ex. lepeletieri</i>	21
4	Resultados e Discussão	22
4.1	Diversidade genética das populações de <i>Exaerete smaragdina</i>	22
4.2	Estrutura genética e filogeografia das populações de <i>Exaerete smaragdina</i>	24
4.3	Diversidade genética das populações de <i>Eulaema nigríta</i>	30
4.4	Estrutura genética e filogeografia das populações de <i>Eulaema nigríta</i>	32
4.5	Comparação entre os aspectos filogeográficos de <i>Ex. smaragdina</i> e sua hospedeira <i>El. nigríta</i>	36
4.6	Análise do <i>status</i> de espécie de <i>Exaerete lepeletieri</i> baseado em caracteres genéticos	38
5	Considerações finais e perspectivas	42
5.1	Estudos filogeográficos na América do Sul	42
5.2	Filogeografia comparada em sistemas parasita-hospedeiro	42
5.3	Determinação do <i>status</i> de espécie por marcadores moleculares	43
6	Referências bibliográficas	45

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. As abelhas Euglossíneas

A fauna brasileira apresenta, aproximadamente, 1600 espécies de abelhas pertencentes às famílias Colletidae, Halictidae, Andrenidae, Megachilidae e Apidae (Silveira *et al.* 2002). Dentre esta diversidade de abelhas, encontram-se as abelhas da tribo Euglossini, distribuídas do México ao centro da Argentina (Michener 2000) e que chegam a constituir até 25% da diversidade de abelhas em algumas matas (Roubik & Hanson 2004).

Desde a compilação das 122 espécies de Euglossini descritas até 1967 (Moure 1967), cerca de 45 novas espécies foram catalogadas até 1986 (Kimsey & Dressler 1986). Em 2004, o número de espécies já atingia a marca de 187 (Roubik & Hanson 2004) e novas espécies continuam sendo identificadas (Oliveira 2006; Oliveira & Nemésio 2003; Anjos-Silva & Rebelo 2006; Nemésio 2009).

As cerca de 200 espécies reconhecidas atualmente estão distribuídas em cinco gêneros: *Euglossa* (114 spp.), *Eufriesea* (62 spp.), *Eulaema* (18 spp.), *Exaerete*<sup>1</sup>, (7 spp.) e *Aglae* (1 sp.) (Figura 1), sendo os dois últimos cleptoparasitas de outras espécies de Euglossini.

A tribo Euglossini constitui parte do grupo de abelhas corbiculadas, um grupo monofilético dentro da família Apidae. O grupo das abelhas corbiculadas é constituído também por outras três tribos: Apini e Meliponini, altamente sociais, e a tribo Bombini, que apresenta espécies primitivamente eusociais. O nome deste grupo deve-se à presença das corbículas, estruturas presentes na tíbia posterior das fêmeas destas espécies e utilizadas para transporte do pólen nos vôos de forrageamento.

---

<sup>1</sup> Pelo fato dos nomes terem as mesmas letras iniciais, as abreviações usadas para cada gênero serão *Eg.*, *Ef.*, *El.*, *Ex.* e *Ag.* respectivamente.



**Figura 1.** Machos dos cinco gêneros de Euglossini. (a) *Euglossa mixta*. (b) *Euglossa* sp. com a probóscide estendida. (c) *Eufriesea pulchra*. (d) *Eulaema meriana*. (e) *Exaerete frontalis*. (f) *Aglae caerulea*. Fotos de E. Ross. Extraído de Cameron (2004).

Os machos de Euglossini são, em alguns casos, os únicos polinizadores de algumas espécies de orquídeas. Eles são atraídos por fragrâncias produzidas nas flores destas espécies, coletando estas essências e armazenando-as em estruturas especiais localizadas no terceiro par de pernas.

Somente no final da década de 60, os estudos sobre a biologia e taxonomia do grupo tiveram um grande avanço, graças aos estudos utilizando compostos químicos atrativos, sintetizados em laboratório.

As fêmeas do grupo, no entanto, não são atraídas por estes compostos, o que faz com que a maioria dos trabalhos realizados baseiem-se na observação de machos. Atualmente, alguns trabalhos utilizando ninhos-armadilha (Garófalo *et al.* 1998; Garófalo & Rozen 2001; Cameron & Ramirez 2001) e

marcação-captura durante forrageamento (López-Uribe & Del Lama 2007; López-Uribe *et al.* 2008) têm contribuído com algum conhecimento sobre a biologia das fêmeas.

Além das orquídeas, os euglossíneos utilizam-se de recursos de outros grupos vegetais como Lecythidaceae (Knudsen & Mori 1996), Euphorbiaceae (Armbruster *et al.* 1992) e Solanaceae (Soares *et al.* 1989), entre outras famílias de Angiospermas, o que faz com que estas abelhas sejam consideradas “espécies-chave” de muitos ecossistemas devido ao seu papel como polinizadores.

## **1.2. Origem da tribo Euglossini**

A relação entre Euglossini e as demais tribos de corbiculados ainda é incerta. A análise de caracteres morfológicos (Roig-Alsina & Michener 1993; Schultz *et al.* 1999) e a incorporação de informações relativas a espécimes fósseis (Engel 1999) têm posicionado Euglossini como tribo basal do restante do grupo.

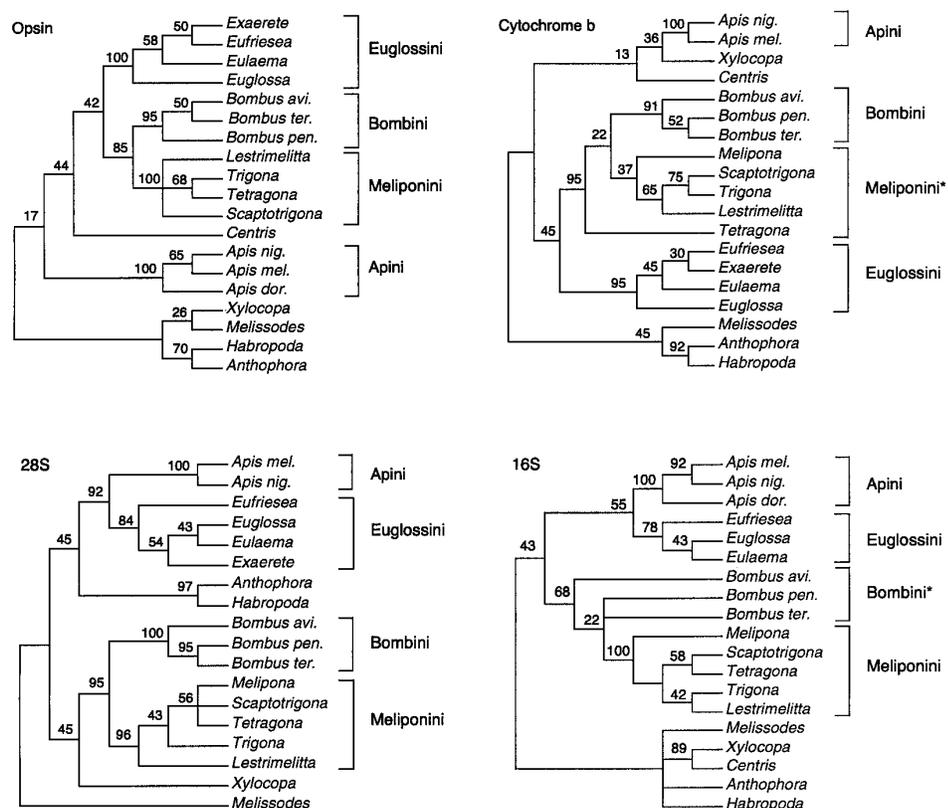
Por outro lado, o estudo de Lockhart & Cameron (2001), analisando caracteres morfológicos relevantes de abelhas de língua longa, mostrou um suporte semelhante ao descrito por Michener (1974), com Euglossini como grupo irmão de Bombini e Apini de Meliponini. Estes resultados diferem dos achados oriundos de estudos moleculares, que apontam Euglossini e Apini como um clado monofilético (Koulianos *et al.* 1999; Cameron 1993), uma indicação de que há incerteza no enraizamento da filogenia quando se considera apenas dados morfológicos.

Resultados genéticos mais recentes (Cameron & Mardulyn 2001) mostram um forte suporte para o clado (Bombini + Meliponini), com incertezas a respeito da posição de Euglossini como grupo-irmão de Apini ou de (Bombini + Meliponini) (Figura 2).

Dentre os corbiculados, a tribo Euglossini é a única que não apresenta comportamento eusocial e, por esta razão,

tem sido objeto de estudos sobre a origem da socialidade nas abelhas. A maioria dos euglossíneos é solitária, exceto por algumas espécies de *Euglossa* e *Eulaema* que apresentam comportamento de nidificação comunal (Dodson 1966; Zucchi *et al.* 1969; Garófalo 1985; Garófalo *et al.* 1998; Roberts & Dodson, 1967).

Não se sabe ao certo se este comportamento de nidificação comunal em Euglossini é primitivo ou derivado, pois ainda há incertezas quanto à filogenia da tribo.



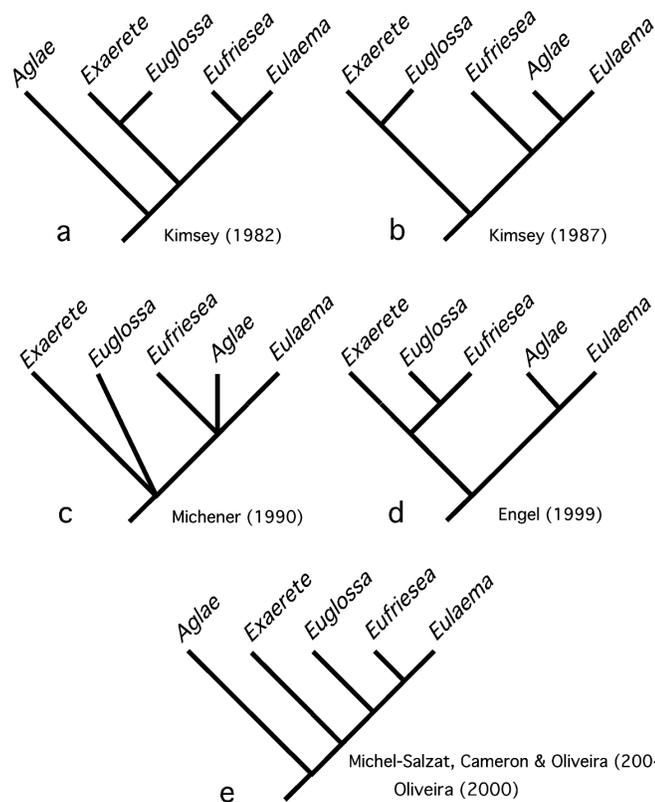
**Figura 2.** Relações filogenéticas do grupo de abelhas corbiculadas, estabelecidas a partir dos genes Citocromo B, 16S, 28S e opsina, usando grupos externos. O asterisco ao lado do nome da tribo indica que, para aquela filogenia, esta tribo não demonstrou ser monofilética. Extraído de Cameron & Mardulyn (2001).

### 1.3. Relações filogenéticas dentro da tribo Euglossini

Nos últimos 20 anos, cinco hipóteses de relações filogenéticas entre os gêneros foram propostas (Figura 3).

Destas, as quatro primeiras (a - d) são baseadas em um pequeno número de caracteres morfológicos (Kymsey 1982, 1987; Michener 1990; Engel 1999).

A hipótese mais recente (e) é suportada por dados moleculares de quatro genes (Michel-Salzat *et al.* 2004), que demonstraram um resultado congruente ao relatado por Oliveira (2000), com base em um número consideravelmente maior de caracteres morfológicos do que os utilizados em estudos anteriores (Figura 3-e).



**Figura 3.** Relações filogenéticas entre os gêneros da tribo Euglossini. (a) Primeira e (b) Segunda filogenias propostas por Kimsey (1982, 1987) com base em caracteres morfológicos; (c) filogenia de Michener, também baseada em caracteres morfológicos; (d) filogenia de Engel (1999) com base na morfologia e dados de fósseis; (e) filogenia molecular baseada nas sequências de quatro genes reportadas por Michel-Salzat *et al.* (2004) e em dados morfológicos de Oliveira (2000).

Apesar da dificuldade em se estabelecer a história evolutiva da tribo, a natureza monofilética de cada gênero parece ser inquestionável (Michel-Salzat *et al.* 2004).

Além disso, parece claro que o gênero *Aglae* é basal e que os gêneros *Eufriesea* e *Eulaema* formam um grupo-irmão. A maior controvérsia parece residir no possível clado irmão de (*Eufriesea* + *Eulaema*), ora considerando-se o grupo (*Exaerete* + *Euglossa*) constitutivo de um clado, ora considerando *Exaerete* ou *Euglossa*, sem monofilia entre estes dois gêneros (sendo estes dois últimos parafiléticos).

#### **1.4. Caracterização do gênero *Exaerete***

O gênero *Exaerete* é composto por abelhas que variam entre 18 e 28 mm, de cores verde, verde-azulado ou ainda púrpura metálicos. Este gênero, ao contrário de *Aglae*, monoespecífico e de distribuição restrita à Amazônia (mas recentemente encontrada no Pantanal - ver Anjos-Silva *et al.* 2006), é composto atualmente por sete espécies, ocorrendo desde o norte da Argentina até o México. No Brasil, as espécies de *Exaerete* distribuem-se por quase todas as regiões fitogeográficas, desde a floresta Amazônica (dos estados do Acre ao Maranhão) a regiões de clima semi-decíduo e de Floresta Atlântica (dos Estados de São Paulo até o Rio Grande do Norte) (Moure 1967; Kimsey 1979; Ramírez *et al.* 2002; Rebêlo & Garófalo 1997; Nemésio 2009).

A primeira hipótese filogenética para o gênero foi feita por Engel (1999) para as cinco espécies conhecidas à época. Este estudo corroborou a hipótese de monofilia do gênero, assim como confirmou os dois grupos taxonômicos internos já conhecidos: *frontalis* (*Ex. smaragdina* + *Ex. frontalis*), com palpos labiais bi-segmentados e presença do nódulo hipoepimeral, e *dentata* (*Ex. dentata* + *Ex. trochanterica* + *Ex. azteca*), com palpos labiais tetra-segmentados e nódulo hipoepimeral ausente (Moure 1964; 1967).

Em 2003, uma nova espécie, *Ex. lepeletieri*, foi descrita (Oliveira & Nemésio 2003). De distribuição restrita à bacia amazônica brasileira, ela se assemelha muito às espécies *Ex. frontalis* e *Ex. smaragdina*, o que levou à proposição de que a nova espécie fosse apenas o híbrido entre as duas espécies (Anjos-Silva *et al.* 2007).

Posteriormente, uma nova espécie foi descrita, *Ex. guaykuru* (Anjos-Silva & Rebelo 2006), aparentemente mais aparentada a *Ex. trochanterica*, encontrada em florestas úmidas do Planalto dos Guimarães, sul do Mato Grosso, Brasil.

Após a descrição destas duas novas espécies, uma nova análise filogenética para o gênero foi conduzida. Anjos-Silva *et al.* (2007) identificaram três clados principais para o gênero (Figura 4). Além disso, os autores concluíram que *Ex. lepeletieri* era apenas uma variante regional de *Ex. frontalis*, sugerindo que estas eram espécies sinônimas.

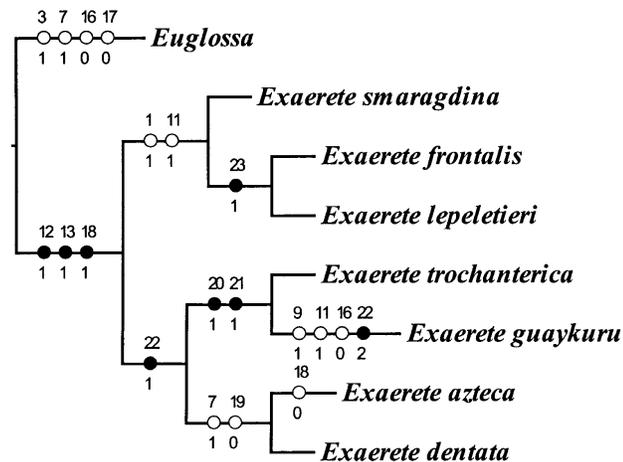
Recentemente, Nemésio (2009) reanalisando os caracteres morfológicos de *Ex. lepeletieri*, manteve o status de espécie anteriormente definido. No entanto, ainda não foi realizado estudo utilizando marcadores genéticos (genes mitocondriais, p.e.) para a confirmação do status de espécie de *Ex. lepeletieri* e *Ex. guaykuru*.

O acesso à diversidade genética proporciona a capacidade de detecção de espécies crípticas, pois um estágio crítico para a especiação é o acúmulo de diferenças genéticas entre populações (Coyne 1992; Schluter 1996).

Esta ferramenta molecular não implica na eliminação da taxonomia descritiva tradicional (Dunn 2003; Lipscomb *et al.* 2003; Seberg *et al.* 2003) que, graças a grandes avanços teóricos, aumentou sua capacidade de predição e determinação do status de espécie. Porém, análises filogenéticas aumentam essa capacidade de predição, pois os indivíduos de uma determinada espécie devem coalescer em um

ancestral comum formando sempre um clado monofilético (Baum & Shaw 1995).

Na sistemática filogenética, marcadores de DNA mitocondrial têm se mostrado os marcadores mais apropriados para a caracterização de espécies. Sua taxa evolutiva chega a ser 10 vezes mais rápida do que a de genes nucleares (Vawter & Brown 1986), possui baixas taxas de recombinação (Avice 2004) e herança exclusivamente materna. Estas características resultam em uma maior resolução de padrões intra-específicos do que métodos não moleculares (Avice 2000).



**Figura 4.** Relações filogenéticas das espécies de *Exaerete*. Retirada de Anjos-Silva et al. (2007). Pontos pretos indicam mudanças únicas e não ambíguas, pontos brancos indicam reversões e convergências.

### 1.5. Origem do cleptoparasitismo em Euglossini

Se a reconstrução filogenética mais aceita para Euglossini for suficientemente robusta, dela resultará que nenhum dos dois gêneros cleptoparasitas evoluíram este comportamento diretamente sobre os gêneros hospedeiros atuais, por terem origem anterior aos seus hospedeiros. Esta seria uma contradição à regra de Emery (discutida em Wilson 1971) que prevê que cleptoparasitas evoluem de táxons intimamente relacionados que tornar-se-ão seus hospedeiros.

Nas espécies dos gêneros *Aglae* e *Exaerete*, as fêmeas perderam as estruturas carregadoras de pólen, exibem uma quantidade reduzida de pelos e uma fina cutícula, também encontrada em outras espécies de abelhas parasitas.

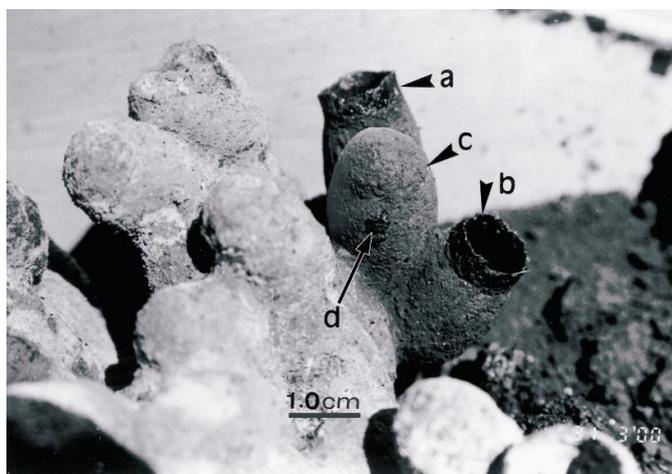
Mesmo sendo o gênero *Aglae* o mais ancestral do grupo, o cenário mais provável é o de que este comportamento tenha surgido duas vezes dentro da tribo a partir de um ancestral já extinto não cleptoparasita. Deve-se lembrar que tal comportamento tem várias origens independentes dentro de grupo Apinae (Michener 2000).

Além disso, os euglossíneos parasitados não aparentam ter evoluído algum comportamento efetivo de defesa para combater o parasitismo. É notável que ninhos de *Eulaema* cheguem a ter altas taxas de parasitismo por *Exaerete*, variando entre 70 a 100% (Garófalo & Rozen 2001; Zucchi et al. 1969).

Pouco se sabe sobre a biologia e o comportamento parasítico das espécies do gênero *Exaerete*. No entanto, há relatos na literatura de ninhos de *Eufriesea* (*surinamensis* e *auriceps*) atacados por *Ex. dentata* (Benett 1972; Kimsey 1982), *El. nigrita* atacados por *Ex. smaragdina* (Garófalo & Rozen 2001) e *El. meriana* e *El. flavenscens* por *Ex. frontalis* (Kimsey 1979).

O sucesso do parasitismo parece ser dependente de densidade. Desta forma, espera-se que os parasitas sejam raros ou ausentes em locais em que os hospedeiros não são residentes (Weislo 1987 in Nemésio & Silveira 2006).

Em concordância com tal pressuposto, Nemésio & Silveira (2006) testaram a hipótese de associações parasíticas entre *Ex. frontalis* - *El. meriana* e *Ex. smaragdina* - *El. nigrita*, analisando inventários de coletas realizadas nas Américas do Sul e Central. Para tanto, apenas dados de frequência e latitude foram utilizados.



**Figura 5.** Células de *Eulaema nigrita* sendo provisionadas (a, b) e parasitada (c) por *Exaerete smaragdina*. A seta (d) indica a marca deixada pelo orifício aberto para a oviposição por *Exaerete smaragdina*. Extraído de Garófalo & Rozen (2001).

Os autores observaram que há uma fraca associação entre *Ex. smaragdina* e *El. nigrita*, tendo esta última espécie uma distribuição maior em direção ao sul. Além disso, estudos recentes indicam que *El. nigrita* evita o interior de florestas bem conservadas (Nemésio 2004), sendo muito freqüentes em ambiente perturbados, como os ambientes urbanos (López-Urbe et al. 2008). Estes dados parecem corroborar a hipótese de que quanto maior a latitude, mais difícil para *Ex. smaragdina* parasitar seu hospedeiro.

Desta forma, possivelmente *El. nigrita* não seja o único hospedeiro de *Ex. smaragdina*. Porém, não há até a presente data relatos de ataques deste cleptoparasita a ninhos de outra espécie.

Neste contexto, o estudo de filogeografia comparada de espécies filogeneticamente ou ecologicamente associadas pode prover uma ferramenta interessante para identificar e avaliar os efeitos de fatores ecológicos, históricos ou estocásticos nos padrões de distribuição biogeográficos, como é o caso da relação existente entre *Ex. smaragdina* e *El. nigrita*.

O objetivo da filogeografia é caracterizar a distribuição filogeográfica de linhagens genealógicas

através da paisagem geográfica (Avice et al. 1987), detectando processos como subdivisão populacional, eventos de especiação ou adaptação ecológica e rotas de migração associadas com mudanças climáticas passadas (Avice 2000).

A filogeografia comparada é definida como a comparação de padrões geográficos de subdivisão evolutiva entre espécies co-distribuídas ou complexos de espécies, compartilhando uma rede conceitual comum à biogeografia histórica (Zink 1996). A filogeografia comparada permite, portanto, a investigação de questões biogeográficas em escalas temporais e espaciais menores do que aquelas usualmente estudadas com outros métodos (Avice 2000) e freqüentemente revela eventos crípticos de vicariância nos biotas (Riddle et al. 2000).

Padrões filogeográficos concordantes entre taxa distantes têm sido reportados (Sullivan et al. 2000; Hugall et al. 2002). Porém, há também relatos de que esta concordância não é regra geral e incongruências têm sido reportadas tanto em plantas quanto em animais (ver revisão em Arbogast & Kenagy 2001). Esta situação é particularmente evidente na Europa, o que sugere que cada táxon pode ter reagido independentemente aos eventos de glaciação do Quaternário (Hewitt 2000).

Por outro lado, estudos de filogeografia comparada em espécies altamente associadas, como em casos de parasitismo, têm revelado que o grau de congruência filogenética aumenta com a obrigatoriedade da relação de dependência do parasita-hospedeiro. Conseqüentemente, em um nível intra-específico, pode-se assumir que os padrões filogeográficos observados entre espécies associadas ou uma relação parasítica são comumente congruentes no tempo e no espaço, desde que o parasita seja específico e obrigatório (Price 1980).

A utilização de métodos de coalescência e máxima verossimilhança (Wakeley 2003; Beerli & Felsenstein 1999)

ou a análise de clados aninhados (Templeton 1998) permitem a interpretação de padrões filogeográficos dentro de um contexto de modelos evolutivos e biogeográficos. Como resultado, a filogeografia tem se constituído em método adequado para a investigação de questões atinentes à biogeografia, incluindo os efeitos relativos de forças como deriva genética, gargalos e expansões populacionais e eventos de vicariância na modelagem de padrões geográficos da variação genética.

Desta forma, a utilização da filogeografia comparada parece ser o meio adequado para investigar a possível associação entre a história evolutiva de *Ex. smaragdina* e *El. nigrita*.

## 2. OBJETIVOS

A especiação pode envolver aspectos biológicos como divergências na escolha de habitats ou no comportamento sexual dos machos (Willians 1982), ou ainda seleção natural em resposta à competição parasita-hospedeiro. O número de espécies descritas de Euglossíneos tem aumentado a cada ano, inclusive para gêneros pouco diversos como *Exaerete*, que teve duas novas espécies descritas recentemente (Oliveira & Nemésio 2003; Anjos-Silva & Rebelo 2006), não existindo até o momento uma análise filogenética baseada em marcadores moleculares para este gênero.

Ainda para este grupo, os dados da literatura indicam que suas populações são geralmente reduzidas, com um aumento na abundância destes cleptoparasitas em direção ao Equador. Não há informações na literatura a respeito dos padrões filogeográficos de suas espécies mais abundantes (*Ex. smaragdina* e *Ex. frontalis*), ainda que elas apresentem uma grande área de distribuição (desde a América Central até a região sudeste do Brasil). O fato de suas populações serem aparentemente de tamanho reduzido e estarem dispersas por vários domínios fitogeográficos contribuiria para a sua divergência genética.

Além disso, pelo fato das espécies do gênero *Exaerete* parasitarem ninhos de outras espécies de Euglossini, como de *Eulaema nigrita* (Garófalo & Rozen 2001), *Eulaema meriana* (Nemésio & Silveira 2006) e *Eufriesea surinamensis* (Bennett 1972), um estudo de filogeografia comparada pode indicar padrões evolutivos similares, já que pode estar havendo coevolução entre parasita e hospedeiro.

Desta forma, o estudo filogenético e filogeográfico de espécies-chave dentro do grupo Euglossini, como espécies cleptoparasitas e seus hospedeiros, poderá contribuir para esclarecer questões ecológicas e evolutivas desta tribo, identificando padrões históricos de colonização, identificar respostas evolutivas a mudanças de habitat e a

pressões de seleção como predação e avaliar os contextos geográficos e ecológicos de espécies dentro de comunidades mais complexas, determinando os padrões de riqueza de espécies (Ricklefs & Schluter 1993).

Assim, este trabalho tem dois objetivos:

1 - Estabelecer e comparar os padrões filogeográficos de *Ex. smaragdina* e de sua espécie-hospedeira *El. nigrita* a partir de indivíduos coletados em diferentes domínios fitogeográficos (Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal e Floresta Amazônica), com vistas a traçar as possíveis rotas evolutivas biogeográficas de cada espécie e compará-las, a fim de testar se os padrões são ou não concordantes;

2 - Confirmar o status de espécie de *Ex. lepeletieri* e sua relação com o grupo *frontalis* mediante análises da taxonomia molecular.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Material**

O material analisado consistiu de 37 indivíduos de *Exaerete smaragdina* e 34 indivíduos de *Eulaema nigrita* de diversas localidades do Brasil, conforme descrito na Tabela 1 e Figura 6. Para a confirmação do status de espécie de *Exaerete lepeletieri* foram analisados seis exemplares descritos como sendo desta espécie, outros seis de *Exaerete frontalis*, além dos espécimes de *Ex. smaragdina* já referidos na Tabela 1.

Os espécimes analisados eram todos machos coletados em iscas-odor e enviados ao nosso laboratório em álcool ou secos. Apenas os exemplares de São Carlos e Rifaina foram coletados em ninhos de *El. nigrita* e mantidos a -20°C até o momento da extração.

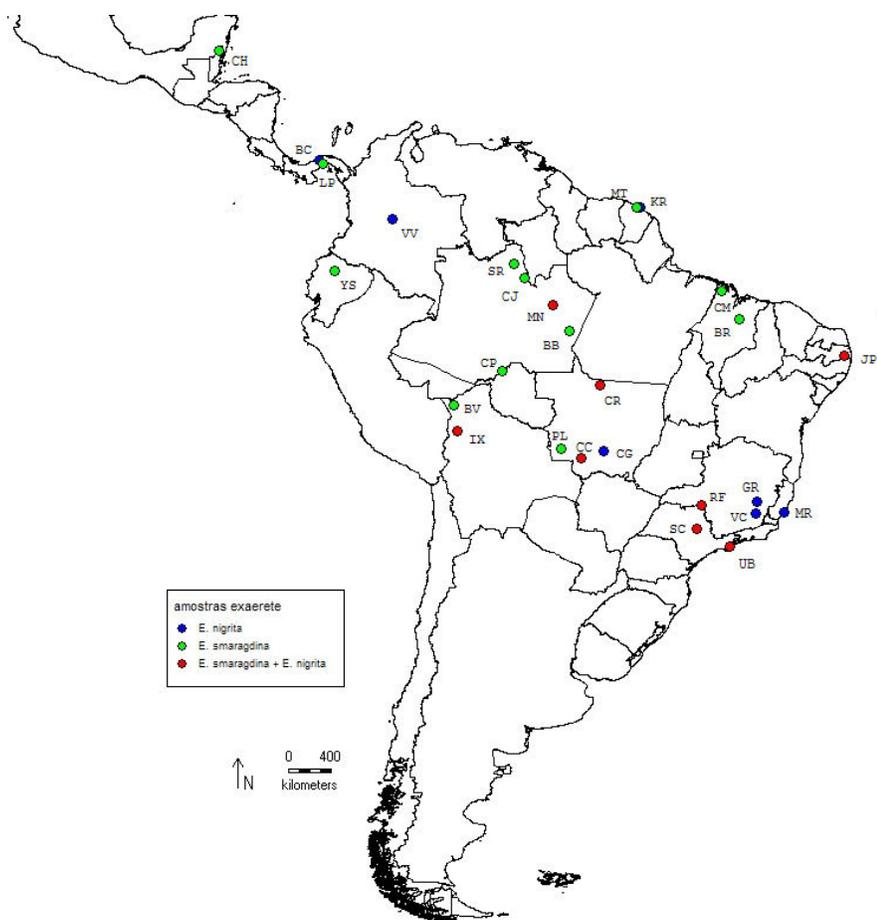
#### **3.2. Extração de DNA e amplificação**

Foi extraído o DNA total de uma perna de cada indivíduo. O método utilizado foi o de fenol/clorofórmio proposto por Sheppard & McPheron (1991), com a adição de um passo adicional de incubação do macerado por uma hora a 65°C na presença de 10µL de proteinase K (10mg/ml).

Foram amplificados via reação em cadeia da polimerase (PCR) os locos 16S, Citocromo B (CytB) e Citocromo Oxidase I (COI), utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 2.

**Tabela 1.** Localidades amostradas no presente estudo, seguidas da sigla do estado e da região geográfica, quando referentes ao Brasil, ou pelo nome do país quando não. As amostras de outros países, com exceção de Villavencio (CO), foram extraídas do trabalho de Dick et al. (2004). O código refere-se à abreviatura utilizada no mapa (Figura 6), onde as localidades estão designadas segundo sua latitude e longitude. Para cada localidade está representado o número de indivíduos analisados para cada loco e espécie.

Localidade	Região	Código	Latitude	Longitude	<i>Ex. smaragdina</i>			<i>El. nigrita</i>	
					16S	CytB	COI	CytB	COI
Ubatuba - SP	SE	UB	23°31'47"S	45°04'42"O	3	2	1	3	2
São Carlos - SP	SE	SC	21°59'04"S	47°52'43"O	5	4	2	3	3
Rifaina - SP	SE	RF	20°04'55"S	7°25'27"O	5	4	3	2	2
Guarapari - ES	SE	GR	20°39'03"S	40°30'24"O				4	2
Viçosa - MG	SE	VC	20°45'16"S	2°52'57"O				3	2
Marliéria - MG	SE	MR	9°42'47"S	42°43'57"O				3	3
Cáceres - MT	CO	CC	16°04'28"S	7°39'35"O	2	2		3	1
C. Guimarães - MS	CO	CG	15°27'10"S	55°44'21"O				2	
Pontes e Lacerda - MT	CO	PL	15°14'31"S	59°18'56"O	3	3	1		
Cristalino - MT	CO	CR	9°52'09"S	56°05'37"O	2	2	1	2	
João Pessoa - PB	NE	JP	7°08'39"S	34°51'34"O	5	5	3	3	2
Barreirinha - MA	N	BR	4°14'03"S	44°14'00"O	1	1			
Candido Mendes - MA	N	CM	1°51'37"S	45°46'10"O	1	1			
Campina - AM	N	CP	8°39'36"S	64°21'57"O	1				
Borba - AM	N	BB	5°15'09"S	58°41'52"O	2	1			
Manaus - AM	N	MN	3°06'01"S	59°58'36"O	5	5	3	3	2
Caju - AM	N	CJ	0°48'10"S	62°29'07"O	1	1			
Serrinha - AM	N	SR	0°25'09"N	63°23'00"O	1	1			
Villavencio	Colômbia	VV	4°09'26"N	73°38'14"O				3	2
<b>TOTAL</b>					<b>37</b>	<b>32</b>	<b>14</b>	<b>34</b>	<b>21</b>
Ixiamas	Bolívia	IX	13°45'26"S	68°08'40"O				1	1
Buena Vista	Bolívia	BV	11°32'41"S	68°27'50"O				1	
Yasuní	Equador	YS	0°09'34"S	78°28'54"O				1	
Kourou	G. Franc.	KR	5°09'55"N	52°38'39"O					2
Montagne Tortue	G. Franc.	MT	5°10'60"N	52°58'00"O				2	
Las Perlas	Panamá	LP	8°56'49"N	79°33'38"O				3	
Barro Colorado	Panamá	BC	9°09'17"N	79°50'53"O					2
Chetumal	México	CH	18°30'13"N	88°18'19"O				1	
<b>TOTAL</b>								<b>9</b>	<b>5</b>



**Figura 6.** Mapa com as localidades amostradas neste trabalho. Os códigos referem-se ao nome de cada localidade, referidas na Tabela 1.

As reações de amplificação foram preparadas em volume final de 25 $\mu$ L contendo 250 $\mu$ M de cada dNTP, 5mM de MgCl<sub>2</sub> para os locos 16S e COI e 2,5mM para o loco CytB, 1 $\mu$ M de cada primer (F e R), tampão 1x, 1U de Taq DNA polimerase (Platinum - Invitrogen) e 1 $\mu$ L de solução de DNA (40-70 ng).

As condições de PCR utilizadas foram:

\***16S**: 1 ciclo de 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 20s, 52°C por 20s e 72°C por 1 min.

\***CytB**: 35 ciclos de 94 °C por 30s, 56 °C por 20s e 72 °C por 1 min.

\***COI**: 4 ciclos de 94° por 30s, 48° por 30s e 72° por 1min, seguido de 35 ciclos de 94° por 30s, 52° por 30s e 72° por 45s.

Para a verificação do resultado da amplificação, os fragmentos foram visualizados em géis de agarose a 1%.

**Tabela 2.** Primers utilizados para amplificação por PCR dos locos analisados neste trabalho e seus respectivos autores.

<b>Loco</b>	<b>Foward</b>	<b>Autor</b>	<b>Reverse</b>	<b>Autor</b>
16S	874-16S	Cameron <i>et al.</i> 1992	16SWb	Dowton & Austin 1994
CytB	CR091A	Crozier <i>et al.</i> 1991	CR091B	Crozier <i>et al.</i> 1991
COI	COI-F	Dick <i>et al.</i> 2004	COI-R	Dick <i>et al.</i> 2004

### **3.3. Seqüenciamento do DNA mitocondrial.**

Os produtos de amplificação foram purificados utilizando 1U de SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, GE) e 10U de *ExoI* (Exonuclease I, GE) para cada 8µL de produto de PCR. A mistura foi incubada a 37°C por 1 hora a 80°C por 15 minutos.

A reação de seqüenciamento foi feita com 2µL de Dyenamic ET Dye premix (GE Healthcare), 10pmoles de cada primer, aproximadamente 50ng de DNA e água para completar 10µL de volume final. As seqüências *forward* e *reverse* foram obtidas em seqüenciador automático MegaBace 750-GE e os eletroferogramas analisados no programa CodonCode Aligner versão 1.6.3 (CodonCode, Dedham, Massachusetts, United States). Após correção, as seqüências foram alinhadas pelo programa Clustal X (Thomson *et al.* 1997), disponível no software BioEdit versão 7.0.5 (Hall 1999).

### **3.4. Análises populacionais**

Seqüências com, pelo menos, um sítio polimórfico foram consideradas um haplótipo diferente. Foram estimados os seguintes parâmetros genéticos: composição nucleotídica,

diversidade nucleotídica (Nei 1987), diversidade haplotípica (Nei 1987) e número médio de variações, implementados no programa Arlequin 3.0 (Excoffier et al., 2005).

Com o mesmo software, foram efetuados também os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima 1989) e  $F_s$  de Fu (Fu 1996) para as duas espécies e para os locos analisados. Estes testes examinam se há desvios significantes do equilíbrio genético para o DNA mitocondrial, os quais podem indicar eventos populacionais em situações onde não ocorrem vantagens seletivas entre os haplótipos, ou seleção positiva e purificadora (Simonsen et al. 1995) quando há diferenças adaptativas entre os alelos.

Para efeitos como expansão populacional, tem sido sugerido o uso de testes como o teste D de Tajima e o teste  $F_s$  de Fu, por serem mais sensíveis a este tipo de evento (Fu 1997). O teste de Tajima compara o número de sítios segregantes com a diversidade nucleotídica, enquanto o teste de Fu leva em conta a polaridade das mutações (isto é, qual o possível haplótipo ancestral e o seu derivado), e estima  $\theta$  baseado no número de mutações únicas derivadas (*singletons*).

Análises de estruturação e subdivisão das populações foram estimadas por  $F_{st}$  par-a-par entre as populações (Cockerham & Weir 1993) e de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992) entre as 4 regiões amostradas (Sudeste, Nordeste, Amazônia e Pantanal). A AMOVA estima a partição da variância em diferentes níveis de estruturação populacional, por meio de estatística phi ( $\Phi$ ):  $\Phi_{CT}$  sendo uma medida de diferenciação entre as regiões,  $\Phi_{SC}$  de sub-estruturação dentro das regiões e  $\Phi_{ST}$  uma medida de diferenciação entre as populações depois de verificada a diferenciação entre as regiões. A significância dos componentes de variância foi medida empiricamente

(Excoffier *et al.* 1992), conforme implementado no programa Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.* 2005).

### **3.5. Análises filogeográficas**

Para as análises filogeográficas do loco COI, as seqüências descritas por Dick *et al.* (2004) para as espécies *Ex. smaragdina* (N<sup>os</sup> de acesso: AY506470-78) e *El. nigrita* (N<sup>os</sup> de acesso: AY506452-56) foram utilizadas.

Para cada loco seqüenciado foi realizada uma análise filogenética pelo método de Neighbour-Joining, segundo o modelo de máxima verossimilhança composta, com 5.000 re-amostragens. Dada a baixa variabilidade encontrada entre os indivíduos, os locos foram concatenados (16S, CytB e COI para *Ex. smaragdina* e CytB e COI para *El. nigrita*), e uma nova análise filogenética foi realizada.

A utilização de seqüências concatenadas é sugerida, entre outros, por Gadagkar *et al.* (2005). Segundos estes autores, a união de seqüências de um segundo gene aumenta substancialmente a acurácia de inferências filogenéticas, mesmo quando não é feita uma aproximação dos padrões de substituição gene-específica na inferência. A utilização de genes mitocondriais apresenta ainda a vantagem de não ocorrer recombinação gênica, diferentemente dos genes nucleares.

Foram feitas redes de haplótipos baseadas no método de parcimônia estatística (Templeton 1995; 2002) através do software TCS (versão 1.13 - Clemente *et al.* 2000). Este método provê uma estimativa do número máximo de diferenças entre haplótipos como resultado de substituições simples com uma confiabilidade estatística de 95% (Posada & Crandall 2001). As redes foram, então, aninhadas manualmente seguindo as regras propostas por Templeton & Sing (1993).

### **3.6. Análises filogenéticas de *Ex. lepeletieri***

Para a confirmação do status de espécie de *Exaerete lepeletieri* foram analisados os locos 16S e CytB. Foram realizadas análises de diversidade nucleotídica (Nei 1987) entre os indivíduos da mesma espécie e entre as espécies. Além disso, foi feita a análise de Fst par-a-par (Cockerham & Weir 1993) entre as espécies.

A análise filogenética foi feita pelo método de Neighbour-Joining, seguindo o modelo de máxima verossimilhança composta, com 5.000 re-amostragens.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Devido ao longo tempo de estocagem de algumas das amostras, a qualidade do DNA extraído e das reações de amplificação não foi homogênea. Alguns dos exemplares não apresentaram bom rendimento nas reações de amplificação e, conseqüentemente, de seqüenciamento, seja para um loco em particular, seja para todos. Neste último caso, o espécime não foi sequer considerado na amostragem, de forma a evitar resultados espúrios que prejudicariam a consistência das conclusões finais do presente estudo.

De forma a organizar a apresentação dos resultados, estes serão relatados na seguinte seqüência: estimativas de diversidade genética das populações de *Ex. smaragdina*, a filogeografia e a estruturação genética de suas populações. Após, seguem as mesmas análises para a espécie *Eulaema nigrita* e a comparação dos padrões observados entre as duas espécies. Por fim, é feita a análise filogenética para a confirmação do *status* de espécie de *Exaerete lepeletieri*.

### **4.1. Diversidade genética das populações de *Exaerete smaragdina***

A composição nucleotídica dos locos de *Ex. smaragdina* mostrou-se similar à reportada para o DNA mitocondrial de outras espécies de abelhas corbiculadas, com uma elevada proporção de adenina-timina e baixo conteúdo de citosina-guanina (Tabela 3).

A diversidade nucleotídica observada para *Ex. smaragdina* foi de 0,31% para o loco 16S e 0,48% para CytB, (Tabela 4). Estes valores são próximos aos verificados em outros estudos filogeográficos de insetos da América do Sul, variáveis entre 0,37% e 0,65% (Brito *et al.* 2002; Scarpassa *et al.* 2008, respectivamente). Estes valores aumentaram quando amostras de outros países da América do Sul e Central, analisadas por Dick *et al.* (2004), foram

adicionadas à análise. Para esta amostragem, foram observados 10 haplótipos e uma diversidade nucleotídica de 0,84%, maiores do que os observados para os outros dois locos analisados.

**Tabela 3.** Composição nucleotídica dos locos 16s, Citocromo B e COI para *Exaerete smaragdina*.

Loco	A	T	C	G
<b>16S</b>	39,52%	41,57%	11,99%	6,92%
<b>CytB</b>	34,25%	46,47%	11,40%	7,88%
<b>COI</b>	32,89%	42,72%	9,48%	14,91%

Os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima 1989) e Fs de Fu (Fu 1996) não tiveram suporte estatístico ( $p > 0,05$ ), exceto para a estatística D para o loco 16S (Tabela 5). Segundo Simonsen *et al.* (1995), o teste D de Tajima tem bom poder de detectar eventos demográficos como estruturação populacional, enquanto o teste Fs de Fu demonstra ser mais sensível a eventos como expansão populacional recente. Estas considerações quanto à natureza de cada teste podem ser uma explicação para a significância do teste D (estruturação) e não significância do teste Fs (ausência de alelos raros - expansão recente) para o loco 16S.

**Tabela 4.** Índices de diversidade gênica (variância) para os locos analisados em *Exaerete smaragdina*.

Loco	Nº de haplótipos	Diversidade haplotípica	Diversidade nucleotídica	Nº médio de variações
16S	5	0.664 (0.046)	0.003 (0.002)	1.426 (0.891)
Cyt.B	6	0.662 (0.053)	0.005 (0.003)	1.763 (1.051)
COI	10	0.840 (0.056)	0.008 (0.005)	3.540 (1.863)

Os testes de neutralidade para *Exaerete smaragdina* suportam, portanto, a hipótese de evolução neutra para as populações desta espécie, indicando não ter havido nenhum grande evento de expansão ou retração demográfica recente para a espécie.

**Tabela 5.** Valores obtidos para os testes de neutralidade de Tajima (D) e Fu (Fs) e os respectivos valores de P (entre parênteses) para os três locos analisados de *Exaerete smaragdina*.

<b>Loco</b>	<b>D de Tajima</b>	<b>Fs de Fu</b>
16S	<b>-1.950 (0.01)</b>	0.574 (0.65)
Cyt.B	0.493 (0.72)	0.065 (0.55)
COI	-0.157 (0.51)	-1.344 (0.28)

#### **4.2. Estrutura genética e filogeografia das populações de *Exaerete smaragdina***

A análise filogenética feita a partir dos locos individualmente demonstrou baixa resolução, devido ao baixo número de sítios polimórficos, consequência do curto tempo de divergência esperado dentro de uma espécie (Figura 7).

No entanto, o loco 16S evidenciou a formação de dois grupos que podem estar fortemente associados à origem geográfica dos espécimes. O primeiro cluster reúne as amostras provenientes de João Pessoa (PB), aparentemente mais relacionadas às amostras do Norte e Centro-Oeste do Brasil. Estas últimas, no entanto, apresentam uma formação polifilética. O outro cluster reúne as amostras oriundas do Estado de São Paulo, com exceção de uma única amostra do Maranhão (Barreirinha).

Por outro lado, o loco citocromo B não possui resolução suficiente para formação dos dois clados citados, mas sim para agrupar as amostras do Norte e Centro-Oeste, com exceção novamente da amostra de Barreirinhas e uma amostra de Manaus.

Dentre os três locos, COI foi o mais informativo, dada a inclusão das seqüências de Dick *et al.* (2004). Um dado interessante a se destacar é a formação de um clado irmão às amostras de São Paulo e da Paraíba, formado pelas amostras do México e Panamá. Considerando a origem geográfica destas amostras, esperar-se-ia que elas estivessem mais intimamente relacionadas às amostras da Amazônia ou Equador. Infelizmente, não há dados na

literatura para amostras da América Central referentes aos locos 16S e CytB.

Para as amostras aqui analisadas, a junção das três seqüências gênicas em uma única seqüência composta de 1246pb evidenciou uma maior estruturação populacional, com a formação de três grupos bem definidos: São Paulo e Paraíba, mais próximos entre si, o que pode indicar uma possível rota evolutiva da espécie pela Mata Atlântica e um outro clado formado por Amazônia + Centro-Oeste, novamente duas regiões que podem compartilhar a mesma rota evolutiva (Figura 8).

As redes de haplótipos para os locos 16S e CytB, dado o baixo número de sítios mutacionais que cada loco apresentou, não trouxe nenhuma informação além das observadas pelas reconstruções filogenéticas, ou seja, grupos regionais bem delimitados, mas incertezas na conectividade entre um grupo e outro (dados não apresentados).

Para o loco COI, dado o maior número de amostras, foi possível observar a formação de seis grupos (1-1 a 1-6), inseridos em três grupos maiores (2-1 a 2-3) (Figura 9). Destes, o grupo 1-4 foi o único que uniu amostras de localidades separadas por grandes distâncias (Manaus, Bolívia, Guiana Francesa, Equador e Pantanal de Cáceres e Pontes e Lacerda). Os dados indicam que a região amazônica, em geral, apresenta uma homogeneidade muito grande, corroborando e ampliando o significado dos resultados de Dick *et al.* (2004).

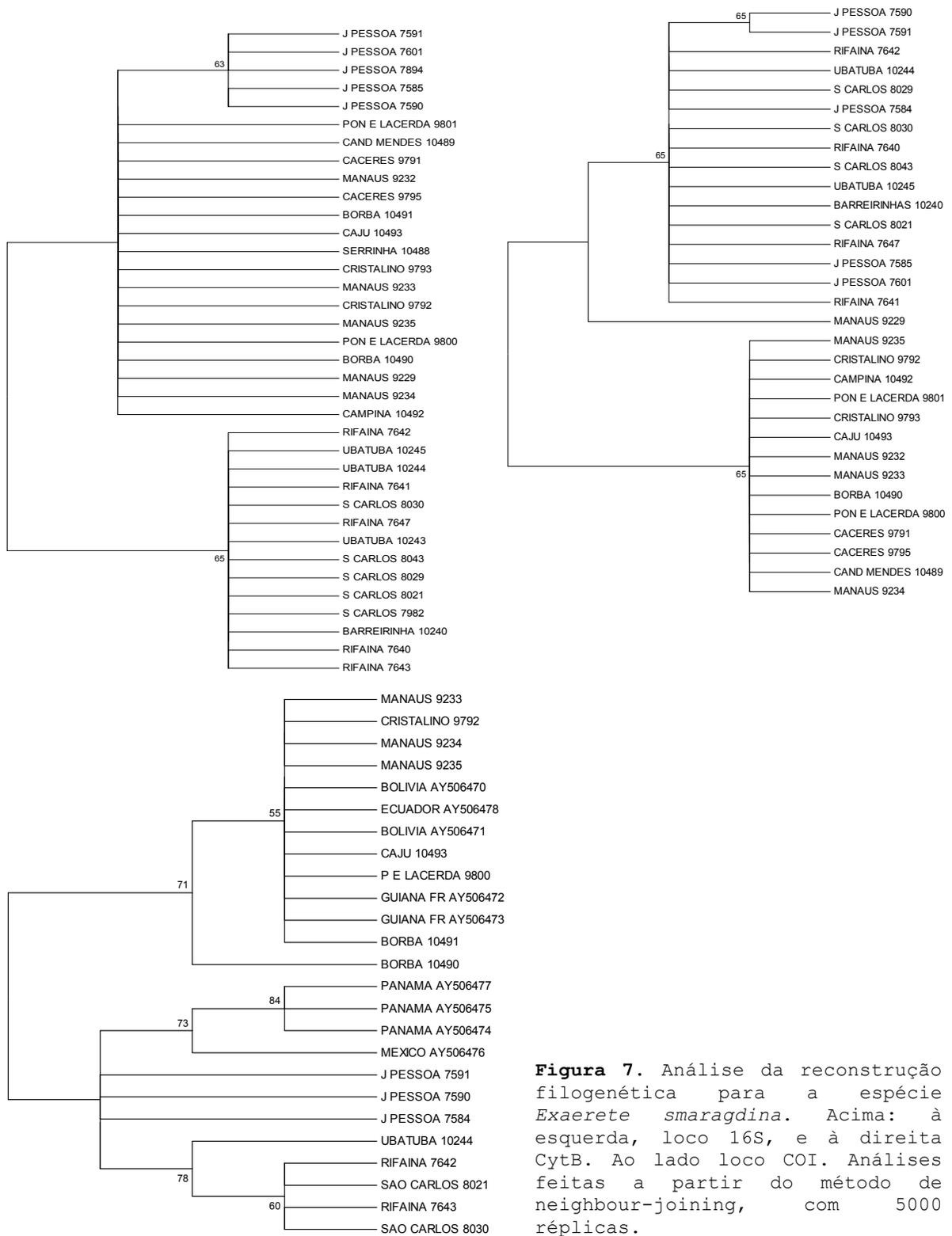
O grupo 2-1 foi caracterizado pelas amostras de localidades onde originalmente havia uma cobertura de Mata Atlântica (João Pessoa e localidades do estado de São Paulo), cada qual, no entanto, formando um subgrupo distinto, com polimorfismos particulares. Tal subdivisão pode ser um possível reflexo de isolamento por distância, ou ainda de um efeito de deriva dado o grande desmatamento

deste bioma. Uma amostragem em localidades intermediárias pode ajudar a aclarar os padrões observados.

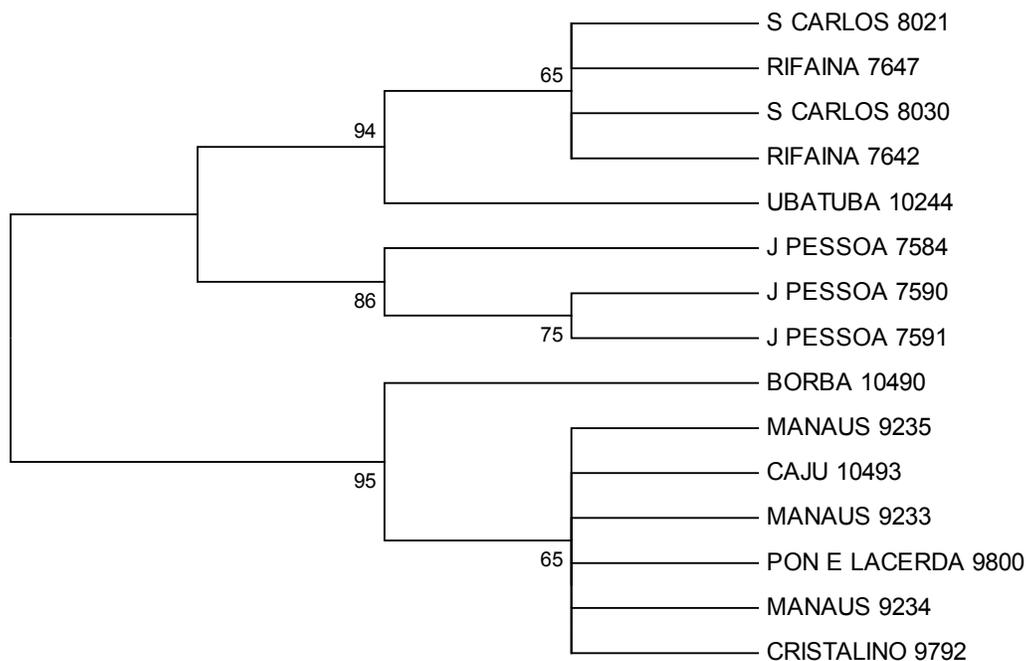
Esta disjunção filogenética entre a Mata Atlântica (Grupo 2-1) e os biomas Pantanal e Amazônia (Grupo 2-2) apresentam concordância com relatos da literatura para outros grupos de animais como insetos, pequenos mamíferos e morcegos (Costa 2002; Hoffmann & Baker 2003).

O aninhamento dos haplótipos de COI demonstrou ainda que as amostras do Panamá e do México (grupo 2-3 - Figura 9) têm maior proximidade com as amostras da Mata Atlântica do que com a floresta amazônica, apesar da maior proximidade geográfica com este último grupo, corroborando a reconstrução filogenética.

Sabe-se que algumas espécies colonizaram a América Central migrando ao redor da floresta amazônica, e não a atravessando. O caso mais bem estudado refere-se ao processo de africanização de *Apis mellifera* (Oliveira & Cunha 2005), porém, deve-se ponderar que esta é uma espécie exótica. Um estudo com mais amostras deve ser conduzido para uma verificação mais segura da rota de colonização de *Ex. smaragdina* em direção à América Central.

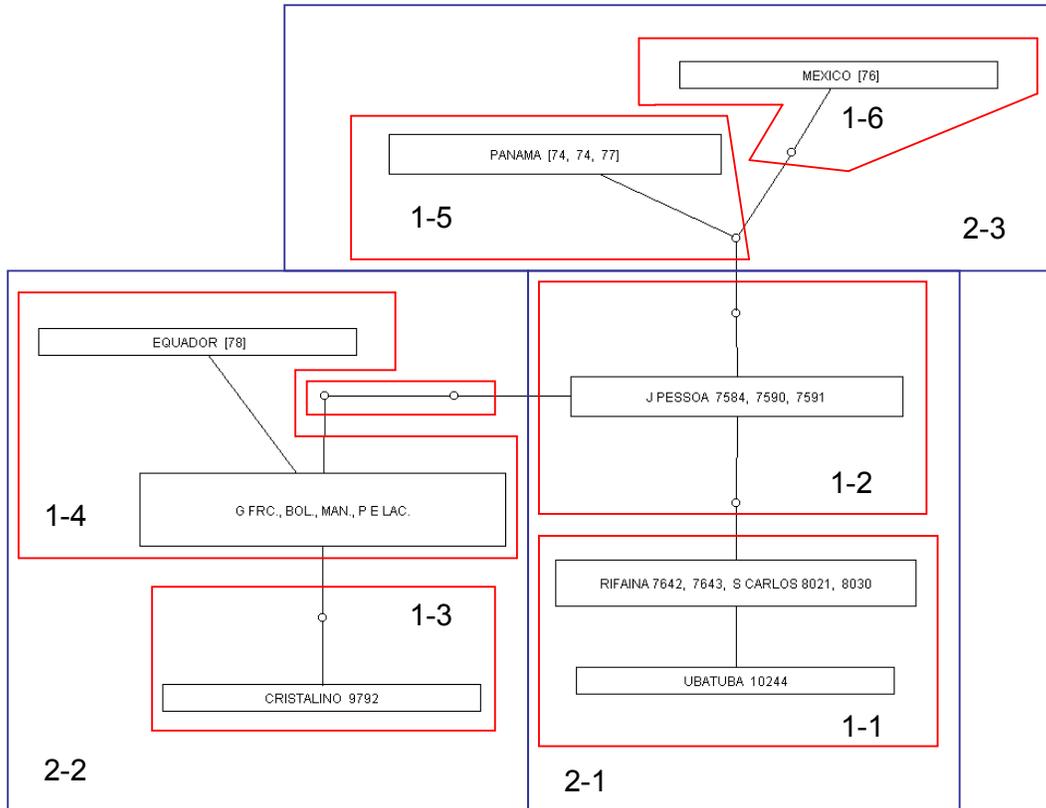


**Figura 7.** Análise da reconstrução filogenética para a espécie *Exaerete smaragdina*. Acima: à esquerda, loco 16S, e à direita CytB. Ao lado loco COI. Análises feitas a partir do método de neighbour-joining, com 5000 réplicas.



**Figura 8.** Análise filogenética de Neighbour-Joining (5000 réplicas) para os locos 16S, CytB e COI concatenados (1246pb) de *Exaerete smaragdina*.

Para a confirmação dos resultados filogeográficos obtidos foram feitas análises de estatística F (Fst e AMOVA) entre as populações de cada localidade. Para tais análises, os resultados do loco COI foram desconsiderados. Este loco apresentou algumas dificuldades de seqüenciamento, e apenas uma ou duas amostras de cada localidade puderam ser seqüenciadas. Como o intuito das análises seguintes era analisar a estruturação populacional, e não o processo evolutivo da espécie (como na análise filogenética), optou-se por considerar apenas os locos 16S e CytB concatenados.



**Figura 9.** Análise de clados aninhados para o loco COI de *Exaerete smaragdina*.

A AMOVA, estruturada entre as quatro regiões geográficas amostradas (Sudeste, Nordeste, Pantanal e Amazônia), confirmou a estrutura hierárquica ao nível de região, que demonstrou ser responsável por 76.35% da variação ( $\Phi_{CT} = 0.76351$ ,  $p < 0,01$ ). O restante da variação (23,65%) ficou dividida entre as populações dentro de regiões (9.74%, com  $\Phi_{SC} = 0.41197$  e  $p$  não significativo) e entre as populações (13.91%, com  $\Phi_{ST} = 0.86094$  e  $p < 0,0001$ ) (Tabela 6).

A análise do  $F_{st}$  par-a-par não evidenciou nenhum novo resultado, apenas confirmando a homogeneidade dentro das regiões, com a Amazônia e o Pantanal não significativamente diferentes entre si, e a heterogeneidade entre as demais (dados não apresentados).

**Tabela 6.** Valores obtidos para a AMOVA a partir da concatenação dos locos 16S e CytB para *Exaerete smaragdina*.

<b>Tipo de variação</b>	<b>Componentes da variação</b>	<b>Porcentagem de variação</b>	<b>Estatística Phi</b>	<b>P</b>
Entre grupos	1.2756 Va	76.35	$\Phi_{CT} = 0.766$	0.0059
Entre populações dentro de grupos	0.1628 Vb	9.74	$\Phi_{SC} = 0.412$	0.1007
Entre populações	0.2323 Vc	13.91	$\Phi_{ST} = 0.861$	<0,0001

#### **4.3. Diversidade genética das populações de *Eulaema nigrita***

Por dificuldades técnicas ainda não identificadas, não foi possível obter seqüências confiáveis do loco 16S em *El. nigrita*, apesar do bom rendimento obtido nas reações de amplificação.

A composição nucleotídica dos locos COI e CytB foram muito semelhantes às obtidas para *Ex. smaragdina*, como esperado, dada a proximidade filogenética entre as espécies (Tabela 7).

**Tabela 7.** Composição nucleotídica dos locos Citocromo B e COI para *Eulaema nigrita*.

<b>Loco</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>
<b>CytB</b>	35,37%	47,07%	9,91%	7,66%
<b>COI</b>	30,57%	44,94%	10,29%	14,20%

Os índices de diversidade genética encontrados em *Eulaema nigrita* foram menores que os de *Ex. smaragdina* para ambos os locos (Tabela 8), mesmo com a adição de amostras de Viçosa, Marliéria, Guarapari e Villavencio, localidades não amostradas para *Ex. smaragdina*.

**Tabela 8.** Índices de diversidade gênica (variância) para os locos analisados em *Exaerete smaragdina*.

Loco	Nº de haplótipos	Diversidade haplotípica	Diversidade nucleotídica	Nº médio de variações
Cyt.B	5	0,377 (0,011)	0,002 (0,002)	0,920 (0,653)
COI	7	0,597 (0,107)	0,003 (0,002)	1,033 (0,714)

Quanto aos testes de neutralidade, tanto o teste de Tajima quanto o de Fu apresentaram valores negativos para o loco CytB, porém a significância destes testes ficou pouco acima do valor de corte de 5%. No entanto, para o loco COI, que apresenta uma taxa evolutiva maior do que CytB (Mueller 2006) e, portanto, mais informativo, apresentou valores negativos e significativos para ambos os testes (Tabela 9).

Se a violação da neutralidade observada for devida a eventos populacionais, como um gargalo genético ou expansão recente, ela deve afetar igualmente substituições sinônimas (dS) e não sinônimas (dNS). Tal fato pode ser observado em nossas amostras, não havendo desvios significativos de dNS/dS ( $P = 0.065$  para CytB, e  $P = 0,204$  para COI, teste Z de seleção com  $H_0$  dNS=dS segundo o modelo de substituição de Nei-Gojobori).

**Tabela 9.** Valores obtidos para os testes de neutralidade de Tajima (D) e Fu (Fs) e seus respectivos valores de p para os dois locos analisados de *Eulaema nigrita*.

Loco	D de Tajima	Fs de Fu
Cyt.B	-1.347 (P = 0.081)	-0.746 (P = 0.067)
COI	<b>-1.873 (P = 0.019)</b>	<b>-3.037 (p = 0.008)</b>

A pequena amostragem para cada localidade pode influenciar os resultados, dado que existe uma tendência de se observar mais polimorfismos neste tipo de amostragem do que em grandes amostragens de uma única ou poucas localidades (Rand et al. 1994). Isso pode reduzir a capacidade de identificar as forças evolutivas atuantes,

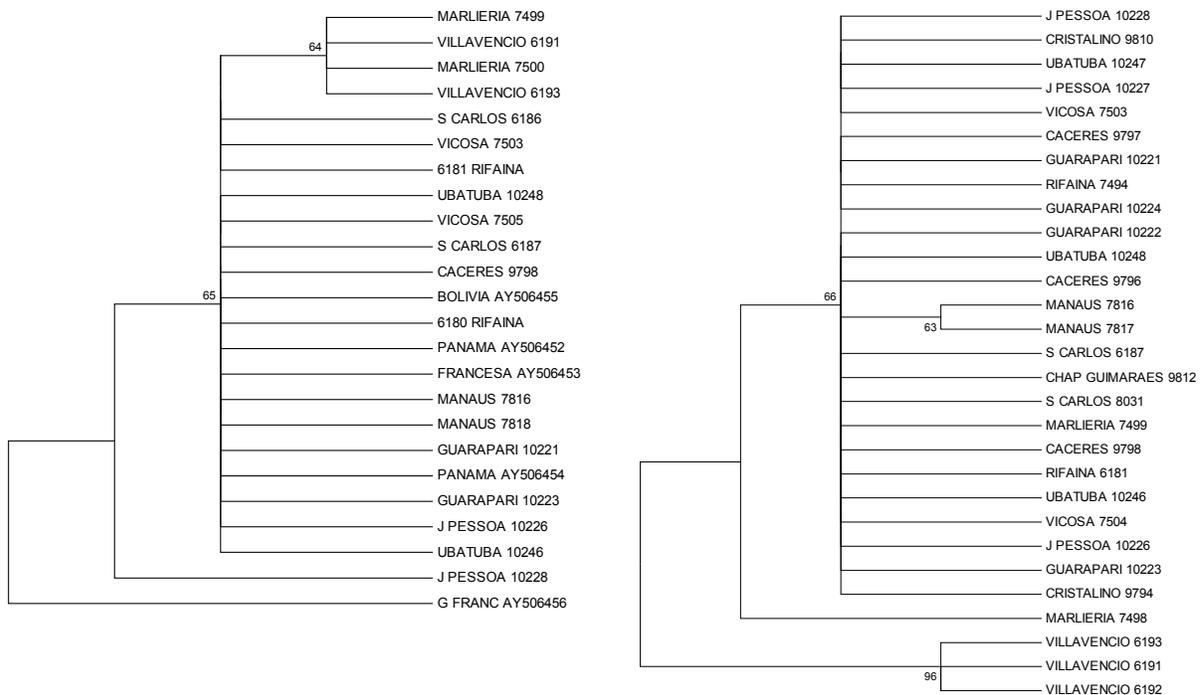
pois alguns haplótipos podem ser comuns em algumas localidades em razão do pequeno número de indivíduos amostrados e que, portanto, aparecem eles mesmos como *singletons*, ou seja, únicos exemplares de seu haplótipo (Schmid *et al.* 1999). No entanto, pudemos evidenciar que o mesmo haplótipo está presente em praticamente todas as localidades amostradas (Figuras 12 e 13), mesmo distantes mais de 2.000 km entre si. Estes dados, apoiados no resultado do teste de AMOVA, a serem apresentados, evidenciam que existe uma homogeneidade significativa em nossa amostragem (maior parte da variação compartilhada entre as populações), diminuindo a possibilidade de resultados espúrios dos testes de neutralidade.

#### **4.4. Estrutura genética e filogeografia das populações de *Eulaema nigrita***

A baixa variabilidade genética encontrada em *El. nigrita* refletiu na reconstrução filogenética da espécie.

Assim sendo, para o loco CytB, 26 dos 34 indivíduos analisados, distribuídos por toda área de amostragem apresentaram exatamente a mesma seqüência, com um cenário semelhante observado para o loco COI.

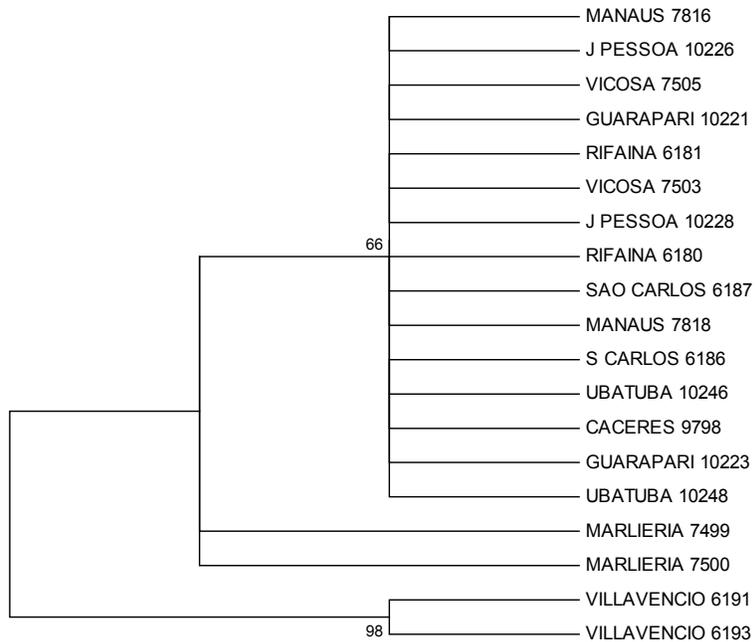
Nos dois locos analisados, os poucos ramos formados não foram capazes de agrupar os indivíduos segundo sua origem biogeográfica, com exceção de um clado monofilético para as amostras de Villavencio (CO) considerando o loco CytB (Figura 10). Mesmo com os dois locos concatenados, formando uma única seqüência de 832pb, e uma diversidade haplotípica igual a 0,725, não foi possível uma reconstrução filogenética estatisticamente bem suportada (Figura 11).



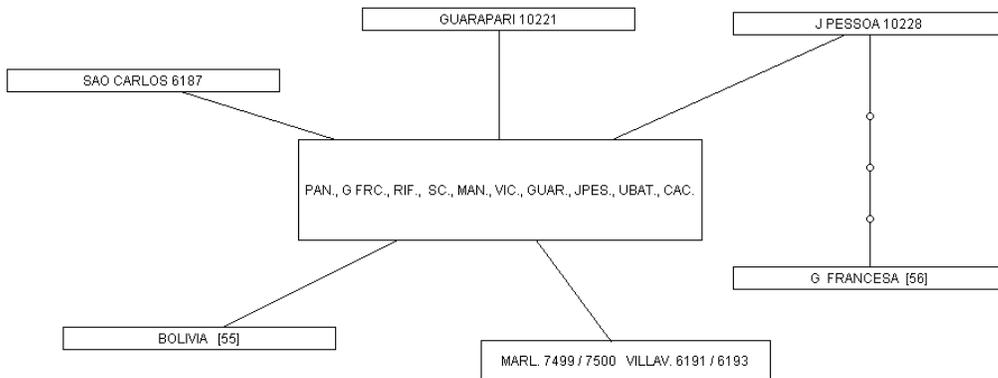
**Figura 10.** Análise da reconstrução filogenética para a espécie *Eulaema nigrita*. À esquerda, loco COI, e à direita CytB. Análises feitas a partir do método de neighbour-joining, com 5000 réplicas.

As redes de haplótipos também refletem a baixa estruturação encontrada, não havendo a formação de grupos que possam ser associados à origem geográfica das amostras. As únicas exceções são as amostras da Guiana Francesa para o loco COI (Figura 12) e de Villavencio (Colômbia) para o loco CytB (Figura 13), que apresentaram uma maior distância genética em relação ao haplótipo mais freqüente.

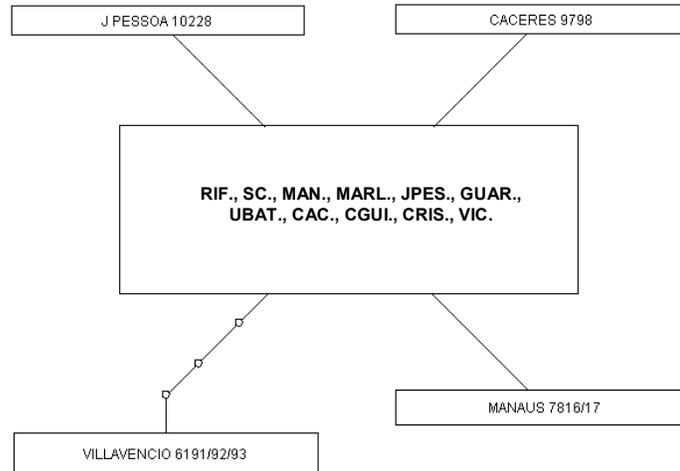
A uniformidade dos haplótipos mitocondriais através de uma grande extensão geográfica, com as redes de haplótipos em formato de estrela, como observado, suporta a hipótese de uma expansão demográfica recente, ou uma curta história evolutiva para as populações, como relatado para outros organismos (Liu *et al.* 2005; Mirol *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2008).



**Figura 11.** Análise filogenética de Neighbour-Joining (5000 réplicas) para os locos CytB e COI concatenados (832pb) de *Eulaema nigrita*.



**Figura 12.** Análise de clados aninhados para o loco COI de *Eulaema nigrita*: (PAN: Panamá, G FRC: Guiana Francesa, RIF: Rifaina, SC: São Carlos, MAN: Manaus, VIC: Viçosa, GUAR: Guarapari, JPES: João Pessoa, UBAT: Ubatuba, CAC: Cáceres).



**Figura 13.** Análise de clados aninhados para os loco CytB de *Eulaema nigrita*. (RIF: Rifaina, SC: São Carlos, MAN: Manaus, MARL: Marliéria, JPES: João Pessoa, GUAR: Guarapari, UBAT: Ubatuba, CAC: Cáceres, CGUI: Chapada dos Guimarães, CRIS: Cristalino, VIC: Viçosa).

Na análise de  $F_{st}$ , as populações (agrupadas da mesma forma que para *Ex. smaragdina*) não foram significativamente diferentes umas das outras (dados não apresentados), e a AMOVA evidenciou que a maior parte da variação é compartilhada entre as populações dentro dos grupos (72,28%,  $p < 0,0001$ ) e entre todas as populações (30,25%,  $p = 0,025$ ) (Tabela 10). Estes dois testes demonstraram, mais uma vez, não haver estruturação nas populações de *El. nigrita* analisadas.

**Tabela 10.** Valores obtidos para a AMOVA a partir dos locos concatenados COI e CytB para *Eulaema nigrita*.

Tipo de variação	Componentes da variação	Porcentagem de variação	Estatística Phi	P
Entre grupos	-0.023 Va	-2.53	$\Phi_{CT} = -0.025$	0.389
Entre populações dentro de grupos	0.664 Vb	72.28	$\Phi_{SC} = 0.704$	0.025
Entre populações	0.278 Vc	30.25	$\Phi_{ST} = 0.697$	<0,0001

É sugerido na literatura que *Eulaema nigrita* seja uma espécie característica de ambientes abertos e/ou perturbados (Morato *et al.* 1992; Peruquetti *et al.* 1999), sendo considerada uma espécie generalista. A elevada presença de *El. nigrita* em pequenos fragmentos de mata (Tonhasca 2002) e em ambientes urbanos (López-Uribe *et al.* 2008) pode ser um indício de que houve uma grande expansão populacional desta espécie nos últimos 500 anos, quando o território brasileiro começou a ser devastado pelos colonizadores. Este processo certamente foi mais acentuado no último século, quando houve um grande aumento nas fronteiras agrícolas no Centro-Oeste, na expansão extrativista na Amazônia e o grande crescimento urbano na Mata Atlântica, que hoje conta com apenas 8% de sua cobertura original.

#### **4.5. Comparação entre os aspectos filogeográficos de *Ex. smaragdina* e sua hospedeira *El. nigrita*.**

A ausência de estruturação genética em *El. nigrita* e a aparente expansão geográfica recente contrastam com as populações estruturadas e aparentemente mais antigas de *Ex. smaragdina*.

Apesar de haver evidências esparsas de outras espécies sendo parasitadas por *Ex. smaragdina*, os dados nos levam a concluir que a associação entre *El. nigrita* e *Ex. smaragdina* é relativamente recente, e que, quer em passado remoto ou recente, outras espécies além de *El. nigrita* foram parasitadas, pois não se pode sustentar a hipótese de populações de *Ex. smaragdina* estarem presentes em uma localidade antes de sua hospedeira.

Outra possibilidade seria considerar uma taxa evolutiva maior para a espécie parasita, como já foi evidenciado em outras relações de mesma natureza. Hafner *et al.* (1994), estudando a relação entre uma espécie de roedores e seus

ectoparasitas, encontraram uma taxa evolutiva três vezes maior para o loco COI na espécie parasita, tanto em mutações sinônimas quanto não sinônimas, quando comparada à de seu hospedeiro. Resultados correlatos também foram encontrados em Hymenoptera por Downton & Autin (1995).

Resultados inconsistentes em filogenias de sistemas parasita-hospedeiro podem ocorrer por diferentes mecanismos entre os quais a mudança de hospedeiro (Page 1994; Paterson & Gray 1997; Page & Charleston 1998).

Baseado na premissa de que o sucesso do parasitismo é parcialmente dependente de densidade e que espécies parasitas sejam ausentes ou pouco frequentes em locais onde os parasitas não estão presentes (Weislo 1987), Nemésio & Silveira (2006) concluíram que *El. nigrita* não deve ser a única espécie parasitada por *Ex. smaragdina*, sugerindo que *El. meriana* possa ser uma hospedeira alternativa onde as duas espécies ocorrem em simpatria.

Esta parece ser a explicação mais plausível para os resultados observados, podendo ser *El. nigrita* uma nova hospedeira de *Ex. smaragdina*, ou ainda sua hospedeira original, mas não exclusiva.

Uma análise com uma maior amostragem e com outras possíveis hospedeiras (como *El. meriana*) podem revelar padrões filogeográficos mais acurados e uma possível explicação histórica para as associações cleptoparasíticas desta espécie.

#### **4.6. Análise do status de espécie de *Exaerete lepeletieri* baseado em caracteres genéticos**

Para acessar a diferenciação genética de *Ex. lepeletieri* em relação às duas espécies que lhe são mais próximas filogeneticamente foram seqüenciados os locos CytB e 16S.

A diversidade nucleotídica em *Ex. lepeletieri* para o loco 16S foi semelhante à reportada para as populações de

*Ex. smaragdina*. Para o loco CytB, no entanto, *Ex. lepeletieri* apresentou um valor cerca de duas vezes maior de diversidade nucleotídica, com um número médio de variações nucleotídicas igualmente maior para este loco. Para *Ex. frontalis* não foram observados polimorfismos nos dois locos analisados (Tabelas 11 e 12).

Os índices de diversidade genética entre as espécies demonstram que *Ex. lepeletieri* é mais próxima filogeneticamente de *Ex. frontalis*, enquanto as análises de Fst demonstraram que as três espécies analisadas são diferentes entre si (valores significativos de P) (Tabelas 13 e 14).

**Tabela 11.** Diversidade genética (desvio padrão, 5.000 reamostragens) observada para as 3 espécies para 364pb do gene mitocondrial Citocromo B.

<b>Espécie</b>	<b>Diversidade nucleotídica</b>	<b>Nº médio de variações</b>
<i>Exaerete lepeletieri</i>	0.011 (0,007)	3.800 (2.294)
<i>Exaerete frontalis</i>	Sem polimorfismo	Sem polimorfismo
<i>Exaerete smaragdina</i>	0.005 (0.003)	1.7634 (1.051)

**Tabela 12.** Diversidade nucleotídica e número médio de substituições (desvio padrão, 5.000 reamostragens) observada para as três espécies para 463pb do gene mitocondrial 16S.

<b>Espécie</b>	<b>Diversidade nucleotídica</b>	<b>Nº médio de variações</b>
<i>Exaerete lepeletieri</i>	0.003 (0.002)	1.238 (0.885)
<i>Exaerete frontalis</i>	Sem polimorfismo	Sem polimorfismo
<i>Exaerete smaragdina</i>	0.003 (0.002)	1.426 (0.891)

**Tabela 13. Diagonal inferior:** Diversidade genética (Desvio padrão, 5.000 re-amostragens) observada entre as 3 espécies para 364pb do gene

mitocondrial Citocromo B. **Diagonal superior:** Fst par-a-par (Desvio padrão, 5.000 re-amostragens) observada entre as 3 espécies para 364pb do gene mitocondrial Citocromo B.

	<i>Ex. lepeletieri</i>	<i>Ex. frontalis</i>	<i>Ex. smaragdina</i>
<i>Ex. lepeletieri</i>		0.916 (p<0,001)	0.929 (p<0,0001)
<i>Ex. frontalis</i>	0.020 (0.010)		0.917 (p<0,0001)
<i>Ex. smaragdina</i>	0.052 (0.037)	0.060 (0.050)	

**Tabela 14. Diagonal inferior:** Diversidade genética (Desvio padrão, 5.000 re-amostragens) observada entre as 3 espécies para 463pb do loco mitocondrial 16S. **Diagonal superior:** Fst par-a-par (Desvio padrão, 5.000 re-amostragens) observada entre as 3 espécies para 463pb do gene mitocondrial Citocromo B.

	<i>Ex. lepeletieri</i>	<i>Ex. frontalis</i>	<i>Ex. smaragdina</i>
<i>Ex. lepeletieri</i>		0.672 (p<0,001)	0.874 (p<0,0001)
<i>Ex. frontalis</i>	0.020 (0.007)		0.931 (p<0,0001)
<i>Ex. smaragdina</i>	0.030(0.009)	0.028 (0.009)	

Os valores encontrados para os índices de diversidade genética e no teste de Fst foram corroborados pela reconstrução filogenética.

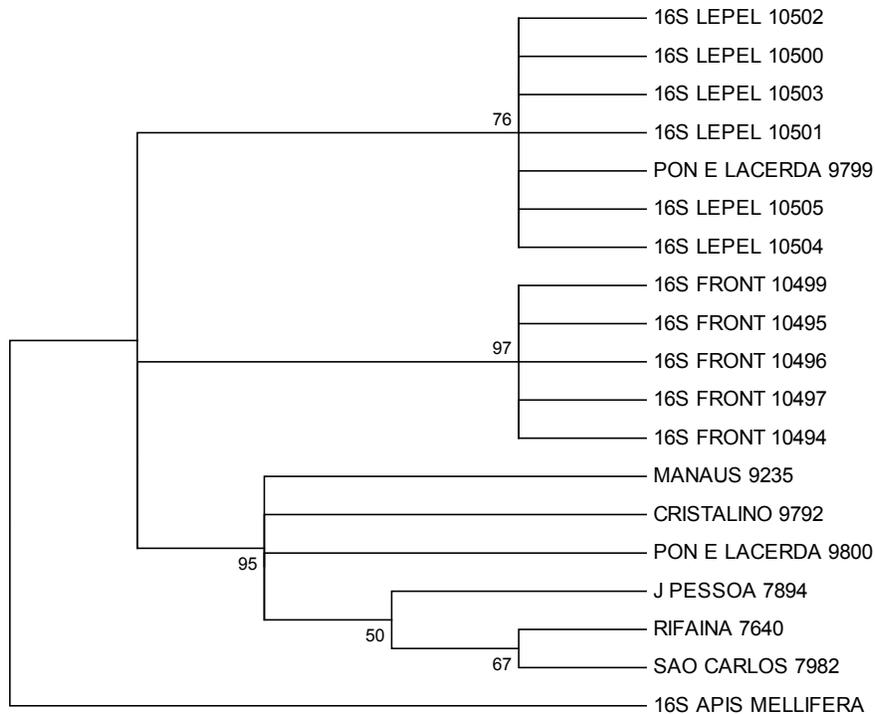
Para o loco 16S, as três espécies formaram clados monofiléticos com altos valores de suporte. Segundo este loco, o status de espécie de *Ex. lepeletieri* é incontestável (Figura 14).

Os resultados observados para o loco CytB, por outro lado, não são tão conclusivos. Parece evidente a existência de um clado monofilético entre *Ex. lepeletieri* e *Ex. frontalis*, sendo estas duas espécies mais próximas entre si do que de *Ex. smaragdina*. O mesmo já havia sido observado para o loco 16S. No entanto, *Ex. lepeletieri* não formou um grupo monofilético, mas sim dois grupos, sendo um deles

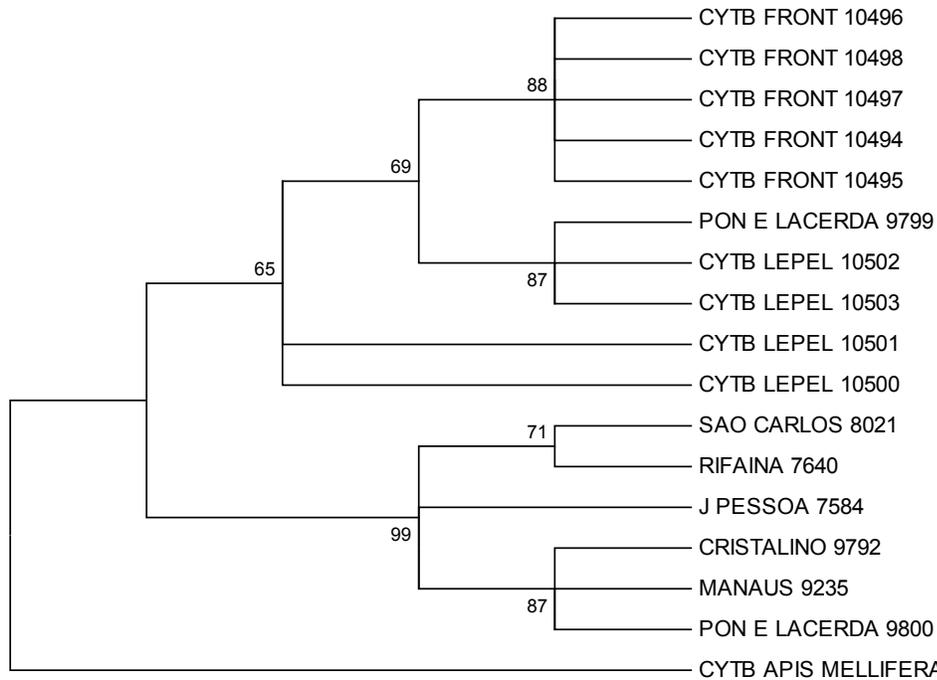
grupo-irmão de *Ex. frontalis* e outro que seria grupo-irmão deste clado (Figura 15). A natureza parafilética de *Ex. lepeletieri* para CytB contrasta-se, portanto com a monofilia observada em 16S.

A ausência de monofilia para *Ex. lepeletieri* pode ser efeito de uma separação ainda incompleta das linhagens de *Ex. lepeletieri* e *Ex. frontalis* para este loco. É interessante notar que os dois indivíduos de *Ex. lepeletieri* que ficaram de fora do grupo irmão de *frontalis* (10500 e 10501) apresentavam um tamanho corporal menor (cerca de 18mm) do que os demais (cerca de 28mm). Infelizmente, o número de amostras analisadas foi pequeno (para o loco CytB ainda não foi possível seqüenciar dois indivíduos). Cerca de 30 novos espécimes desta espécie já foram enviados ao nosso laboratório e serão seqüenciados em breve, inclusive para novos locos. Esperamos em breve resultados mais conclusivos.

Por fim, uma das amostras identificadas como *Ex. smaragdina*, proveniente de Pontes e Lacerda (MT), fronteira entre os domínios de Pantanal e Amazônia, apresentou seqüências nucleotídicas semelhantes à encontrada em *Ex. lepeletieri*, tanto para o loco 16S quanto para CytB. Desta forma, sugerimos que os limites geográficos desta espécie sejam revistos, uma vez que os dados moleculares indicam que ela não se restringe somente à floresta amazônica.



**Figura 14.** Reconstrução filogenética para o loco 16S para as espécies *Ex. smaragdina*, *Ex. frontalis* e para a possível espécie *Ex. lepeletieri*, pelo método de Neighbour-Joining (5000 réplicas).



**Figura 15.** Reconstrução filogenética para o loco Citocromo B para as espécies *Ex. smaragdina*, *Ex. frontalis* e para a possível espécie *Ex. lepeletieri*, pelo método de Neighbour-Joining (5000 réplicas).

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS**

### **5.1. Estudos filogeográficos na América do Sul**

Há poucos dados na literatura sobre filogenética molecular e evolução intra-específica em Euglossini. Aspectos gerais sobre a evolução das espécies do grupo já foram relatados (Engel 1999; Cameron 2004) e apenas um trabalho sobre caracterização molecular intraespecífica, utilizando-se marcadores RFLP é encontrado na literatura (López-Urbe & Del Lama 2007).

O único trabalho filogeográfico publicado até o momento (Dick *et al.* 2004) restringe-se à influência dos Andes na diversificação de Euglossini. As possíveis rotas evolutivas destes organismos no Brasil e na América do Sul são praticamente desconhecidas.

Desta forma, o presente estudo fornece as primeiras informações sobre a filogeografia de Euglossini no Brasil. Dois padrões distintos de evolução foram observados. Para *Exaerete smaragdina*, populações estruturadas geograficamente e duas possíveis rotas evolutivas (Mata Atlântica e Amazônia + Pantanal). Para *Eulaema nigrita*, os dados apontam para uma rápida expansão populacional e populações não estruturadas, talvez um reflexo de sua alta incidência em ambientes perturbados.

Contudo, deve-se salientar que o grupo de Euglossini apresenta uma grande diversidade, com muitas espécies distribuídas por um largo território. Estudos subseqüentes, baseado em um maior número de espécies e maiores amostragens certamente aumentarão nosso conhecimento sobre as rotas evolutivas desta tribo.

### **5.2. Filogeografia comparada em sistemas parasita-hospedeiro.**

A interação entre espécies é um mecanismo fundamental para os padrões macro-evolucionários de diversificação. Um dos exemplos mais relevantes de interação interespecífica é

o padrão co-evolutivo encontrado em sistemas parasita-hospedeiro (Page 2003).

Os trabalhos mais relevantes nesta área são os trabalhos pioneiros de Roderick Page (Page 1990, 1991; Hafner & Page 1995; Johnson *et al.* 2003) e os trabalhos mais atuais de Nieberding (Nieberding *et al.* 2004, 2005, 2006, 2008; Nieberding & Olivieri 2007). No entanto, a maioria dos trabalhos refere-se a sistemas de endoparasitismo ou de ectoparasitismo nos quais o ciclo de vida do hospedeiro depende completamente da associação parasítica (reprodução, locomoção e alimentação).

No caso de cleptoparasitismo (deposição de ovos no ninho da espécie parasitada), não há trabalhos relevantes sobre filogeografia comparada. O estudo filogeográfico mais relevante em Hymenoptera indica que há um aumento da diversidade genética nos genes mitocondriais em linhagem onde ocorreu a evolução do modo de vida parasítico (Dowton & Austin 1995).

Os dados aqui apresentados são os primeiros resultados moleculares que apontam que *El. nigrita* não deve ser a única hospedeira de *Ex. smaragdina*. Novamente, uma maior amostragem pode trazer uma maior confiabilidade nos resultados. Além disso, a análise de outras espécies hospedeiras em potencial, como *El. meriana*, ou ainda de outras parasitas como *Ex. frontalis* e *Aglae caerulea* podem ajudar a entender a evolução deste comportamento na tribo Euglossini.

### **5.3. Determinação do *status* de espécie por marcadores moleculares**

Genealogias feitas a partir do DNA mitocondrial geralmente têm resolução suficiente para mostrar as discontinuidades biológicas reconhecidas pelos taxonomistas como espécies (Hebert 2004). Com base neste fato, revisões taxonômicas ao nível de espécie têm incluído análises de

divergência do DNA mitocondrial. Por exemplo, algumas espécies de pássaros recentemente identificadas têm sido parcialmente definidas com base em divergências filogenéticas (Avisé & Zink 1988; Murray *et al.* 1994; Banks *et al.* 2002, 2003, p. e.).

Em um trabalho recente, Nemésio (2009) reavaliou morfologicamente a categoria de quatro espécies, além de identificar novas espécies de Euglossini, todas de ocorrência na Mata Atlântica. Além disso, discute a possibilidade de *Exaerete frontalis* não ser uma única espécie, mas sim duas, uma da Amazônia e outra da Mata Atlântica.

Mesmo com toda discussão taxonômica em Euglossini, ainda não há nenhum estudo na literatura sobre a confirmação da monofilia das espécies deste grupo.

Para *Ex. lepeletieri*, foi possível observar que ela realmente é uma nova espécie, e uma amostragem maior ainda poderá informar se, na verdade, ela não constitui duas novas espécies.

Como esta metodologia será aplicada cada vez mais frequentemente em amostras deste grupo, as incongruências taxonômicas observadas em Euglossini deverão ser resolvidas.

Desta forma, este trabalho contribui com as primeiras informações filogeográficas de Euglossini no território brasileiro, as possíveis influências dos domínios biogeográficos nas rotas evolutivas e as relações entre parasita-hospedeiros encontradas dentro da tribo, e traz à tona a discussão sobre a confirmação do status das novas espécies recentemente descritas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANJOS-SILVA, E.J. dos; ENGEL, M.S.; ANDENA, S.R. Phylogeny of the cleptoparasitic bee genus *Exaerete* (Hymenoptera: Apidae). **Apidologie**, v. 38, p.419-425, 2007.

ARBOGAST, B.S.; KENAGY, G.J. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. **Journal of Biogeography**, v.28, p.819-825, 2001.

ARMBRUSTER, W.C.; HERZIG, A.L.; CLAUSTEN, T.P. (1992) Pollination of two sympatric species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) in Suriname by male Euglossine bees. *American Journal of Botany* 79(12):1374-1381

AVISE, J.C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Cambridge: Harvard University Press, 2001, pp. 447.

AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. Sunderland: Sinauer Associates, 2004, pp. 541.

AVISE, J.C. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.18, p.489-522, 1987.

AVISE, J.C.; ZINK, R.M. Molecular genetic divergence between avian sibling species: King and Clapper rails, Long-billed and Short-billed dowitchers, Boated-tailed and Great-tailed grackles, and Tufted and Black-crested titmice. **The Auk**, v.105, p.516-528, 1988.

BANKS, R.C. et al. Fortythird supplement to the Ornithologists' Union checklist of North American birds. **The Auk**, v.119, p.897-906, 2002.

BANKS, R.C. et al. Fortyfourth supplement to the Ornithologists' Union checklist of North American birds. **The Auk**, v.120, p.923-931, 2003.

BAUN, D.A.; SHAW, K.L. Genealogical perspectives on the species problem. In: HOCH, P.C.; STEPHENSON, A.G. **Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics** Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.53, p.289-303, 1995.

BEERLI, P.; FELSENSTEIN, J. Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. **Genetics**, v.152, p.763-773, 1999.

BENNETT, F.D. Observations on *Exaerete* spp. and their host *Eulaema terminata* and *Euplusia surinamensis* (Hymen., Apidae, Euglossini) in Trinidad. **Journal of the New York Entomological Society**, v.80, p.118-124, 1972.

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

CAMERON, S.A. Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.90, p.8687-8691, 1993.

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

CAMERON, S.A. et al. The application of nucleotide sequence data to phylogeny of Hymenoptera: a review. **Journal of Hymenopteran Research**, v.1, p.63-79, 1992.

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

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v.9, p.1657-1660, 2000.

COCKERHAM, C.C.; WEIR, B.S. Estimation of gene flow from Fstatistics. **Evolution**, v.47, p.855-863, 1993.

COSTA, L.P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, v.30, p.71-86, 2002.

COYNE, J.A. Genetics and speciation. **Nature**, v.355, p.511-515, 1992.

CROZIER, Y.C.; KOULIANOS, S.; CROZIER, R.H.. An improved test for Africanized honeybee mitochondrial DNA. **Experientia**, v.47, p.968-969, 1991.

DE BRITO, R.A.; MANFRIN, M.H.; SENE, F.M. Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, p.161-171, 2002.

DICK, C.W. et al. Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. **Molecular Ecology**, v.13, p.3775-3785, 2004.

DODSON, C.H. Ethology of some bees of the tribe Euglossini (Hymenoptera: Apidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.39, p.607-629, 1966.

DOWTON, M.; AUSTIN, A.D. Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, V.91, P. 9911-9915, 1994.

DOWTON, M.; AUSTIN, A.D. Increased genetic diversity in mitochondrial genes is correlated with the evolution of parasitism in the Hymenoptera. **Journal of Molecular Evolution**, v.41, p.958-965, 1995.

DUNN, C.P. Keeping taxonomy based in morphology. **Trends in Ecology and Evolution**, v.18, p.270-271, 2003.

ENGEL, M.S. The first fossil Euglossa and phylogeny of the orchid bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **American Museum Novitates**, v.3272, p.1-14, 1999.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (ver. 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p.479-491, 1992.

FU, Y.X. New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. **Genetics**, v.143, p.557-570, 1996.

FU, Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v.147, p.915-925, 1997.

GADAGKAR, S.R.; ROSENBERG, M.S.; KUMAR, S. Inferring species phylogenies from multiple genes: Concatenated sequence tree versus consensus gene tree. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, p.304B, v.64-74, 2005.

GARÓFALO, C.A. Social structure of Euglossa cordata nests (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Entomological Genetics**, v. 11, p. 77-83, 1991.

GARÓFALO, C.A. Comportamento de nidificação e estrutura de ninhos de Euglossa cordata (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Revista Brasileira de Biologia**, v.52, p.187-198, 1992.

GARÓFALO, C.A et al. Nest structure and communal nesting in Bugloss (Glossura) annectans Dressler (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.15, p.589-596, 1998.

GARÓFALO, C.A.; ROZEN JR., J.G.; Parasitic behavior of Exaerete smaragdina with descriptions of its mature oocyte

and larval instars (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **American Museum Novitates**, v.3349, p.1-26, 2001.

HAFNER, M.S.; PAGE, R.D.M. Molecular phylogenies and host-parasite cospeciation: Gophers and lice as a model system. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v.349, p.77-83, 1995.

HAFNER, M.S. et al. Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. **Science**, v.265, p.1087-1090, 1994.

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

HEWITT, G.M. The genetic legacy of the Quaternary ice age. **Nature**, v.405, p.907-913, 2000.

HOFFMANN, F.G.; BAKER, R.J. Comparative phylogeography of short-tailed bats (Carollia: Phyllostomidae). **Molecular Ecology**, v.12, p.3403-3414, 2003.

HUGALL, A. et al. Reconciling paleodistribution models and comparative phylogeography in the Wet Tropics rainforest land snail *Arosophia bellendenkerensis* (Brazier 1875). **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.99, p.6112-6117, 2002.

JOHNSON, K.P. et al. When Do Parasites Fail to Speciate in Response to Host Speciation? **Systematic Biology**, v.52, n.1, p.37-47, 2003.

KIMSEY, L.S. An illustrated key to the genus *Exaerete* with descriptions of male genitalia and biology (Hymenoptera: Euglossini, Apidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.52, p.735-746, 1979.

KIMSEY, L.S. Systematics of bees of the genus *Eufriesea* (Hymenoptera, Apidae). **University of California Publications in Entomology**, v.95, p.1-125, 1982.

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

KIMSEY, L.S.; DRESSLER, R.L. Synonymic species list of Euglossini. **Pan-Pacific Entomologist**, v.62, p.229-236, 1986.

KNUDSEN, J.T.; MORI, S.A. Floral scents and pollination in neotropical Lecythidaceae. **Biotropica**, v.28, n.1, p.42-60, 1996.

KOULIANOS, S. et al. Phylogenetic relationships within the corbiculate Apinae (Hymenoptera) and the evolution of eusociality. **Journal of Evolution Biology**, v.12, p.380-384, 1999.

LIPSCOMB, D.; PLATNICK, N.; WHEELER, Q. The intellectual content of taxonomy: A comment on DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, v.18, p.65-66, 2003.

LIU, J.X. et al. Late Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian anchovy (*Engraulis australis*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.40, n.3, p.712-723, 2006.

LOCKHART, P.J.; CAMERON, S.A. Trees for bees. **Trends in Ecology and Evolution**, v.16, p.84-88, 2001.

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

LÓPEZ-URIBE, M.M.; OI, C.A.; DEL LAMA, M.A. Nectar-foraging behavior of Euglossine bees (Hymenoptera: Apidae) in urban areas. **Apidologie**, v.39, p.410-418, 2008.

MICHEL-SALZAT, A.; CAMERON, S.A.; OLIVEIRA, M.L. Phylogeny of the orchid bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossini): DNA and morphology yield equivalent patterns. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.32, p.309-323, 2004.

MICHENER, C.D. **The Social Behavior of the Bees**. Cambridge: Harvard University Press, 1974, pp. 404.

MICHENER, C.D. Classification of the Apidae (Hymenoptera). **The University of Kansas science bulletin**, v.54, p.75-164, 1990.

MICHENER, C.D. **The Bees of the World**. London: Johns Hopkins University Press, 2000, pp. 913.

MIROL, P.M. et al. Signals of demographic expansion in *Drosophila virilis*. **BMC Evolutionary Biology**, v.8, p.59, 2008.

MORATO, E.F.; CAMPOS, L.A.O.; MOURE, J.S. Abelhas Euglossini (Hymenoptera, Apidae) coletadas na Amazônia Central. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.36, p.767-771, 1992.

MOURE, J.S. A key to the parasitic euglossine bees and a new species of *Exaerete* from Mexico (Hymenoptera Apoidea). **Revista de Biologia Tropical**, v.12, p.15-18, 1964.

MOURE, J.S. A check-list of the known euglossine bees (Hymenoptera, Apidae). **Atlas do Simpósio Biota Amazônica (Zoologia)**, v.5, p.395-415, 1967.

MULLER, R.L. Evolutionary Rates, Divergence Dates, and the Performance of Mitochondrial Genes in Bayesian Phylogenetic Analysis. **Systematic Biology**, v.55, n.2, p.289-300, 2006.

MURRAY, B.W. The use of cytochrome B sequence variation in estimation of phylogeny in the Vireonidae. **Condor**, v.96, p.1037-1054, 1994.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia University Press, 1987, pp. 512.

NEMÉSIO, A. **Composição e riqueza em espécies e densidade populacional de machos de Euglossina (Hymenoptera: Apidae: Apini) de remanescentes florestais de Mata Atlântica no estado de Minas Gerais**. Dissertação de Mestrado,

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 2004.

NEMÉSIO, A. Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of the Brazilian Atlantic Forest. **Zootaxa**, v.2041, p.1-242, 2009.

NEMÉSIO, A.; SILVEIRA, F.A. Deriving ecological relationships between host and parasitic species—an example with orchid bees. **Journal of Biogeography**, v.33, p.91-97, 2006.

NIEBERDING, C. et al. Phylogeography of a nematode (*Heligmosomoides polygyrus*) in the western Palearctic region: persistence of northern cryptic populations during ice ages? **Molecular Ecology**, v.14, p.765-779, 2005.

NIEBERDING, C. et al. A parasite reveals cryptic phylogeographic history of its host. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.271, p.2559-2568, 2004.

NIEBERDING, C. et al. Parasites and the island syndrome: the colonization of the western Mediterranean islands by *Heligmosomoides polygyrus* (Dujardin, 1845). **Journal of Biogeography**, v.33, p.1212-1222, 2006.

NIEBERDING, C.; OLIVIERI, I. Parasites: proxies for host genealogy or ecology? **Trends in Ecology and Evolution**, v.22, p.156-165, 2007.

NIEBERDING, C.M. et al. Geography and host biogeography matter for understanding the phylogeography of a parasite. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.47, n.2, p.538-554, 2008.

OLIVEIRA, M.L. O gênero *Eulaema* Lepeletier, 1841 (Hymenoptera, Apidae, Euglossini): Filogenia, biogeografia e relações com as Orchidaceae. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil, 2000.

OLIVEIRA, M.L. Três novas espécies de abelhas da Amazônia pertencentes ao gênero *Eulaema* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Acta Amazonica**, v.36, p.121-128, 2006.

OLIVEIRA, M.L.; CUNHA, J.A. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? **Acta Amazônica**, v.35, n.3, p.389-394, 2005.

OLIVEIRA, M.L.; NEMÉSIO, A. Exaerete lepeletieri (Hymenoptera: Apidae: Apini: Euglossina): a new cleptoparasitic bee from Amazonia. **Lundiana**, v.4, n.2, p.117-120, 2003.

PAGE, R.D.M. Temporal congruence and cladistic analysis of biogeography and cospeciation. **Systematic Zoology**, v.39, p205-226, 1990.

PAGE, R.D.M. Clocks, clades, and cospeciation: Comparing rates of evolution and timing of cospeciation events in host-parasite assemblages. **Systematic Zoology**, v40, p,188-198, 1991.

PAGE, R.D.M. Maps between trees and cladistic analysis of historical associations among genes, organisms, and areas. **Systematic Biology**, v.43, p.58-77, 1994.

PAGE, R.D.M. **Tangled Trees: Phylogeny, Cospeciation, and Coevolution**. Chicago: University of Chicago Press, 2003, pp. 378.

PAGE, R.D.M.; CHARLESTON, M.A. Trees within trees: phylogeny and historical associations. **Trends in Ecology & Evolution**, v.13, p356-359, 1998.

PATERSON, A.M.; GRAY, R.D. Host-parasite co-speciation, host switching, and missing the boat. In: CLAYTON, D.H.; MOORE, J. **Host-parasite evolution: General principles and avian models**. Oxford: Oxford University Press, 1997. P.236-250

PERUQUETTI, R.C. et al. Abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância, riqueza e aspectos biológicos. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, n.2, p.101-118, 1999.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. **Trends in Ecology & Evolution**, v.16, p.37-45, 2001.

PRICE, P.W. **Evolutionary Biology of Parasites**. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 1980, pp. 256.

RAMÍREZ, S.; DRESSLER, R.L.; OSPINA, M. Abejas euglossinas (Hymenoptera: Apidae) de la region Neotropical: lista de especies con notas sobre su biología. **Biota Colombiana**, v.3, p.7-118, 2002.

RAND, D.M. Neutrality tests of molecular markers and the connection between DNA polymorphism, demography, and conservation biology. **Conservation Biology**, v.10, p.665-671, 1996.

RAND, D.M.; DORFSMAN, M.; KANN, L.M. Neutral and nonneutral evolution of drosophila mitochondrial DNA. **Genetics**, v.138, p.741-756, 1994.

REBÊLO, J.M.M.; GARÓFALO, C.A. Comunidades de machos de Euglossinae (Hymenoptera, Apidae) em matas semidecíduas do nordeste do estado de São Paulo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, p.243-256, 1997.

RICKLEFS, R.E.; SCHLUTER, D. Species diversity: regional and historical influences. In: RICKLEFS, R.E.; SCHLUTER, D. **Species Diversity in Ecological Communities**, Chicago: University of Chicago Press, 1993, p.350-363.

RIDDLE, B.R. et al. Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California Peninsular Desert biota. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.97, p.14438-14443, 2000.

ROBERTS, R.B.; DODSON, C.H. Nesting biology of two communal bees, *Euglossa imperialis* and *Euglossa ignita* (Hymenoptera: Apidae), including description of larvae. **Annals of the Entomological Society of America**, v.60, p.1007-1014, 1967.

ROIG-ALSINA, A.; MICHENER, C.D. Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera:

Apoidea). **The University of Kansas science bulletin**, v.55, p.124-162, 1993.

ROUBIK, D.W.; HANSON, P.E. **Orchid Bees: Biology and Field Guide**. San Jose, Costa Rica: INBIO, 2004, pp. 352.

SCARPASSA, V.M.; CARDOZA, T.B.; CARDOSO JR, R.P. Population Genetics and Phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.78, p. 895-903, 2008.

SCHLUTER, D. Ecological causes of adaptive radiation. **The American Naturalist**, v.48, p.S40-S64, 1996.

SCHMID, K.J. et al. Large number of replacement polymorphisms in rapidly evolving genes of *Drosophila*: Implications for genome-wide surveys of DNA polymorphism. **Genetics**, v153, p.1717-1729, 1999.

SCHULTZ, T.; ENGEL, M.S.; PRENTICE, M. Resolving conflict between morphological and molecular evidence for the origin of eusociality in the "corbiculate" bees (Hymenoptera: Apidae): a hypothesis testing approach. **University of Kansas Natural History Museum, Special Publications**, v.24, p.125-138, 1999.

SEBERG, O. et al. Shortcuts in systematics? A commentary on DNA-based taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, v.18, p.63-65, 2003.

SHEPPARD, W.S.; MCPHERON, B.A. Ribosomal DNA diversity in Apidae. In: SMITH, D.R. **Diversity in the genus Apis**. Boulder: Westview, 1991, p. 89-102.

SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA, E.A.B. Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação. In: SILVEIRA, A.S. Belo Horizonte: Fundação Araucária, 2002, pp. 253.

SIMONSEN, K.L.; CHURCHILL, G.A.; AQUADRO, C.F. Properties of statistical tests of neutrality for DNA polymorphism data. **Genetics**, v.141, p.413-429, 1995.

SOARES, A.A. et al. Relações entre *Euglossa* (*Euglossella*) *mandibularis* Friese, 1899 (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) e *Cyphomandra calycina* (Solanaceae). **Ciência e Cultura**, v.41, p.903-905, 1989.

SULLIVAN, J.; ARELLANO, E.A.; ROGERS, D.S. Comparative phylogeography of Mesoamerican highland rodents: concerted versus independent responses to past climatic fluctuations. **The American Naturalist**, v.155, p. 755-768, 2000.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v.123, p.585- 595, 1989.

TEMPLETON, A.R. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping or DNA sequencing. V. Analysis of case/control sampling designs: Alzheimer's disease and the Apoprotein E locus. **Genetics**, v.140, p.403-409, 1995.

TEMPLETON, A.R. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. **Molecular Ecology**, v.7, p.381-397, 1998.

TEMPLETON, A.R. Out of Africa again and again. **Nature**, v.416, p.45-51, 2002.

TEMPLETON, A.R.; SING, C.F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. **Genetics**, v.134, p.659-669, 1993.

THOMPSON, J.D. et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.24, p.4876-4882, 1997.

TONHASCA JR., A.; BLACKMER, J.L.; ALBUQUERQUE, G.S. Abundance and diversity of euglossine bees in the fragmented landscape of the Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v.34, p.416-422, 2002.

VAWTER, L., BROWN, W.M. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. **Science**, 234:194-196, 1986.

WAKELEY, J. Inferences about the structure and history of populations: coalescents and intraspecific phylogeography. In: SINGHN, R.; UYENOYAMA, M. **The evolution of population biology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003, pp. 193-215.

WEISLO, W.T. The roles of seasonality, host synchrony, and behaviour in the evolution and distribution of nest parasites in Hymenoptera (Insecta), with special reference to bees (Apoidea). **Biological Review**, v.62, p.515-543, 1987.

WILLIAMS, N.H. The biology of orchids and euglossini bees. In: ARDITTI, J. **Orchid Biology: Reviews and Perspectives**. Ithaca: Cornell University Press, 1982, pp. 119-171.

WILSON, F.O. **The Insect Societies**. Cambridge: Harvard University Press, 1971.

ZHAO, L. et al. Complex population genetic and demographic history of the Salangid, *Neosalanx taihuensis*, based on cytochrome b sequences. **BMC Evolutionary Biology**, v8, p.201, 2008

ZINK, R.M. Comparative phylogeography in North American birds. **Evolution**, v.50, p.308-317, 1996.

ZUCCHI, R.; SAKAGAMI, S.F.; CAMARGO, J.M.F. Biological observations on a neotropical parasocial bee, *Eulaema nigrita*, with a review on the biology of Euglossinae. **Journal of the Faculty of Sciences of Hokkaido University, Zool.**, v17, p.271-380, 1969.