

Alayne Magalhães Trindade Domingues Yamada

Relações filogenéticas do gênero *Scaura*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini) e
filogeografia de *Scaura latitarsis*

Phylogenetic relationships within genus *Scaura*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini) and
phylogeography of *Scaura latitarsis*

São Paulo

2010

Alayne Magalhães Trindade Domingues Yamada

Relações filogenéticas do gênero *Scaura*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini) e
filogeografia de *Scaura latitarsis*

Phylogenetic relationships within genus *Scaura*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini) and
phylogeography of *Scaura latitarsis*

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Biologia/Genética.

Orientador (a): Dra. Maria Cristina Arias

São Paulo

2010

Resumo

Este presente estudo apresenta dados sobre duas análises complementares: a filogenia do gênero *Scaura* (Capítulo 2) e a filogeografia da espécie *Scaura latitarsis* (Capítulo 3). O estudo filogenético do gênero *Scaura* utilizou como fonte de dados sequências do ND2 (1095 pb), COI (1560 pb), COII (310 pb), Cyt B (746 pb), 16S (547 pb) e 12S (437 pb), obtidas a partir de indivíduos das quatro espécies desse gênero (*S. atlantica*, *S. latitarsis*, *S. longula* e *S. tenuis*) e quatro espécies como grupos externos (*Schwarzula timida*, *Schwarziana quadripunctata*, *Plebeia remota*, *Plebeia droryanna*). As reconstruções filogenéticas obtidas indicam que: 1) táxons do atual gênero formam um grupo monofilético; 2) dentre as espécies do grupo externo, a *Schwarzula timida* é a mais próxima ao gênero *Scaura*. Para análise filogeográfica foram utilizados 743 pb referente a parte do gene COI do DNA mitocondrial e a análise de sete locos polimórficos de microssatélites para 36 indivíduos de *S. latitarsis* provenientes de 9 localidades diferentes. Com os dados do gene COI foram identificados 26 haplótipos, com alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica. Os dados moleculares de morfometria de asa e os dados moleculares mostram grandes similaridades e indicam a existência de uma nova espécie dentro do grupo *latitarsis*. Portanto, a taxonomia atual do Gênero *Scaura* deve ser revista.

Abstract

This present study presents data on two complementary analysis: the phylogeny of the genus *Scaura* (Chapter 2) and phylogeography of the species *S. latitarsis* (Chapter 3). The phylogenetic analysis of genus of *Scaura* used as a data source of ND2 sequences (1095 bp), COI (1560 bp), COII (310 bp), Cyt B (746 bp), 16S (547 bp) and 12S (437 bp) obtained from individuals of four species of the genus (*S. atlantica*, *S. latitarsis*, *S. longula* and *S. tenuis*) and four species as outgroups (*Schwarzula timida*, *Schwarziana quadripunctata*, *Plebeia remota* and *Plebeia droryanna*). The phylogenetic reconstructions obtained indicate that: 1) taxa of the genus form a monophyletic group, 2) among the species of the outgroup, the species *Schwarzula timida* is closest to the genus *Scaura*. Phylogeographic analyses were used to 743 bp relative to part of the COI gene and mitochondrial DNA analysis of seven polymorphic microsatellite loci for 36 individuals of *S. latitarsis* from nine different locations. Using data from the COI gene were identified 26 haplotypes, high haplotype diversity and low nucleotide diversity. The molecular data of morfomentria wing and molecular data show great similarities and indicate the existence of a new species within the group *latitarsis*. Therefore, the current taxonomy of the genus *Scaura* should be reviewed.

Introdução Geral

1.1 A importância das abelhas

As abelhas são parte integrante do nosso ecossistema e da biodiversidade mundial. Além disso, apresentam grande importância econômica e social por produzirem mel de boa qualidade, e por constituírem o grupo mais importante de polinizadores, perpetuando espécies silvestres e contribuindo para a manutenção do equilíbrio ecológico (LA SALLE & GAULD, 1993; KERR *et al.*, 1996; KERR *et al.*, 2001).

As abelhas, assim como formigas e vespas, pertencem à ordem Hymenoptera. Essa ordem tem sido bastante estudada por apresentar características notáveis como a ampla diversidade de padrão de vida e evolução de formas sociais (CROZIER, 1977). Sob o ponto de vista genético, esse grupo é um interessante objeto de estudo, pois apresentam o sistema genético haplodiplóide, em que os machos desenvolvem-se a partir de ovos não fertilizados (haplóides) e as fêmeas a partir de ovos fertilizados (diplóides) (WILSON, 1976; CROZIER, 1977; GOTTLIEB *et al.*, 2002).

Entre as abelhas altamente eussociais, têm-se a Tribo Meliponini, composta pelas abelhas que apresentam um ferrão vestigial, e conhecidas como ‘abelhas sem ferrão’ (WILSON, 1977; ENGEL, 2001). Essas abelhas vivem em colônias permanentes, frequentemente compostas por milhares de indivíduos, sendo responsáveis por polinizar de 30 a 80% de nossas árvores nativas (KERR *et al.*, 2001; MICHENER, 2007).

Um dos grandes problemas enfrentados por essas abelhas é a destruição de “habitats”, principalmente pela ação predatória humana através da exploração da madeira, expansão da agropecuária, e queimadas que ocasionam uma redução de recursos alimentares e de local para nidificação, além da destruição direta dos ninhos (KERR *et al.*, 2001). É fundamental que políticas de preservação das espécies também se voltem para a diversidade genética, uma vez que esta é importante para manter a vitalidade reprodutiva, a resistência a doenças e a habilidade para se adaptar a mudanças (PRIMACK & RODRIGUES, 2001; SOLÉ-CAVA, 2001).

1.2 O gênero *Scaura* Shwarz, 1938

Scaura Schwarz (1938) é um gênero pertencente à Tribo Meliponini, que inclui abelhas pequenas (comprimento do corpo varia de 4 a 5,5 mm), e de coloração escura, que não apresentam agressividade na defesa do ninho (ROUBIK, 1992; MICHENER, 2007). Este gênero difere de outros Meliponini na forma do basitarso posterior que são tão largos quanto à tíbia e convexa na superfície exterior (Figura 1.1) (LAROCA & LAUER, 1973; MICHENER, 2007). Essa estrutura é usada para raspar os grãos de pólen que caem na superfície das pétalas e folhas durante a atividade de outras abelhas (LAROCA & LAUER, 1973; CAMARGO, 1984).

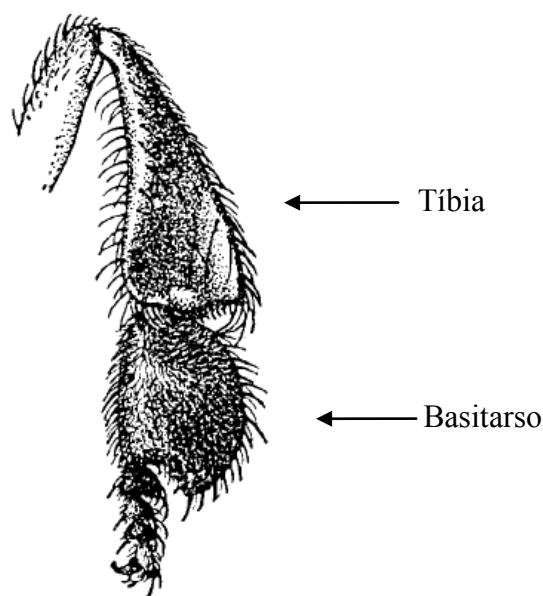


Figura 1.1: Perna traseira de *S. latitarsis*, indicando que o basitarso é mais largo que a tíbia. Fonte: Michener, 2007.

Este gênero encontra-se distribuído nos países da Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Guatemala, Guayana, Honduras, México, Panamá, Perú, Suriname e Venezuela (Figura 2.1) (MOURE, *et al.*, 2007). No Brasil, são encontradas 4 espécies: *S. atlantica*, *S. latitarsis*, *S. longula* e *S. tenuis* (SILVEIRA *et al.*, 2002; MELO & COSTA, 2004).

***Scaura atlantica* (Melo, 2004)**

Scaura atlantica (Figura 3.1A) pertence ao grupo *latitarsis* e pode ser distinguida das operárias de *S. latitarsis*, em particular, por seu tamanho maior, coloração mais escura, fronte superior mais lisa e pelo contorno do bordo posterior da tíbia posterior (MELO & COSTA, 2004). Segundo esses autores, essa espécie tem distribuição restrita à floresta Atlântica do sul da Bahia e norte do Espírito Santo, incluindo a bacia do Rio Jequitinhonha no Estado de Minas Gerais (Figura 2.1).

Essa espécie nidifica no interior de ninhos de *Nasutitermes* ativos (cupim) (Figura 4.1A). Quanto à arquitetura dos favos de cria, *S. atlantica* apresenta células verticais, organizadas na forma compacto-horizontal (MELO & COSTA, 2004).

***Scaura latitarsis* (Friese, 1900)**

Scaura latitarsis (Figura 3.1B) é conhecida como pegoncito, sharabata ou txashku-mexupa (MOURE *et al.*, 2007). Esta espécie foi originalmente descrita com ocorrência nos Estados do Acre, Amazonas, Amapá, Ceará, Espírito Santos, Minas Gerais, Mato Grosso, Pará, Paraná, Rio de Janeiro, Rondônia, Roraima e São Paulo (Figura 2.1) (SILVEIRA *et al.*, 2002; MOURE *et al.*, 2007). Todavia, de acordo com Melo & Costa (2004), o nome *S. latitarsis* deve ser usado de maneira restrita para as formas que ocorrem na bacia do rio Paraná, no Brasil. Segundo esses autores, o grupo ‘*latitarsis*’ representa um complexo de espécies, que inclui *Trigona argyrea* (*Scaura argyrea*) e *S. atlantica*, e que precisa ser estudado de maneira mais detalhada. De acordo com Moure *et al.*, (2007), pelo menos quatro espécies são incluídas no que é corretamente chamado como *S. latitarsis*.

Essa espécie apresenta hábito de nidificação semelhante a *S. atlantica*, no interior de termiteiros ativos (Figura 4.1B) (MATEUS *et al.*, 1999; MELO & COSTA, 2004; ROUBIK, 2006). Camargo (1984) observou três diferentes estágios de fundação por *S. latitarsis* no ninho de *Nasutitermes*: a preparação de resina, a extensão do longo tubo de resina na superfície do ninho e o início de uma invasão no interior do ninho do termiteiro.

Esta espécie compartilha com *S. atlantica* a forma de organização dos favos de cria, compacto-horizontal (KERR *et al.*, 1996; MATEUS *et al.*, 1999).

***Scaura longula* (Lepeletier, 1836)**

Scaura longula (Figura 3.1C) é conhecida popularmente como ‘jatai-preta’, ‘mehnora-tyk’ ou ‘ramichi-negra-grande’ (NOGUEIRA-NETO, 2003; MICHENER, 2007). É possível encontrá-la nos Estados do Amazonas, Amapá, Bahia, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Pará e São Paulo (Figura 2.1) (SILVEIRA *et al.*, 2002; MOURE *et al.*, 2007). Essas abelhas costumam nidificar em ocos de madeira (Figura 4.1C) (MATEUS *et al.*, 1999; NOGUEIRA-NETO, 2003).

Essa espécie apresenta favos de cria isolados, mas agrupados verticalmente como uma cortina, sendo este um caso raro entre os meliponíneos neotropicais (KERR *et al.*, 1996; MATEUS *et al.*, 1999). Estrutura semelhante, provavelmente originada de forma independente, é observada em outra espécie de abelha sem ferrão presente na África, *Dactylurina staudingeri*. Nesse caso, as células de cria são organizadas em favos duplos, os quais começam a ser construídos de cima para baixo, em contraposição, *S. longula*, apresenta favos simples, iniciados em baixo e expandindo-se para cima (NOGUEIRA-NETO, 2003).

***Scaura tenuis* (Ducke, 1916)**

Scaura tenuis (Figura 3.1D), conhecida como ‘ramichi-negra’, está distribuída nos Estados do Amazonas, Mato Grosso e Pará (Figura 2.1) (SILVEIRA *et al.*, 2002; MOURE *et al.*, 2007).

De acordo com Mateus *et al.*, (1999), essa espécie nidifica nas mais diversas cavidades (Figura 4.1D). Quanto à arquitetura dos favos de cria, a *Scaura tenuis* forma um aglomerado de células isoladas, do tipo cacho (KERR *et al.*, 1996; MATEUS *et al.*, 1999).

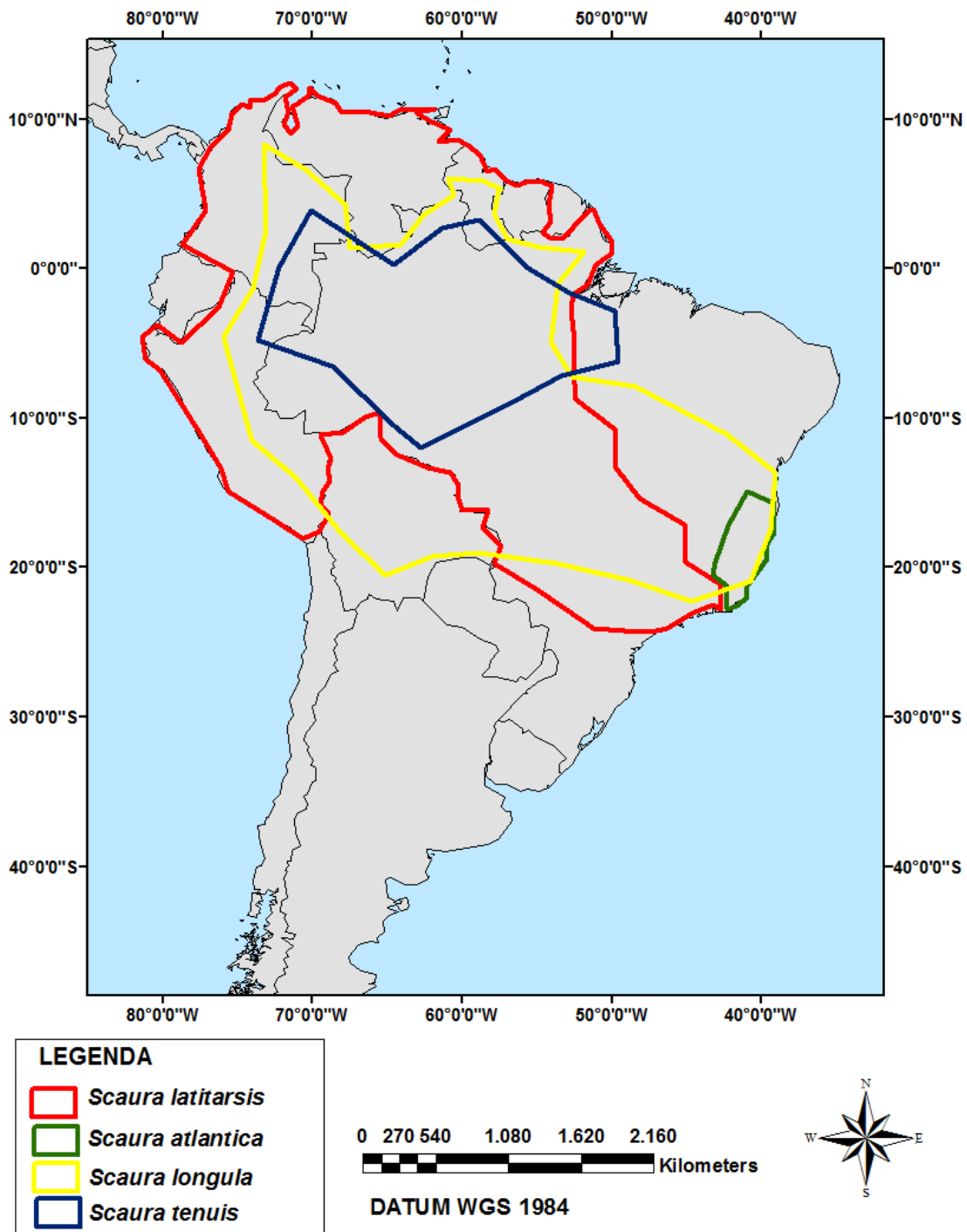


Figura 2.1: Área de distribuição geográfica, na América do Sul, das espécies de *Scaura*.

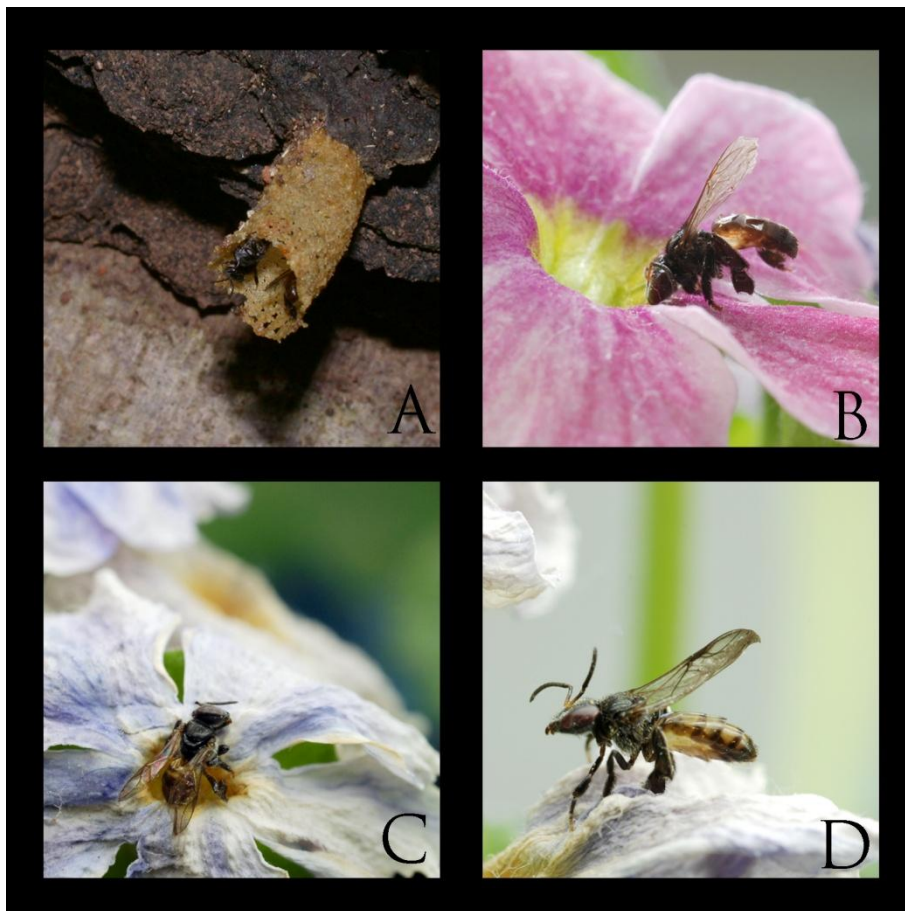


Figura 3.1: Espécies de *Scaura*. (A) *Scaura atlantica*; (B) *Scaura latitarsis*; (C) *Scaura longula*; (D) *Scaura tenuis*.



Figura 4.1: Variados locais de nidificação de espécies de *Scaura*, em destaque entrada dos ninhos. (A) *Scaura atlantica*; (B) *Scaura latitarsis*; (C) *Scaura longula*; (D) *Scaura tenuis*.

1.3 A problemática do gênero

Diversos problemas quanto à classificação de *Scaura* são citados na literatura. Segundo Michener (2007) *Scaura* poderia ser considerada como um gênero, e *Schwarzula* ser seu subgênero monotípico. Entretanto, acreditando ser melhor entender as relações entre os gêneros, Michener (2007) propôs que *Scaura* seria um subgênero de *Plebeia*. Desta forma, *Plebeia* compreende três subgêneros: *Plebeia* s. str. com 34 espécies, *Scaura* com 4 espécies, e *Schwarziana* com 2 espécies. Em contrapartida, dados moleculares indicam certa distância genética entre *Scaura* e *Plebeia* (COSTA *et al.*, 2003; RASMUSSEN & CAMERON, 2010).

Somando-se a isso, a taxonomia do gênero *Scaura* é ainda controversa e problemática, restando dúvidas quanto ao número exato de espécies. Tendo em vista que *S. atlantica* foi descrita em 2004, e que pertencia ao grupo ‘*latitarsis*’, acredita-se que esse grupo compreenda um número maior de espécies, e, portanto, pode ser considerado como um ‘complexo de espécies’.

Diante disto, o uso de marcadores moleculares associados à morfologia, pode ser de grande utilidade para auxiliar nesses estudos, promovendo uma melhor descrição e interpretação de diversidade biológica.

1.4 Marcadores moleculares

Análises moleculares revelam não somente detalhes do DNA, mas também condições de caracteres variáveis, cuja base genética particular e modos de transmissão podem ser precisamente especificados (AVISE 2004). Assim, a utilização de dados moleculares, em diversos estudos, vem sendo feita cada vez com maior frequência nos mais diferentes grupos taxonômicos, contribuindo para avanços consideráveis na biologia das espécies, ecologia, comportamento, genética e evolução (SUNNUCKS, 2000; AVISE, 2004). Em abelhas, a aplicação de marcadores moleculares também tem ajudado na resolução de incertezas taxonômicas de várias espécies ameaçadas (ZAYED, 2009).

Várias metodologias existem para revelar marcas genéticas, e numerosas abordagens baseadas em PCR (“Polymerase chain reaction”) têm sido desenvolvidas para revelar AFLPs, RAPDs, SSCPs, SINES, SNPs, STRs, e outras características

polimórficas do genoma (AVISE, 2004). Esses vários marcadores moleculares apresentam taxa de substituição/evolução diferentes, assim a escolha desses marcadores poderá auxiliar nos estudos que abordam problemas desde a identificação de indivíduos, identificação de espécies crípticas, a até mesmo a formulação de hipóteses filogenéticas em grupos supra-específicos (SOLÉ-CAVA, 2001). Em termos de evolução molecular, as classes de marcadores moleculares aliadas às técnicas de clonagem e seqüenciamento de DNA têm possibilitado um rápido acúmulo de informações sobre a estrutura de genomas de eucariontes (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

1.5 DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial (mtDNA) animal é uma molécula circular, com conteúdo gênico extremamente conservado; cerca de 90% do genoma consiste de regiões codificantes. Apresenta dois genes para subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22 para os RNA transportadores (tRNA), três para as subunidades da enzima citocromo oxidase (COI, II e III), um para o citocromo B, dois para as subunidades da ATPase (6 e 8) e sete para as subunidades da NADH desidrogenase. Existindo também uma região não-codificadora, responsável pela origem da replicação e transcrição da molécula, e rica em A+T nos invertebrados (MORITZ *et al.*, 1987; NAHUM, 2001).

O genoma mitocondrial é uma molécula peculiar, visto que apresenta herança materna, não apresenta recombinação ou inversão; tem conteúdo gênico conservado; regiões intergênicas pequenas ou mesmo ausentes; não apresenta íntrons, DNA repetitivo, pseudogenes e elementos transponíveis; apresenta altas taxas de substituição, de inserções e deleções, que fazem com que seqüências mitocondriais modifiquem-se de forma mais rápida do que seqüências nucleares, tendo assim altas taxas de evolução (MORITZ *et al.*, 1987, SBISA *et al.*, 1997; BALLARD & WHITLOCK, 2004; HURST & JIGGINS, 2005).

O mtDNA tem tido importante papel em estudos de sistemática molecular, genética de populações, e evolução nos últimos 25 anos (AVISE *et al.*, 1987; MORITZ *et al.*, 1987; HECKEL, 2003; BALLARD & WHITLOCK, 2004; RICHARDS, 2004). Crozier e Crozier (1993) publicaram o primeiro genoma mitocondrial completo de uma abelha, a *Apis mellifera*. Este estudo revelou que essa molécula contém 16.343 pb, cujo conteúdo de base é rico em A+T (84,9%). Esse trabalho contribuiu significativamente

para uma maior abrangência das análises do DNA mitocondrial em abelhas, revelando regiões polimórficas extremamente importantes para estudos de população, bem como análises filogenéticas entre espécies e subespécies (ARIAS & SHEPPARD, 1996; FERNANDES-SALOMAO *et al.*, 2002; SILVESTRE *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2003; ARIAS & SHEPPARD, 2005; RAFFIUDIN & CROZIER, 2007). Recentemente, Cha *et al.*, (2007) publicaram o genoma mitocondrial de outra espécie de abelha, a *Bombus ignitus*, em que também encontraram um genoma rico em A+T, em torno de 86,9%, bem como, grandes blocos de seqüências conservadas. Em Meliponini, por sua vez, foi publicado recentemente o seqüenciamento de 78% do mtDNA de *Melipona bicolor*, e também foi possível observar um alto conteúdo A+T, cerca de 86,7% (SILVESTRE, DOWTON & ARIAS, 2008).

Recentemente, tem sido proposto que a seqüências do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) possa servir como base para um sistema de identificação global de animais, como um sistema de código de barras de DNA para a vida animal, conhecido como DNA *barcoding* (TAUTZ *et al.*, 2003; HEBERT *et al.*, 2003). O gene mitocondrial citocromo c oxidase I (COI) foi escolhido por possuir seqüências nucleotídicas altamente conservativas, possibilitando o estudo comparativo dessas seqüências entre espécies. A alta conservação da seqüência do gene COI permite desenvolver iniciadores (*primers*) universais com bastante sucesso (PALUMBI, 1996).

1.6 DNA nuclear

Os genomas nucleares são muito maiores que os das organelas. Organismos diplóides têm duas cópias genéticas de cada região (locos), em pares de cromossomos homólogos, sendo as duas cópias de cada loco chamadas de alelos (PARKER *et al.*, 1998).

A maioria dos genes nucleares é de cópia-única, evoluem lentamente, e são potenciais fontes para resolução de relações filogenéticas em abelhas (DANFORTH *et al.*, 2006). Um número de genes promissores tem sido usado para estudos de filogenia de abelhas, incluindo a rodopsina (opsin), fator de alongação 1 α e arginina kinase (ArgK) (MARDULYN & CAMERON, 1999; DANFORTH *et al.*, 2004; KAWAKITA

et al., 2004; RASMUSSEN & CAMERON, 2007; RAMUSSEN & CAMARGO, 2008; RASMUSSEN & CAMERON, 2010).

1.7 Análises Filogenéticas

O conceito de filogenia surgiu a partir dos estudos de Darwin, concomitantemente ao próprio conceito de ancestralidade entre espécies. Assim, pode-se definir filogenia como a indicação das relações de ancestralidade supostas para um conjunto de espécies (MIYAKI *et al.*, 2001). Em 1966, o alemão Willi Henning criou um método de reconstrução das relações de parentesco entre grupos de organismos e também uma escola de classificação, em seu conjunto denominado “Sistemática Filogenética” (AMORIM, 2002). Segundo Henning, os organismos que compartilhassem condições derivadas (ou apomórficas) de caracteres poderiam ser hipotetizados como sendo descendentes da espécie ancestral na qual a condição primitiva (ou plesiomórfica) passou (por mutação) à condição derivada (MIYAKI *et al.*, 2001).

O uso de filogenia molecular para examinar questões evolutivas tem se tornado trivial com a automatização do seqüenciamento do DNA e a disponibilidade de eficientes programas de computadores para interpretar as análises filogenéticas (HUELSENBECK & RANNALA, 1997).

Existe uma longa discussão na literatura sobre os diferentes métodos a serem utilizados na reconstrução das filogenias, que podem ser baseadas em matrizes de distância ou em análise de estados de caráter. Para este último grupo, têm-se os métodos de Máxima Parcimônia (MP), da Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (IB) (SCHNEIDER, 2003).

Máxima Parcimônia

O método da máxima parcimônia é baseado na suposição de que a árvore mais provável é a que requer o menor número de mudanças para explicar toda a variação observada na matriz de caracteres (seqüências alinhadas). O método baseia-se no princípio da homologia, ou seja, se dois táxons compartilham uma característica é porque essa foi herdada do último ancestral comum a ambos. Ainda que a evolução

possa não ser sempre estritamente parcimoniosa, o método assume que o critério da parcimônia leva ao maior número total de acertos da árvore verdadeira quando se minimiza o número de passos evolutivos aceitos na árvore (SCHNEIDER, 2003).

As vantagens que esse método proporciona estão diretamente relacionadas com o seu conceito simples, além de ser computacionalmente mais rápido que os demais métodos. No entanto, homoplasias, substituições múltiplas e desvio de composição de bases, não são corrigidos por esse método (MIYAKI *et al.*, 2001).

Máxima Verossimilhança

Esse método tenta inferir uma árvore evolutiva encontrando aquela com maior valor de probabilidade, chamada de mais verossímil (HALL, 2001). Ao contrário do método da máxima parcimônia, a máxima verossimilhança considera todos os sítios indistintamente (SCHNEIDER, 2003). Além disso, simulações mostram que é menos suscetível a erros nas construções se o modelo evolutivo escolhido for adequado. Sua desvantagem é ser um método bastante demorado computacionalmente, embora computadores mais avançados possam minimizar esse problema (PEREIRA *et al.*, 2001).

Inferência Bayesiana

A inferência filogenética usando análise Bayesiana é baseada nas probabilidades a posteriori das árvores filogenéticas (SCHNEIDER, 2003). Esse método é semelhante ao da máxima verossimilhança, mas difere na noção de uso de probabilidades: as probabilidades não são estimadas baseadas em modelos a priori, mas após se aprender alguma coisa sobre os dados (HALL, 2001).

1.8 Relações Filogenéticas em Meliponini

A utilização de dados moleculares em diversos estudos, com enfoque filogenético, vem sendo feita cada vez com maior frequência nos mais diferentes grupos

taxonômicos, e têm contribuído para avanços consideráveis na genética e sistemática da Tribo Meliponini. Costa *et al.* (2003) analisaram dados de cerca de 420 pares de base do rDNA 16S de 34 espécies totalizando 22 gêneros da Tribo Meliponini. Neste trabalho, a proposta foi investigar a relação filogenética entre esses 22 gêneros e comparar com os dados descritos na literatura a partir de análises morfológicas. Análises de parcimônia e máxima verossimilhança foram realizadas e os dados encontrados não corroboraram os grupos tradicionais com composição intercontinental, como era proposto anteriormente.

Análises filogenéticas das relações inter e infragenérica de Meliponini do Velho Mundo foram realizados por Rasmussen & Cameron (2007) com base em dados do seqüenciamento de quatro genes, sendo um mitocondrial (16S rRNA) e três nucleares (rodopsina, fator de alongação e arginina kinase). Os dados combinados consistiram de 2814 nucleotídeos alinhados, os quais foram submetidos à análise Bayesiana e de Parcimônia. Os resultados obtidos dessas análises sugerem a divisão da Tribo Meliponini em três grandes clados: Indo-Malayo, Afrotropical e Neotropical.

A partir da análise combinada de dados do comportamento, cinco características da arquitetura do ninho e de seqüências de genes mitocondriais e nucleares, permitiram Rasmussen & Camargo (2008) inferir a relação filogenética de vinte e quatro espécies do gênero *Trigona*. Eles encontraram que os dados moleculares corroboram os dados morfológicos.

Rasmussen & Cameron (2010) analisaram seqüências de fragmentos de genes nucleares e mitocondriais para 11 espécies do gênero *Apis* e 60 gêneros de Meliponini. As análises bayesianas e de verossimilhança apoiaram fortemente a divisão de Meliponini em grupos do velho e do novo mundo, com o clado Afrotropical+Indo-Malay/Australiano compreendendo o grupo irmão do largo clado Neotropical.

1.9 Filogeografia

A filogeografia é um campo de estudo que enfatiza aspectos históricos da distribuição espacial contemporânea de linhagens de genes (AVISE, 2000).

A filogeografia foi anunciada como um vínculo de união do estudo de processos micro e macroevolutivos, sendo baseada na análise do DNA mitocondrial, e tem permitido traçar genealogias ao longo dos limites genéticos entre populações, espécies e níveis taxonômicos superiores. As análises filogeográficas também têm permitido a

descrição refinada da distribuição geográfica, relações filogenéticas e distâncias genéticas entre linhagens evolutivas de animais, conduzindo para um melhor entendimento da biogeografia regional e áreas de endemismo (BERMINGHAW & MORITZ 1998).

Nos últimos 30 anos, avaliações filogeográficas baseavam-se em seqüências de DNA mitocondrial, sendo realizado nas mais diversas espécies, que vão desde pequenos mamíferos, répteis, anfíbios até os invertebrados (AVISE, 2009). Atualmente, os genes ou regiões nucleares também têm sido utilizados, proporcionando dados robustos para essas análises.

1.10 Morfometria geométrica de asas

Análises morfológicas têm sido muito empregadas para descrever e comparar as formas de organismos ou de uma estrutura particular. Dentre as análises morfológicas, a morfometria geométrica ganha destaque, pois permite estudar as formas de estruturas biológicas baseadas na identificação de Marcos Anatômicos (“Landmarks”) e assim descrever a exata geometria das diferenças e similaridades de uma estrutura (PRETORIUS, 2005).

Os landmarks são os pontos das estruturas biológicas amostrados e que permitem identificar as variações de forma entre os diferentes exemplares em estudo (ROHLF, 1999).

Um importante foco da morfometria geométrica é o uso de distâncias de procrustes para capturar variações de contorno. Estas distâncias são consideradas como métodos confiáveis para determinar as relações de morfometria geométrica (PRETORIUS, 2005). Pode ser vista como uma ferramenta complementar nos testes evolutivos em correlação com padrões de variação de formas (GUILL *et al.*, 2003).

Essa metodologia tem sido usada para resolver problemas taxonômicos em abelhas *Bombus* (AYTEKIN *et al.*, 2007), para discriminar diferentes grupos raciais de *Apis mellifera* (FRANCOY *et al.*, 2006), bem como para identificar subespécies de abelhas, e analisar as mudanças no perfil morfométrico de algumas populações de abelhas africanizadas ao longo do tempo. Um dos primeiros trabalhos fazendo uso dessa metodologia em Meliponini foi realizado em *Plebeia remota*, e que associada a outras metodologias, demonstrou clara diferenciação entre amostras coletadas em duas regiões

distantes no Brasil, conduzindo a propor a existência de uma segunda espécie (FRANCISCO *et al.*, 2008). A morfometria geométrica também foi eficiente para determinar a variabilidade intra-populacional em *Nannotrigona testaceicornis* de uma única localidade (MENDES *et al.*, 2007). Esta metodologia foi usada para discriminar 5 gêneros de abelhas sem ferrão (FRANCOY *et al.*, 2009). Mais recentemente, Block *et al.*, (2010), analisaram fósseis de *Apis*, encontrado no Vale do Jordão no norte de Israel, e por meio de análises morfométricas foi possível identificar que estes fósseis eram distintos das subespécies de *Apis*, presentes atualmente nesta região. Considerando a carência de dados moleculares e morfológicos, a importância ecológica como polinizadores e da incerteza taxonômica no gênero *Scaura*, este trabalho propõe um estudo filogenético envolvendo as quatro espécies válidas deste gênero, e um estudo filogeográfico da espécie *S. latitarsis*, levando em conta que compreende um complexo de espécie. Esses dados além de contribuir para o entendimento desse complexo de espécies fornecerá dados importantes sobre a variabilidade genética *versus* o impacto do Homem no ambiente.

Esta tese é apresentada em três capítulos, visando uma melhor compreensão dos objetivos propostos. Desta forma, o primeiro capítulo, aborda os estudos filogenéticos do gênero *Scaura*. O segundo, os aspectos filogeográficos da espécie *Scaura latitarsis* amostradas ao longo da distribuição no Brasil. E o terceiro capítulo é uma abordagem morfológica, por meio da morfometria geométrica de asas.

Conclusões

- ✓ Os resultados moleculares, baseado em genes mitocondriais e nucleares foram capazes de confirmar o monofiletismo do gênero *Scaura*. As espécies *S. longula* e *S. tenuis* são filogeneticamente próximas. Assim como, as espécies *S. atlantica* e *S. latitarsis* formam um grupo irmão.
- ✓ Somando-se a isso, as filogenias moleculares obtidas sugerem que os gêneros *Scaura* e *Schwarzula* sejam grupos irmão, podendo a *Schwarzula* ser um subgênero do Gênero *Scaura*, como proposto na literatura. As espécies de *Plebeia* usadas neste estudo mostram que estas são distantes geneticamente de *Scaura* contrariando os dados morfológicos citados na literatura.
- ✓ O estudo filogeográfico para a espécie *S. latitarsi*, evidencia um complexo de espécie. As análises das sequências do gene COI, com padrão de herança mitocondrial mostrou claramente a divisão da espécie *S. latitarsis* em grupos que estão relacionados com as proximidades geográficas. O seqüenciamento do gene mitocondrial COI mostrou ser uma ferramenta eficiente e útil para auxiliar investigações sobre a descoberta de novas espécies, como proposto pelo *barcoding*.
- ✓ As amostras de *S. latitaris* coletadas no Campus da USP de Ribeirão Preto mostraram alta variabilidade genética, sugerindo que a ação antrópica ainda tem pouca influência sobre a colonização destas abelhas neste ambiente modificado.

- ✓ Os dados moleculares e os de morfometria de asa, para o complexo *latitarsis*, permitiram sugerir a existência de uma nova espécie no estado do Amazonas.
- ✓ Portanto, a taxonomia atual do Gênero *Scaura* deve ser revista a fim de contribuir para o aumento da biodiversidade de espécies dentro do gênero.

Referências Bibliográficas

AMORIM, DS. **Fundamentos de sistemática filogenética**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2002. 136p.

ARIAS, MC; SHEPPARD, WS. (1996). Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. **Mol. Phylogenet. Evol.**, 5: 557-566.

ARIAS, MC; SHEPPARD, WS. (2005). Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. **Mol. Phylogenet. Evol.**, 37: 25-35.

AVISE JC (2000) **Phylogeography: The History and Formation of Species**. **Cambridge**: Harvard University Press, 2000. 447p.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. 2ª ed. Sinauer Massachusetts: Associates, Inc. Publishers, 2004. 684p.

AVISE, JC. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. **J. Biogeogr.** 36: 3-15.

AVISE, JC; ARNOLD, J; BALL, RM; BERMINGHAM, E; LAMB, T; NIEGEL, JE; REEB, CA; SAUNDERS, NC. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, 18: 489-522.

AYTEKIN, AM; TERZO, M; RASMONT, P; ÇAGATAY, N. (2007). Landmark based geometric morphometric analysis of wing shape in *Sibiricobombus* Vogt (Hymenoptera: Apidae: *Bombus* Latreille). **Ann. Soc. Entomol. Fr.** 43: 95-102.

BALLARD, JWO; WHITLOCK, MC. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. **Mol. Ecol.**, 13: 729-744.

BERMINGHAM, E e MORITZ, C. (1998). Comparative phylogeography: concepts and applications. **Mol. Ecol.**, 7: 367-369.

CAMARGO, JMG. (1984). Notas sobre hábitos de nidificação de *Scaura* (*Scaura*) *latitarsis* (Friese). **Bol. Mus. Paraense Emilio Goeldi, Zool.**, 1: 89-95p.

CHA, SY; YOON, HJ; LEE, EM; YOON, MH; HWANG, JS; JIN, BR; HAN, SY; KIM, I. (2007). The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the bumblebee, *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae). **Gene**, 392: 206- 220.

CHOUDHARY, M; STRASSMANN, JE; SOLÍS, CR; QUELLER, DC. (1993). Microsatellite variation in a social insect. **Biochem. Genet.** 31:87-96.

COSTA, MA; DEL LAMA, MA; MELO, GAR; SHEPPARD, WS. (2003). Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. **Apidologie**, 34: 73-84.

CROZIER, RH; CROZIER, YC. (1993). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and the genome organization. **Genetics**, 133: 97-117.
CROZIER, RH. (1977). Evolutionary genetics of the Hymenoptera. **Ann. Rev. Entomol.** Australia, 22, p. 263 – 288.

DANFORTH, BN; SIPES, S; J. FANG, J; BRADY, SG. (2006). The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. **Proc. Natl. Acad. Sci** 103:15118–15123.

DANFORTH, BN; BRADY, SG; SIPES, SD; PEARSON, A. (2004). Single copy nuclear gene recovers Cretaceous age divergences in bees. **Syst. Biol.**, 53:309-326.

FERNANDES-SALOMAO, TM; MURO-ABAD, JI; CAMPOS, LAO; ARAUJO, EF. (2002). Mitochondrial and nuclear DNA characterization in the *Melipona* species (Hymenoptera, Meliponini) by RFLP analysis. **Hereditas**, 137: 229-233.

FERREIRA, ME; GRATTAPAGLIA, D.. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Terceira edição. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

FRANCISCO, FO; NUNES-SILVA, P; FRANCOY, TM; WITTMANN, D; IMPERATRIZ-FONSECA, VL; ARIAS, MC; MORGAN, D. (2008). Morphometrical, biochemical and molecular tools for assessing biodiversity. An example in *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). **Insect. Soc.** 55: 231-237.

FRANCOY, TM; PRADO, PRR; GONÇALVES, LS; COSTA, LF; DE JONG, D. (2006). Morphometric differences in a single wing cell can discriminate *Apis mellifera* racial types. **Apidologie**, 37: 91-97.

FRANCOY, TM; SILVA, RAO; NUNES-SILVA, P; MENEZES, C; IMPERATRIZ-FONSECA, VL. (2009). Gender identification of five genera of stingless bees (Apidae, Meliponini) based on wing morphology. **Genet. Mol. Res.**, 8(1): 207-214.

GOTTLIEB, Y; ZOCHORI-FEIN, E; WERREN, JH; KARR, TL. (2002). Diploidyrestoration in Wolbachia – infected *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromolidae). **J. Invert. Pathol.** 81: 166 – 174.

GUILL, JM; HEINS, DC e HOOD, CS. (2003). The effect of phylogeny on interspecific body shape variation in Darters (Pisces:Percidae). **Syst. Biol.**, 52 (3):1-13.

HALL, HG e SMITH, DR. (1991). Distinguishing African and European honeybee matriline using amplified mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88: 4548-4552.

HEBERT, PDN; CYWINSKA, A; BALL, SL; DEWAARD, JR. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. **Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.** 270: 313-321.

HECKEL, DG. (2003). Genomics in pure and applied entomology. **Annu. Rev. Entomol.**, 48: 235-260.

HILLIS, DM; MORITZ, C; MABLE, BK. **Molecular Systematics**. Second edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc, 1996. 655p.

HUELSENBECK, JP; RANNALA, B. (1997) Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. **Science** 276: 227-232.

HURST, GDD e JIGGINS, FM. (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. **Proc. R. Soc. B.**, 272: 1525-1534.

KAWAKITA, A; SOTA, T; ITO, M; ASCHER, JA; TANAKA, H; KATO, M; ROUBIK, DW. (2004). Phylogeny historical biogeography and character evolution in bumble bees (Bombus: Apidae) based on simultaneous analysis of three nuclear gene sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.**, 31: 799-804.

KERR, WE; CARVALHO, GA; SILVA, AC; ASSIS, MGP. (2001). Aspectos poucos mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias Estratégicas**, 12(2): 20-41.

KERR, WE; CARVALHO, GA; NASCIMENTO, V. (1996). **Abelha Uruçu – Biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte: Fundação Acangáú, (Coleção Manejo da Vida Silvestre, 2), 1996. 144p.

LA SALLE, J; GAULD, ID. Hymenoptera: Their diversity and their impact on the diversity of other organisms. In: LASALLE, J., GAUKD, I.D. (Eds.) **Hymenoptera and Biodiversity**. Wallingford, UK, 1993. 348p.

LAROCA, S e LAUER, S. (1973). Adaptação comportamental de *Scaura latitarsis* para coleta de pólen (Hymenoptera, Apoidea). **Acta Biológica Paranaense**, 2: 147-152.

MARDULYN, P; CAMERON, SA. (1999). The major opsin in Bees (Insecta: Hymenoptera): A promising nuclear gene for higher level phylogenetics. **Mol. Phylogenet. Evol.** 12 (2): 168-176.

MATEUS, S; NOGUEIRA-NETO, P; ZUCCHI, R. (1999). Diversidade etológica do processo de postura das células de cria em espécies do gênero *Scaura* (Apidae, Meliponinae). In: XVII Encontro Anual de Etologia, São Paulo. **Anais de Etologia**. São Paulo: SBEt, 17: 91-91.

MELO, GAR; COSTA, MA. (2004). A new stingless bee species of the genus *Scaura* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Atlantic forest, with notes on *S. latitarsis* (Friese). **Zootaxa**, 544: 1-10.

MENDES, MFM; FRANCOY, TM; NUNES-SILVA, P; MENEZES, C; IMPERATRIZ-FONSECA, V. (2007). Intra-Populational variability of *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) using relative warp analysis. **Biosci. J.**, 23: 147-152.

MICHENER, CD. **The bees of the world**. London: The Johns Hopkins University Press, 2000. 913p.

MICHENER, CD. **The bees of the world. Second edition**. London: The Johns Hopkins University Press, 2007. 953p.

MIYAKI, CY; RUSSO, CAM; PEREIRA, SL. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: MATIOLI, RS. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2001. p. 97-129.

MORITZ, C; DOWLING, TE; BROWN, W M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Ann. Ecol. Syst**, 18: 269-292.

MOURE, JS; URBAN, D; MELO, GAR. **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, 2007. 1058p.

NAHUM, LA. Evolução dos genomas. In: MATIOLI, RS. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirao Preto: Editora Holos, 2001. p. 82-96.

NOGUEIRA-NETO, P. Endocruzamentos em colônias de *Scaura longula* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae). In: MELO, GAR; ALVES-DOS-SANTOS, I. **Apoidea Neotropica: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Criciúma: UNEC, 2003. p. 189-190.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997. 446p.

PALUMBI, SR. Nucleic acids II: the Polymerase Chain Reaction. In: HILLIS DM, MORITZ C, MABLE BK (eds.), **Molecular systematic**. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc, Sunderland, 1996. 205-247p.

PARKER, PG; SNOW, AA; SCHUG, MD; BOOTON, GC; FUERST, PA. (1998). What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, Durham, 79 (2): 361-382p.

PEREIRA, SL; MIYAKI, CY; RUSSO, CAM. (2001) Reconstrução filogenética: métodos probabilísticos. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirao Preto: Editora Holos, 2001. P. 117-129.

PRETORIUS, E. (2005). Using geometric morphometrics to investigate wing dimorphism in males and females of Hymenoptera – a case study based on the genus *Tachysphex* Kohl (Hymenoptera: Sphecidae: Larrinae). **Aust. J. Entomol.**, 44: 113-121.

PRIMACK, RB; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina: E. Rodrigues, 2001. 328 p.

PRIMROSE, SB. (2003). **Princípios de análise do genoma: um guia para mapeamento e sequenciamento de DNA de diferentes organismos**. Tradução e revisão Francisco A. Moura Duarte. 2 edição. Ribeirao Preto, SP: FUNPEC-Editora, 193p.

RAFFIUDIN, R; CROZIER, RH. (2007). Phylogenetic analysis of honey bee behavioral evolution. **Mol. Phylogenet. Evol.**, 43: 543-552.

RASMUSSEN, C e CAMARGO, J.M.F. (2008). A molecular phylogeny and the evolution of nest architecture and behavior in *Trigona* s.s. (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Apidologie**, 39: 102-118.

RASMUSSEN, C. e CAMERON, S.A. (2007). A molecular phylogeny of the Old World stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the non-monophyly of the large genus *Trigona*. **Syst. Entomol.**, 32:26-39.

RASMUSSEN, C; CAMERON, SA. (2010). Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. **Biol. J. Linn. Soc.** 99: 206-232.

RICHARDS, M. (2004). The mitochondrial DNA tree and forensic science. **Int. Congr. Ser.**, 1261: 91-93.

ROHLF, FJ. (1999). Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. **Journal of Classification**, 16:197-223.

ROUBIK, DW. (2006). Stingless bee nesting biology. **Apidologie** 37:124-143.

ROUBIK, DW. (1992). **Ecology and Natural History of Tropical Bees**. Cambridge: Cambridge University Press, 514p.

SBISA, E; TANZARIELLO, F; REYES, A; SACCONI, C. (1997). Mammalian mitochondrial D-Loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. **Gene**. 205: 125-140.

SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética: um guia prático**. Ribeirão Preto: Holo, Editora e Sociedade. 2003, 114p.

SILVEIRA, FA; MELO, GAR e ALMEIDA, EAB. **Abelhas do Brasil: Sistemática e Identificação**. Belo Horizonte: edição dos Autores, 2002. p. 253.

SILVESTRE, D; FRANCISCO, FO; WEINLICH, R; ARIAS, MC. (2002). A scientific note on mtDNA gene order rearrangements among highly eusocial bees (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie** 33:355-356.

SILVESTRE, D; DOWTON, M; ARIAS, MC. (2008). The mitochondrial genome of the stingless bee *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Sequence, gene organization and a unique tRNA translocation event conserved across the tribe Meliponini. **Genet. Mol. Biol.**, 31(2): 451-460.

SOLÉ-CAVA, AM. (2001). Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, SR (ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Editora Holo. p. 172-192.

SUNNUCKS, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. **Tree** 15:199-203.

TAUTZ, D; ARCTANDER, P; MINELLI, A; THOMAS, RH; VOGLER, AP. (2003). A plea for DNA taxonomy. **Trends Ecol. Evol.** 18:70-74.

WILSON, EO. **The insect societies**. USA: The Belknap Press of Harvard. University Press Cambridge. P. 548, 1976.

ZAYED, A. (2009). Bee genetics and conservation. **Apidologie**, 40: 237-262.

