

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DAVID RICHARD DA LUZ

FILOGENIA MOLECULAR E FILOGEOGRAFIA DE *SCHWARZIANA* MOURE
(HYMENOPTERA, APIDAE)

CURITIBA
2011

DAVID RICHARD DA LUZ

FILOGENIA MOLECULAR E FILOGEOGRAFIA DE *SCHWARZIANA* MOURE
(HYMENOPTERA, APIDAE)

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

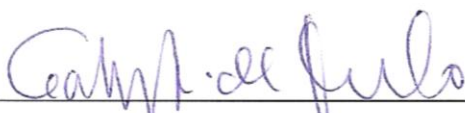
Orientador: Prof. Dr. Gabriel A. R. Melo

CURITIBA
2011

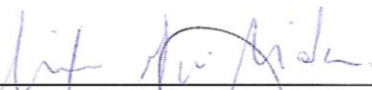
DAVID RICHARD DA LUZ

“Filogenia molecular e filogeografia de *Schwarziana* Moure (Hymenoptera, Apidae)”

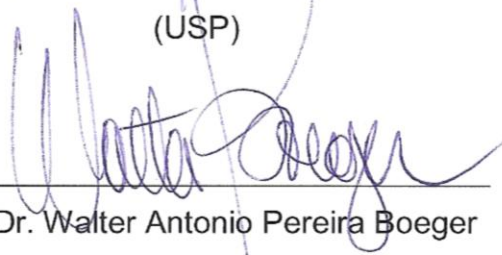
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências Biológicas”, no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Gabriel Augusto Rodrigues de Melo (Orientador)
(UFPR)



Profª. Dra. Cristina Yumi Miyaki
(USP)



Prof. Dr. Walter Antonio Pereira Boeger
(UFPR)

Curitiba, 20 de julho de 2011.

"Isn't it enough to see that a garden is beautiful without having to believe that there are fairies at the bottom of it too?"

Douglas Adams

"I do not fear death. I had been dead for billions and billions of years before I was born, and had not suffered the slightest inconvenience from it."

Mark Twain

"For me, it is far better to grasp the Universe as it really is than to persist in delusion, however satisfying and reassuring."

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser realizado:

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Gabriel Augusto Rodrigues de Melo pela oportunidade e orientação.

À Dra. Paula Aparecida Federiche Borges Bassi, técnica do Laboratório de Biologia Molecular “Danúncia Urban”, pela disponibilidade e ajuda com os procedimentos laboratoriais.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Comparada de Hymenoptera (LBCH), em especial à Grazielle Weiss, por ter me ajudado a dar os primeiros passos no mundo da biologia molecular e a Laércio Peixoto do Amaral Neto, pela amizade.

Às amigas construídas ao longo do mestrado: Karine, Daiara, Rafael, Marcel, Isabel, entre outros.

A Gustavo Valadares Barroso, pela ajuda em algumas análises e pela amizade de longa data.

A todos os coletores que enviaram amostras: João Luiz Santos, Raphael Silva, Sidnei Mateus e ao professor Gabriel, por ter reunido grande parte do material utilizado neste estudo.

Aos meus pais, Anadir da Luz e Sergio Luiz da Luz, pelo incentivo e por sempre estarem presentes.

À minha namorada, Melise Cristine Lecheta, pelo companheirismo, amor e carinho (e também por revisar meus textos). TE AMO!

Resumo

O gênero *Schwarziana* compreende duas espécies: *Schwarziana quadripunctata* e *Schwarziana mourei*, além de duas formas ainda não descritas, uma da Chapada dos Veadeiros, em Goiás e a outra da Serra da Bocaina, em São Paulo. *S. quadripunctata* distribui-se pelo Brasil (BA, ES, GO, MG, PR, RS, RJ, SC e SP), Argentina e Paraguai e apresenta grande variação morfológica ao longo de sua área de distribuição. O objetivo principal deste trabalho foi estudar a filogeografia de *S. quadripunctata*, a fim de elucidar seus padrões geográficos e taxonômicos. Foram sequenciados 1091 pb dos genes mitocondriais COI e CytB de 44 indivíduos provenientes de 32 localidades diferentes. Destes, 40 são de *S. quadripunctata*, 2 de *S. mourei* e 2 de *S.sp.nov.* (espécie nova da Chapada dos Veadeiros, em Goiás). Árvores filogenéticas foram construídas através de três métodos: máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e inferência bayesiana (IB). Uma rede de haplótipos de *S. quadripunctata* foi reconstruída por *median-joining network*. A análise de variância molecular (AMOVA) foi calculada. No alinhamento concatenado (1091 pb) obtido para *S. quadripunctata*, foram identificados 29 haplótipos, com uma diversidade nucleotídica (π) de 0,03005 e uma diversidade haplotípica (H_d) de 0,985. As análises filogenéticas e a rede de haplótipos identificaram quatro filogrupos monofiléticos dentro de *S. quadripunctata*, com evidente congruência biogeográfica. A AMOVA mostrou um percentual de variação entre os grupos de 55,16%, indicando haver uma alta estruturação. Estudos adicionais devem ser feitos, pois os resultados aqui encontrados sugerem que *S. quadripunctata* possa ser um complexo de espécies crípticas.

Palavras-chave: *Schwarziana quadripunctata*; filogeografia, DNA mitocondrial, espécies crípticas.

Abstract

Molecular Phylogeny and Phylogeography of *Schwarziana* Moure (Hymenoptera, Apidae). The genus *Schwarziana* comprises two species: *Schwarziana quadripunctata* e *Schwarziana mourei*, and two undescribed species, one of the Chapada dos Veadeiros, state of Goiás and the other of the Serra da Bocaina, state of São Paulo. *S. quadripunctata* occurring in Brazil (states of Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo), Argentina and Paraguay and shows great morphological variation throughout its distribution area. The main purpose of this study was to investigate the phylogeography of *S. quadripunctata* in order to elucidate their geographical and taxonomic patterns. 1090 bp of the mitochondrial genes COI and CytB were sequenced for 44 individuals (40 *S. quadripunctata*, two *S. mourei* and two of the new species from state of Goiás) from 32 different localities. Phylogenetic trees were constructed by three methods: maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and bayesian inference (BI). Haplotype network was reconstructed by median-joining network. Analysis of molecular variance (AMOVA) was calculated. In the concatenated alignment (1091 bp) of *S. quadripunctata* twenty-nine haplotypes were identified with a nucleotide diversity (π) of 0,03005 and a haplotype diversity (Hd) of 0,985. Phylogenetic analysis and haplotype network identified four monophyletic phylogroups in *S. quadripunctata* with evident biogeographical congruence. AMOVA showed a percentage of variation among groups of 55,16%, indicative of genetic structure. Additional studies must be made because the presented results suggest that *S. quadripunctata* can be a cryptic species complex.

Keywords: *Schwarziana quadripunctata*; phylogeography; mitochondrial DNA; cryptic species.

Lista de Figuras

- Figura 1. Mapa de distribuição geográfica de *S. mourei* (círculos vermelhos) e *S. quadripunctata* (círculos pretos), baseado em dados do material depositado na Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná (DZUP). Os tons acinzentados no mapa baseiam-se em reconstruções digitais do relevo, em que os tons mais escuros indicam maiores altitudes, como indicado5
- Figura 2. Mapa do genoma mitocondrial de *Apis mellifera* (Crozier & Crozier 1993). As setas pretas indicam as regiões amplificadas no presente estudo. Adaptado de Yamada (2010) 10
- Figura 3. Mapa com indicação das 32 localidades de amostragem analisadas neste estudo. Os círculos indicam os indivíduos de *S. quadripunctata*, os triângulos indicam os indivíduos de *S. mourei*, e o quadrado preto indica os indivíduos de *S. sp.nov.* Os tons acinzentados no mapa baseiam-se em reconstruções digitais do relevo, em que os tons mais escuros indicam maiores altitudes, como indicado 12
- Figura 4. Gráficos dos testes de saturação mostrando as frequências de transições (xS) e transversões (ΔV) em relação à distância genética para cada gene analisado e para o conjunto de dados concatenados. A) COI; B) CitB; C) COI+CitB 22
- Figura 5. Árvore de consenso estrito das 220 árvores mais parcimoniosas (Comprimento: 418 passos; CI: 65; RI: 76) encontradas a partir da análise do conjunto de genes concatenados (46 terminais; 1091 caracteres; 146 informativos para a parcimônia). Em azul o Clado A; em rosa o Clado B; em vermelho o Clado C e em verde o Clado D 25
- Figura 6. Filograma resultante da análise de máxima verossimilhança de 46 terminais e 1091 caracteres, provenientes do conjunto de dados concatenados. Os valores de *bootstrap* associados a cada clado estão representados em cada nó. Em azul o Clado A; em rosa o Clado B; em vermelho o Clado C e em verde o Clado D 26
- Figura 7. Filograma resultante da análise de inferência bayesiana de 46 terminais e 1091 caracteres, provenientes do conjunto de dados concatenados. Os valores de probabilidades posteriores associados a cada clado estão representados em cada nó. Em azul o Clado A; em rosa o Clado B; em vermelho o Clado C e em verde o Clado D 27
- Figura 8. Árvore não enraizada resultante da análise inferência bayesiana de 40 terminais e 1091 caracteres, provenientes do conjunto de dados concatenados. Os valores de probabilidades posteriores associados a cada clado estão representados em cada nó. Em azul o Clado A; em rosa o Clado B; em vermelho o Clado C e em verde o Clado D 28

Figura 9. Filograma resultante das análises de inferência bayesiana (na figura) e máxima verossimilhança de 15 terminais e 1620 caracteres, provenientes do conjunto de dados concatenados (COI+CitB+16S). Os valores de probabilidades posteriores e *bootstrap* associados a cada clado estão representados em cada nó. Em azul o Clado A; em rosa o Clado B; em vermelho o Clado C e em verde o Clado D29

Figura 10. Mapa com indicação das 29 localidades amostrais de *S. quadripunctata* analisadas neste estudo. As diferentes cores dos círculos correspondem aos clados encontrados nas análises. Os tons acinzentados no mapa baseiam-se em reconstruções digitais do relevo, em que os tons mais escuros indicam maiores altitudes, como indicado31

Figura 11. Rede de haplótipos *median-joining*, construída com o conjunto de dados concatenados, para os 40 indivíduos de *S. quadripunctata*. Cada círculo compreende um haplótipo e o seu tamanho é proporcional à sua frequência. Cada traço nas linhas que conectam os haplótipos representa um passo mutacional, mais de dez passos mutacionais foram representados por números. As cores dos haplótipos correspondem à cor de cada clado identificado nas análises filogenéticas. A codificação dos haplótipos segue aquela indicada na Tabela 133

Lista de Tabelas

Tabela 1. Táxons analisados, localidades amostradas, número de registro, coordenadas geográficas (decimais), tamanho das amostras (N) e haplótipo encontrado	13
Tabela 2. Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes mitocondriais utilizados neste estudo, sequências, temperatura de anelamento e referências bibliográficas	17
Tabela 3. Composição percentual das bases nucleotídicas e conteúdo A+T	22
Tabela 4. Diversidade genética e resultados dos testes de neutralidade encontrados nos clados identificados e em <i>S. quadripunctata</i> como um todo	23
Tabela 5. Valores de divergência média, calculada através da correção Kimura 2-parâmetros, entre os clados de <i>S. quadripunctata</i> e demais espécies do gênero <i>Schwarziana</i> . Em destaque, as divergências dentro dos clados	32
Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) em <i>S. quadripunctata</i>	34

Sumário

Resumo	iv
Abstract	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	viii
1. Introdução	1
1.1 As abelhas	1
1.2 A subtribo Meliponina	1
1.3 O gênero <i>Schwarziana</i> Moure, 1943	3
1.3.1 <i>Schwarziana mourei</i> Melo, 2003	4
1.3.2 <i>Schwarziana quadripunctata</i> (Lepeletier, 1836)	4
1.5 Filogeografia	6
1.6 O DNA Mitocondrial	8
2. Objetivos	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3. Material e Métodos	12
3.1 Amostragem	12
3.2 Extração e quantificação do DNA total	14
3.3 Material testemunho	16
3.4 Amplificação, eletroforese e sequenciamento	16
3.4 Edição, alinhamento das sequências e análise de composição molecular	18
3.5 Análises filogenéticas	19
3.6 Análises filogeográficas, populacionais e demográficas	20
4. Resultados	21
4.1 Características das sequências	21
4.2 Análises filogenéticas	23
4.3 Análises filogeográficas, populacionais e demográficas	29
5. Discussão	35
6. Conclusões	40
7. Referências Bibliográficas	41
ANEXOS	52

1. Introdução

1.1 As abelhas

Abelhas são vespas (Hymenoptera, Aculeata) cujas fêmeas, em vez de capturarem outros artrópodes como alimento, coletam pólen e néctar diretamente nas flores para alimentar suas larvas (Silveira *et al.* 2002). Compreendem um grupo monofilético (Alexander & Michener 1995, Melo 1999, Michener 2007) denominado Apidae (Melo & Gonçalves 2005), que está inserido dentro da superfamília Apoidea juntamente com outros quatro grandes grupos de vespas: Heterogynaidae, Ampulicidae, Sphecidae e Crabronidae, esta última considerada grupo-irmão das abelhas (Melo 1999).

São reconhecidas para Apidae sete subfamílias (Andreninae, Apinae, Colletinae, Halictinae, Megachilinae, Melittinae e Stenotritinae), 51 tribos e 27 subtribos (Melo & Gonçalves 2005). Existem cerca de 17.500 espécies descritas, porém estimativas sugerem que este número seja superior a 20.000 (Michener 2007), sendo cerca de 85% destas espécies solitárias (Batra 1984).

As abelhas são os mais importantes polinizadores das angiospermas, e muitas espécies possuem elevado interesse econômico (Barth 1991). Um outro admirável aspecto de sua biologia é a grande variedade de comportamentos existentes, que vão desde o solitário até a eussocialidade, com fêmeas de mais de uma geração coexistindo em uma colônia altamente organizada onde existe diferenciação de castas e de atividades no seu interior (Roubik 1989, Michener 2007).

1.2 A subtribo Meliponina

A subfamília Apinae abriga uma linhagem monofilética de abelhas corbiculadas (tribo Apini *sensu* Melo & Gonçalves 2005) formada por quatro subtribos: Apina (abelhas melíferas, gênero *Apis*), Bombina (mamangabas do gênero *Bombus*), Euglossina (abelhas das orquídeas) e Meliponina (abelhas sem ferrão) (Michener 1990, Roig-Alsina & Michener 1993, Silveira *et al.* 2002, Michener 2007).

A subtribo Meliponina (*sensu* Melo & Gonçalves 2005) reúne as chamadas “abelhas indígenas sem ferrão” que estão amplamente distribuídas pelas regiões tropicais do mundo, bem como nas regiões subtropicais do hemisfério sul (Silveira *et al.* 2002). Ao sul, sua distribuição estende-se até 35°S na Austrália e América do Sul e 28°S na África. Ao norte, o limite de sua distribuição alcança um pouco além do trópico de Câncer (Michener 2007).

A subtribo é composta por mais de 500 espécies descritas (Eardley 2004, Camargo & Pedro 2007, Rasmussen 2008), das quais aproximadamente 75% são restritas a região Neotropical (Camargo & Pedro 2007) reunidas em 57 gêneros (Camargo & Pedro 1992, Camargo & Roubik 2005). Entretanto, de acordo com Michener (2007) este número de espécies é subestimado e uma aproximação real ao número total pode ser impossível devido ao grande número de espécies crípticas existentes e da ausência de análises detalhadas da maioria dos gêneros.

Os meliponíneos são abelhas de porte minúsculo a médio (1,8 – 13,5 mm), em geral robustas. Podem ser facilmente distinguidos das demais abelhas corbiculadas pelos seguintes caracteres: venação das asas reduzida, presença de um penicílio (conjunto de cerdas longas na margem apical externa da tíbia posterior) e ferrão vestigial (Michener 1990, Michener 2007).

Todas as espécies são eussociais, embora algumas apresentem hábitos cleptobióticos (gênero *Lestrimelitta*) (Silveira *et al.* 2002, Michener 2007). São encontradas em colônias variando de poucas dúzias até mais de 100.000 operárias. Do mesmo modo que as abelhas melíferas (subtribo Apina), e diferentemente das outras abelhas, elas vivem em colônias perenes e possuem castas de fêmeas morfológica e comportamentalmente diferentes, denominadas operárias e rainhas (Michener 2007). As operárias coletam e processam o alimento, cuidam das larvas, constroem os ninhos e defendem a colônia, enquanto a rainha tem a função reprodutiva (Weinstock *et al.* 2006).

A maioria das espécies de meliponíneos faz seus ninhos em cavidades preexistentes (ocos de árvores, frestas em paredes, paredões rochosos, ninhos abandonados de cupins e formigas etc.), mas algumas espécies constroem ninhos expostos ou semi-expostos em galhos de árvores, fendas em rochas ou em construções humanas (Silveira *et al.* 2002, Michener 2007). A estrutura de entrada dos ninhos da maioria dos meliponíneos é formada por um tubo de cera, cerume ou

resina de comprimento e formato variáveis (Camargo & Pedro 2003), já em outras espécies, como *Schwarziana quadripunctata* (Lepeletier, 1836), a entrada, quando existente, é construída apenas de terra pura (Camargo 1974). A estrutura de entrada está relacionada com o sistema de defesa do ninho sendo, em alguns casos, inconspícua ou camuflada (Camargo & Pedro 2003).

A dispersão dos meliponíneos, que ocorre através da fundação de novas colônias por enxameação, pode apresentar taxas de migração mais lentas que a das demais abelhas eussociais (Silveira *et al.* 2002). As colônias-filhas são dependentes da colônia-mãe, uma vez que utilizam alimento e operárias desta colônia por um determinado período, fazendo com que a fundação de novos ninhos fique restrita a pequenas distâncias (Nogueira-Neto 1954).

A polinização representa um importante papel ecológico para os meliponíneos, pois estas abelhas são um dos mais importantes grupos de polinizadores de plantas nativas e cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais (Camargo & Pedro 1992, Heard 1999).

1.3 O gênero *Schwarziana* Moure, 1943

Schwarziana foi proposto inicialmente como subgênero de *Trigona* Jurine por Moure (1943). Pouco tempo depois, Schwarz (1948) reconheceu *Schwarziana* como um gênero à parte. Entretanto, o status taxonômico de *Schwarziana* não é unanimidade entre os taxonomistas. Michener (2007) tem tratado *Schwarziana* como subgênero de *Plebeia* Schwarz, 1938, juntamente com *Plebeia s.l.* e *Scaura* Schwarz, 1938. No entanto, a proposta de Michener não se sustenta, uma vez que este agrupamento não forma um grupo monofilético (Costa *et al.* 2003, Rasmussen & Cameron 2010). Em sua recente filogenia global dos meliponíneos, Rasmussen & Cameron (2010), com base em um gene mitocondrial e três nucleares, posicionaram *Schwarziana* como grupo irmão do gênero monotípico *Mourella* Schwarz, 1946.

É interessante salientar, porém, que decisões sobre os esquemas classificatórios a serem adotados têm pouca importância do ponto de vista da taxonomia. O que realmente importa é que os grupos reconhecidos representem unidades monofiléticas (Silveira *et al.* 2002).

As espécies do gênero *Schwarziana* Moure, 1943 são exclusivamente neotropicais, com distribuição geográfica restrita ao continente sul-americano (Silveira *et al.* 2002). Camargo & Pedro (2007) reconhecem duas espécies para o gênero: *Schwarziana quadripunctata* (Lepelletier, 1836) e *Schwarziana mourei* Melo, 2003.

Contudo, a diversidade em *Schwarziana* é maior do que aquela que tem sido reconhecida na literatura. Existem duas espécies conhecidas ainda não formalmente descritas para o gênero: uma da Chapada dos Veadeiros, em Goiás, e outra da Serra da Bocaina, em São Paulo. É provável que outras regiões de terras altas, como a Cadeia do Espinhaço e a Chapada da Diamantina, por exemplo, também abriguem espécies novas adicionais (Melo 2003).

1.3.1 *Schwarziana mourei* Melo, 2003

Espécie recentemente descrita por Melo (2003) que possui distribuição geográfica conhecida nos estados brasileiros de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Tocantins, além do Paraguai (Figura 1).

Segundo Melo (2003), apesar de à primeira vista ser muito parecida com *S. quadripunctata*, *S. mourei* pode ser facilmente reconhecida pelo seguinte conjunto de caracteres: depressão corbicular normal (em *quadripunctata*, estende-se além da metade da tíbia), escutelo quase inteiramente amarelo (variável em *quadripunctata*, porém a mancha amarela é menos extensa), pilosidade amarelada (escura em *quadripunctata*), tarsos castanho-amarelados (castanho-escuros em *quadripunctata*), metassoma uniformemente castanho-escuro (variável em *quadripunctata*) e metaposnoto glabro (nunca glabro em *quadripunctata*).

1.3.2 *Schwarziana quadripunctata* (Lepelletier, 1836)

Esta espécie apresenta distribuição geográfica conhecida para os estados brasileiros da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo, além de Argentina e Paraguai (Camargo & Pedro 2007) (Figura 1).

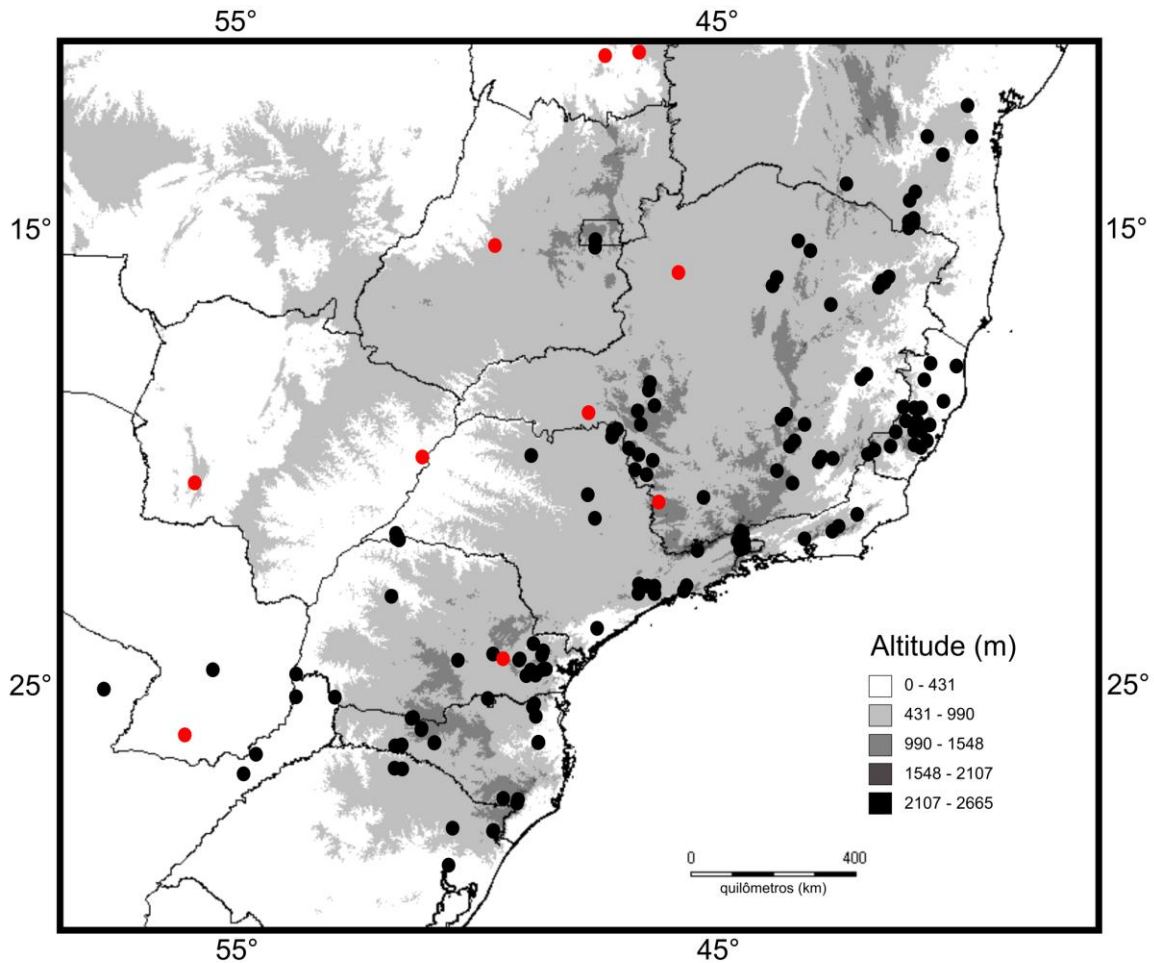


Figura 1. Mapa de distribuição geográfica de *S. mourei* (círculos vermelhos) e *S. quadripunctata* (círculos pretos), baseado em dados do material depositado na Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná (DZUP). Os tons acinzentados no mapa baseiam-se em reconstruções digitais do relevo, em que os tons mais escuros indicam maiores altitudes, como indicado.

Em sua obra seminal sobre os meliponíneos do hemisfério ocidental, Schwarz (1948) reconheceu duas formas, tratadas por ele como subespécies de *quadripunctata*: a forma típica e *bipartita* (Lepeletier, 1836). Este tratamento foi mantido até o trabalho de Camargo (1974), no qual, devido à aparente inconsistência biogeográfica envolvida no reconhecimento dessas duas formas, o autor sugeriu que *bipartita* fosse considerada sinônimo de *quadripunctata*.

Camargo (1974) estudou e descreveu em detalhes a morfologia e a biologia da espécie, com destaque para a arquitetura de ninhos. *S. quadripunctata* é uma das poucas espécies de meliponíneos que nidifica subterraneamente, aproveitando principalmente cavidades abandonadas por formigas do gênero *Atta* Fabricius, 1805, mas também podendo nidificar em termiteiros abandonados ou em ocos de raízes

de árvores secas. O ninho, que varia de 30-40 cm até 3 metros de profundidade (Schwarz 1948), apresenta uma estrutura de entrada em forma de torre, construída somente de terra pura, sem resinas ou ceras, uma galeria de entrada e o ninho propriamente dito.

S. quadripunctata apresenta grande variação morfológica ao longo de sua ampla área de distribuição, podendo, desta forma, representar mais de uma espécie (formas crípticas ignotas). Desta maneira, *quadripunctata* foi escolhida para o estudo filogeográfico.

1.5 Filogeografia

Há pouco mais de 20 anos, Avise e colaboradores propuseram a integração da sistemática e da genética de populações para investigar a conexão entre eventos micro e macroevolutivos. Este novo campo do conhecimento foi chamado de filogeografia. De acordo com Avise *et al.* (1987), a filogeografia é definida como o estudo dos princípios e processos que determinam as distribuições geográficas de linhagens genealógicas, especialmente aquelas dentro e entre espécies relacionadas.

A análise e interpretação da distribuição de linhagens requerem o processamento conjunto de informações de uma série de disciplinas, incluindo sistemática filogenética, genética de populações, etologia, demografia, paleontologia, geologia e modelos paleogeográficos e paleoclimáticos. A multidisciplinaridade da filogeografia faz com que a disciplina represente uma ponte empírica e conceitual entre os processos micro e macroevolutivos (Arbogast & Kenagy 2001, Martins & Domingues 2011).

Os eventos microevolutivos são aqueles que ocorrem entre indivíduos distribuídos nas populações e que levam à mudança das frequências gênicas ao longo das gerações, enquanto que os eventos macroevolutivos dizem respeito à diferenciação entre espécies e táxons superiores (Ridley 2006). Por esta razão, Avise (2000) considerou a filogeografia como o estudo da formação das espécies.

Avise (2000), com base na literatura publicada até então, propôs cinco categorias para definir os padrões filogeográficos:

- *Categoria I (alta divergência genética, linhagens alopátricas)*: caracterizada pela ocorrência de haplótipos geograficamente isolados e separados por grande número de mutações. A existência de uma barreira ao fluxo gênico por longos períodos de tempo, que promove o surgimento de linhagens alopátricas, é provavelmente o cenário histórico responsável por este padrão;
- *Categoria II (alta divergência genética, linhagens simpátricas)*: este padrão normalmente é observado em populações que apresentam altos níveis de fluxo gênico, tamanho efetivo grande e que sofreram seleção balanceadora ou perda de genótipos intermediários, retendo algumas linhagens ancestrais. O contato secundário entre linhagens alopátricas também é um evento promovedor deste padrão. O desaparecimento da barreira ao fluxo gênico torna as linhagens simpátricas novamente;
- *Categoria III (baixa divergência genética, linhagens alopátricas)*: nesta categoria os haplótipos são filogeneticamente próximos, mas separados em regiões geograficamente distintas. É muito provável que estas populações sejam historicamente ligadas, com um histórico de baixo ou nenhum fluxo gênico contemporâneo;
- *Categoria IV (baixa divergência genética, linhagens simpátricas)*: caracterizada por populações estreitamente relacionadas, sem nenhum isolamento geográfico e com grande capacidade de dispersão. A ausência de barreiras à dispersão e o efeito do fluxo gênico impedem o surgimento de linhagens muito divergentes;
- *Categoria V (baixa divergência genética, linhagens parcialmente separadas)*: categoria intermediária entre a III e IV, envolve linhagens amplamente distribuídas e algumas exclusivas a determinadas localidades. Este padrão é favorecido pelo fluxo gênico contemporâneo limitado ou ausente entre populações historicamente relacionadas. As linhagens de distribuição ampla são os ancestrais, enquanto as com distribuição restrita são as mais derivadas.

Padrões filogeográficos semelhantes podem ser compartilhados por espécies ocupando uma mesma região geográfica, o que nos permite tecer hipóteses sobre eventos históricos comuns que podem ter causado algum tipo de impacto na composição da biodiversidade atual (Avice 2000).

As bases históricas da filogeografia estão intimamente ligadas aos estudos empíricos com o DNA mitocondrial (DNAmt) de animais, iniciados no final dos anos 70. Desde então, devido às suas características genéticas e estruturais singulares, a variação entre as sequências do DNAmt tem sido utilizada para inferir os padrões filogeográficos das espécies (Avice 2000).

Pamilo *et al.* (1997) citam o fato de que, devido à forma de herança do DNAmt ser materna, ele pode ser usado para identificar matrilineagens e estimar a dispersão por fêmeas em insetos sociais. Esta característica peculiar torna o DNAmt de extrema importância para os estudos filogeográficos das espécies cuja dispersão dos ninhos é feita por fêmeas, como é o caso de *S. quadripunctata*.

Poucos estudos filogeográficos com abelhas têm sido relatados na literatura (p. ex. Diniz-Filho *et al.* 1999, Tanaka *et al.* 2001, Soucy & Danforth 2002, Dick *et al.* 2004, Solorzano *et al.* 2009). Com meliponíneos, apenas um trabalho (Batalha-Filho *et al.* 2010) com esse enfoque foi publicado até o presente.

Estes autores estudaram a filogeografia e a história demográfica da espécie *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836, revelando a existência de dois clados sustentados pelas análises filogenéticas e pela rede de haplótipos: o clado sul, formado pela subespécie *M. q. quadrifasciata* e o clado norte, compreendendo a subespécie *M. q. anthidioides*. O tempo de divergência para os dois filogrupos foi estimado entre 490 a 390 mil anos antes do presente, remetendo ao Pleistoceno, uma época marcada por fortes mudanças climáticas e alterações geomorfológicas na região Neotropical.

1.6 O DNA Mitocondrial

Desde o século passado, entre o final da década de 1970 e início dos anos 1980, a molécula do DNAmt tem sido o marcador molecular mais utilizado em estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas, migrações, fluxo gênico, filogeografia, eventos de especiação e outros aspectos biológicos e

evolutivos em diversos grupos de animais (Awise *et al.* 1987, Moritz *et al.* 1987, Awise 1994, Hurst & Jiggins 2005).

O DNAm animal é uma molécula circular e pequena, com aproximadamente 16 kb. O genoma mitocondrial dos animais, salvo algumas exceções (p. ex. Warrior & Gall 1985, Bridge *et al.* 1992, Raimond *et al.* 1999), contém os mesmos 37 genes: 22 para RNA transportadores, dois para as subunidades ribossômicas, três para as subunidades da enzima citocromo oxidase (COI, COII e COIII), um para o citocromo b, dois para as subunidades da ATPase (6 e 8) e sete para as subunidades da NADH desidrogenase (Figura 2). Esse número de genes codifica para apenas 5% dos produtos necessários para o funcionamento da mitocôndria (Moritz *et al.* 1987, Boore 1999, Arias *et al.* 2003). O DNAm possui também uma região não codificadora, conhecida como D-Loop (em vertebrados e equinodermas) ou região rica em A+T (em invertebrados), responsável pelo controle da replicação e transcrição do DNAm (Wolstenholme 1992, Arias *et al.* 2003). A ordem e a localização dos genes na molécula do DNAm dos animais é, em geral, considerada estável, principalmente entre organismos proximamente relacionados (Moritz *et al.* 1987).

O que torna a molécula do DNAm única é o fato de apresentar herança materna, ausência de recombinação, conteúdo gênico conservado, regiões intergênicas pequenas ou ausentes, ausência de íntrons, de DNA repetitivo, de pseudogenes e de elementos transponíveis (Moritz *et al.*, 1987), além de a evolução de algumas regiões ser extremamente rápida quando comparada a do genoma nuclear (Nedbal & Flynn 1998), o que o torna muito útil para estudos de grupos com divergência recente (Awise 2000). O fato de a herança do DNAm ser materna (portanto, haplóide) faz com que as mutações acumuladas não sejam dispersas por meio de recombinação, o que permite que diferenças acumuladas entre linhagens matrilineas sejam usadas para inferências de genealogias de genes (Awise *et al.* 1987). Esta ausência de recombinação faz com que a molécula inteira possa ser assumida como tendo a mesma história genealógica (Hurst & Jiggins 2005).

Embora amplamente utilizado, o DNAm apresenta algumas características que, segundo Hurst & Higgins (2005), seriam possíveis fatores complicadores nas análises: a herança materna, que por só refletir a história das fêmeas poderia não detectar a história dos machos, e a existência de sequências de DNAm integradas

ao genoma nuclear (NUMTs) que poderiam ser amplificadas por iniciadores mitocondriais, causando distorções nos resultados de estudos populacionais, filogenéticos e biogeográficos. Além disso, o DNAmT de Hymenoptera é conhecido por possuir uma das proporções mais elevadas de adenina (A) e timina (T) entre os animais (Cameron 1993, Simon *et al.* 1994, Downton & Austin 1997, Whitfield & Cameron 1998), o que aumentaria a ocorrência de homoplasias que poderiam causar resultados distorcidos em estudos filogenéticos e filogeográficos.

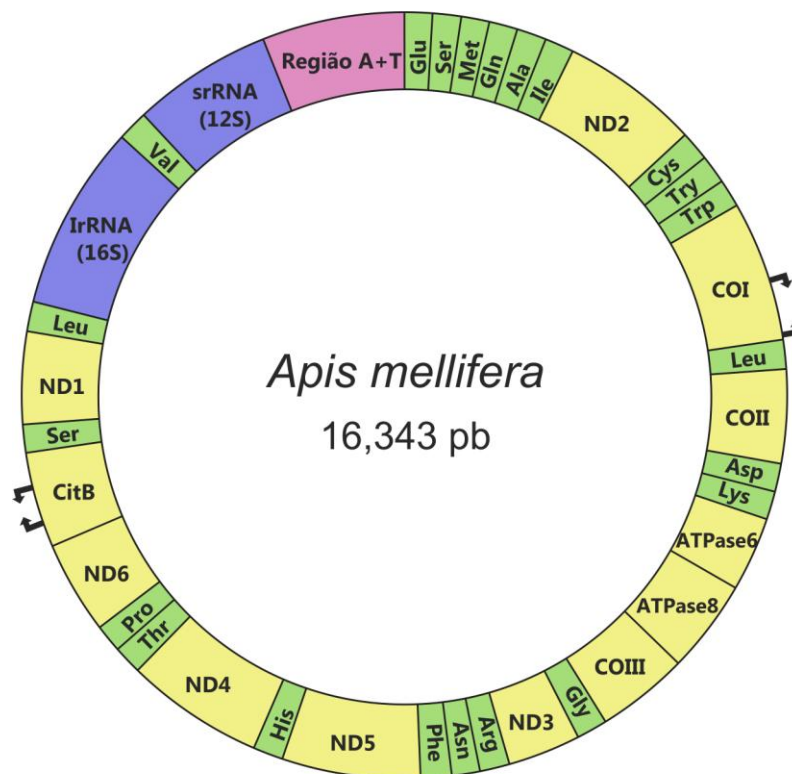


Figura 2. Mapa do genoma mitocondrial de *Apis mellifera* (Crozier & Crozier 1993). As setas pretas indicam as regiões amplificadas no presente estudo. Adaptado de Yamada (2010).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o relacionamento filogenético entre as espécies do gênero *Schwarziana* e estudar a filogeografia de *S. quadripunctata*, com base nos genes mitocondriais Citocromo c Oxidase subunidade I (COI) e Citocromo b (CitB), a fim de elucidar os padrões geográficos e taxonômicos da espécie.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os haplótipos mitocondriais de *S. quadripunctata*;
- Avaliar a estruturação geográfica de *S. quadripunctata*;
- Verificar se *S. quadripunctata* forma um complexo de espécies crípticas.

3. Material e Métodos

3.1 Amostragem

Foram utilizadas amostras de 44 operárias pertencentes às espécies *S. quadripunctata* (40), *S. mourei* (2) e *S. sp.nov* (2), provenientes de 32 localidades dos estados brasileiros da Bahia (BA), Distrito Federal (DF), Espírito Santo (ES), Goiás (GO), Minas Gerais (MG), Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ), Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e São Paulo (SP), além do Paraguai (Tabela 1, Figura 3), coletadas entre os anos de 2003 e 2010.

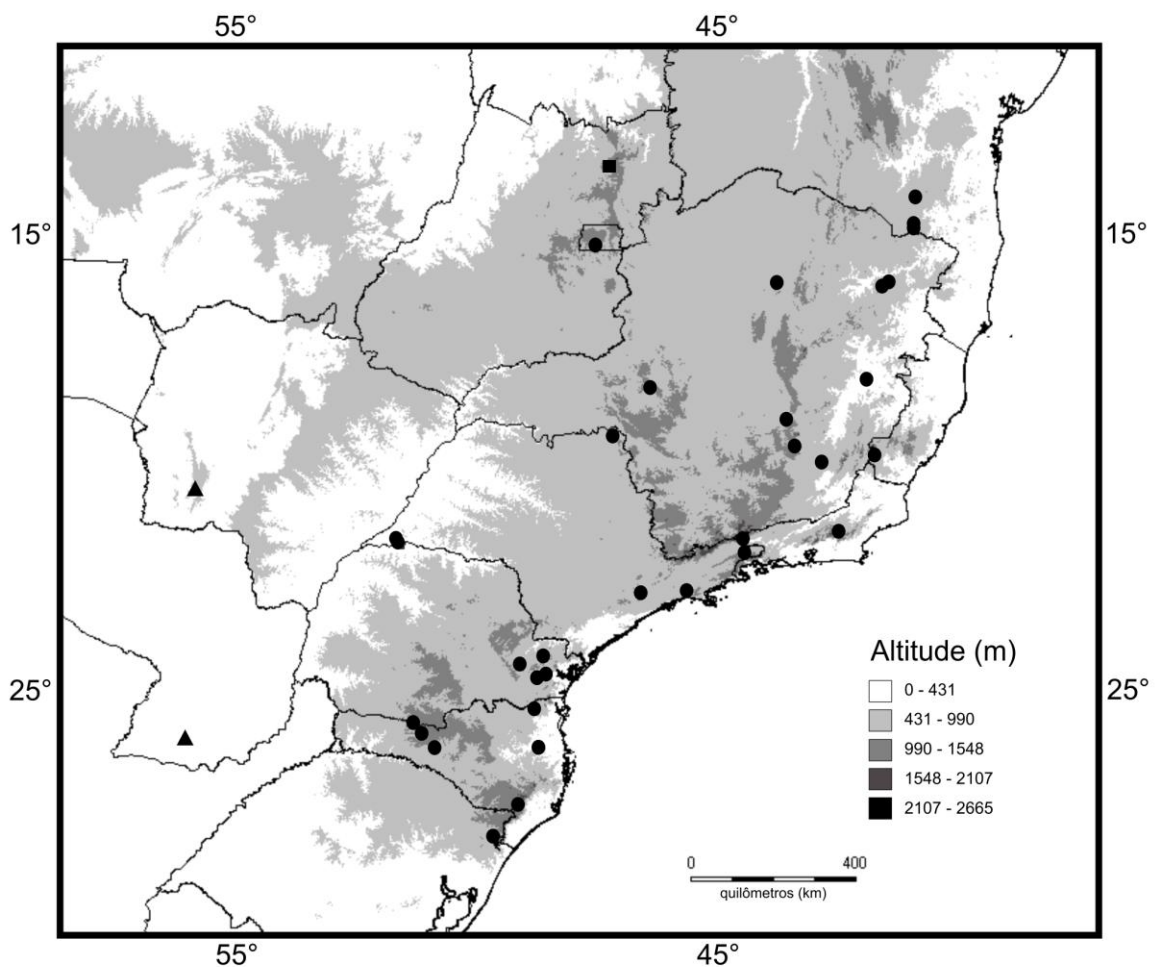


Figura 3. Mapa com indicação das 32 localidades de amostragem analisadas neste estudo. Os círculos indicam os indivíduos de *S. quadripunctata*, os triângulos indicam os indivíduos de *S. mourei*, e o quadrado preto indica os indivíduos de *S. sp.nov*. Os tons acinzentados no mapa baseiam-se em reconstruções digitais do relevo, em que os tons mais escuros indicam maiores altitudes, como indicado.

Tabela 1. Táxons analisados, localidades amostradas, número de registro, coordenadas geográficas (decimais), tamanho das amostras (N) e haplótipo encontrado.

Táxon / Localidade	Registro	Latitude S	Longitude W	N	Haplótipo
<i>S. quadripunctata</i>					
Bom Jardim da Serra - SC	GM128	-28.376	-49.642	1	H7
Brasília - DF	GM196	-15.945	-47.883	1	H15
Caeté - MG	GM003	-19.817	-43.667	1	H6
Cambará do Sul - RS	GM216	-29.033	-50.133	1	H23
Campo Alegre - SC	GM191	-26.193	-49.266	1	H10
Campo Largo-PR	GM004	-25.233	-49.6	1	H2
Cotia - SP	GM198	-23.633	-46.9	2	H3
Divino de São Lourenço - ES	GM214	-20.567	-41.767	1	H17
Encruzilhada - BA	GM190	-15.474	-40.838	2	H9
	GM354	-15.540	-40.837		
Governador Valadares - MG	GM203	-18.883	-41.9	1	H27
Indaial - SC	GM194	-27.05	-49.149	1	H11
Luzerna - SC	GM220	-27.133	-51.483	1	H24
Montes Claros - MG	GM001,002	-167.667	-43.867	2	H4
Nova Friburgo - RJ	GM189	-22.283	-42.519	1	H12
Ouro Preto - MG	GM217	-20.383	-43.5	1	H26
Palmas - PR	GM197	-26.55	-51.983	1	H18
Passos Maia - SC	GM218, 219	-26.733	-51.783	2	H24
Pedregulho - SP	GM224	-20.159	-47.521	1	H22
Piraquara - PR	GM079, 085	-25.442	-49.063	2	H1, H14
Ponto dos Volantes - MG	GM199	-16.887	-41.517	3	H21, H25
	GM200	-16.767	-41.433		
Resende - RJ	GM195	-22.5	-44.683	1	H16
Salesópolis - SP	GM193	-23.654	-45.890	2	H13
São José do Barreiro - SP	GM204	-22.725	-44.626	2	H19
	GM205	-22.743	-44.616		
São José dos Pinhais - PR	GM005	-25.535	-49.206	1	H14
Serra do Salitre - MG	GM086	-19.111	-46.69	2	H5
Teodoro Sampaio - SP	GM222	-22.567	-52.3	2	H29
	GM223	-22.517	-52.317		
Tunas do Paraná - PR	GM192	-25.067	-49.083	1	H20
Viçosa - MG	GM163	-20.755	-42.878	1	H8
Vitória da Conquista - BA	GM221	-14.883	-40.8	1	H28
<i>S. mourei</i>					
Paraguai, Capiatá	GM164	-26.833	-57.017	1	
Porto Murtinho - MS	GM166	-21.380	-56.763	1	
<i>S. sp.nov.</i>					
Alto Paraíso de Goiás - GO	GM165	-14.183	-47.617	2	
Total				44	

Quando as coordenadas exatas das localidades amostradas não estavam disponíveis, foram utilizadas as coordenadas da sede do município. As amostras, devidamente etiquetadas, foram armazenadas em tubos criogênicos de 2 ml contendo etanol absoluto e estocadas em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA.

Uma viagem de coleta (licença nº 22198-1/ ICMBio) foi realizada em março de 2010, para o município de São José do Barreiro, em São Paulo, com o intuito de encontrar material fresco da espécie nova de *Schwarziana* para a Serra da Bocaina. Apesar dos esforços em campo, foram coletados apenas indivíduos de *S. quadripunctata*.

Como grupo externo foram utilizadas duas operárias de *M. caerulea*, oriundas de Candiota, no Rio Grande do Sul e São Joaquim, em Santa Catarina. A escolha foi baseada em Camargo & Roubik (2005) e Rasmussen & Cameron (2010).

3.2 Extração e quantificação do DNA total

O DNA genômico foi extraído através de dois protocolos, em função da dificuldade de extração de algumas amostras: kit de extração EZ-DNA (Biosystems[®], Brasil) (protocolo I) e Cheung *et al.* (1993), com modificações (protocolo II). Para a extração do DNA foi utilizada somente a musculatura do tórax de cada indivíduo, permitindo que o mesmo fosse montado posteriormente. As extrações foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular “Danúncia Urban” do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná.

Protocolo I:

- 1) Adicionar 150µl de tampão de digestão “TD” (50mM Tris, 50mM EDTA, 2% SDS; pH 8,0) em um tubo tipo eppendorf autoclavado;
- 2) Colocar o tecido de interesse no tubo que já contém o TD e macerar com pistilo;
- 3) Adicionar 10µl de Proteinase K (20mg/ml);
- 4) Deixar a solução em banho-maria a 55°C durante três horas;
- 5) Adicionar 200µl do kit de extração EZ-DNA (Biosystems[®]) e homogeneizar a solução por inversão;

- 6) Incubar a 30-40°C por, no mínimo, uma hora em banho-maria;
- 7) Centrifugar a amostra durante dez minutos a 12.000 rpm. As proteínas irão precipitar formando um *pellet* na parede do tubo;
- 8) Transferir o sobrenadante contendo o DNA para outro tubo e adicionar 300µl de etanol absoluto gelado;
- 9) Misturar a solução invertendo o tubo gentilmente;
- 10) Armazenar por 30 minutos em temperatura ambiente;
- 11) Centrifugar a amostra durante cinco minutos a 10.000 rpm. O DNA irá formar um *pellet* translúcido preso à parede do tubo;
- 12) Descartar o sobrenadante cuidadosamente vertendo o tubo;
- 13) Colocar 200µl de etanol 95% gelado e centrifugar a amostra por cinco minutos a 10.000 rpm;
- 14) Descartar cuidadosamente o sobrenadante, colocar 200µl de etanol 70% gelado e centrifugar a amostra por cinco minutos a 10.000rpm;
- 15) Retirar o sobrenadante e secar a amostra a 55°C em estufa durante cerca de 30 minutos;
- 16) Adicionar ao tubo com DNA 50µl de água MiliQ autoclavada e armazenar em freezer a -20°C.

Protocolo II:

- 1) Adicionar 160µl de solução tampão (600µl de TRIS-HCl + 750µl de NaCl + 210µl de EDTA ≈ 1,5ml) em um tubo tipo eppendorf autoclavado;
- 2) Colocar o tecido de interesse no tubo que já contém a solução tampão e macerar com pistilo;
- 3) Adicionar 20µl de SDS 10%;
- 4) Incubar por 30 minutos em banho-maria a 60°C e deixar esfriar em temperatura ambiente;
- 5) Adicionar 50µl de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1;
- 6) Centrifugar a amostra durante 15 minutos a 13.000 rpm;
- 7) Transferir o sobrenadante contendo o DNA para outro tubo e adicionar 80µl de acetato de amônio 7,5M e 300µl de etanol 96%;
- 8) Inverter gentilmente e armazenar em freezer a -20°C durante 30 minutos para a precipitação do DNA;

- 9) Centrifugar a amostra durante 15 minutos a 13.000 rpm. O DNA irá formar um *pellet* translúcido preso à parede do tubo;
- 10) Descartar o sobrenadante cuidadosamente vertendo o tubo;
- 11) Colocar 300µl de etanol 70% gelado e centrifugar a amostra por cinco minutos a 13.000 rpm;
- 12) Retirar o sobrenadante e secar a amostra a 55°C em estufa durante cerca de 30 minutos;
- 13) Adicionar ao tubo com DNA 50µl de água MiliQ autoclavada e armazenar em freezer a -20°C.

O DNA genômico extraído de cada amostra foi quantificado por densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop (ND1000®). As amostras que apresentaram baixa concentração de DNA foram descartadas e novas extrações foram realizadas.

3.3 Material testemunho

Todos os espécimes utilizados nas extrações foram devidamente montados, etiquetados (Local, Data, Coletor, Código de identificação) e depositados como material testemunho na Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná (DZUP).

3.4 Amplificação, eletroforese e sequenciamento

Foram amplificados fragmentos dos genes mitocondriais Citocromo c Oxidase subunidade I (COI), Citocromo b (CitB) e 16S RNAr (16S). Os iniciadores utilizados para a amplificação parcial desses genes são considerados universais para o genoma mitocondrial de insetos, pois amplificam fragmentos em uma ampla variedade de organismos (Tabela 2).

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador Mastercycler (Eppendorf). Os fragmentos dos dois genes mitocondriais foram amplificados em reações com volume final de 25µl, ambas com as mesmas concentrações de reagentes e os mesmos parâmetros de amplificação, com exceção da temperatura de anelamento. A mistura de reação continha 10-50ng de DNA molde, 5µl da mistura

de dNTPs a 2,5mM, 2,5µl de 10X “PCR Buffer” (Invitrogen), 2,5µl de MgCl₂ a 25mM, 1µl de cada iniciador a 25 µM, 0,2µl de *Platinum*[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e água MiliQ autoclavada para completar o volume final de 25µl.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes mitocondriais utilizados neste estudo, sequências, temperatura de anelamento e referências bibliográficas.

Gene	Iniciador	Sequência 5' -> 3'	Temp.	Ref.
COI	LCO	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	48°C	Folmer <i>et al.</i> (1994)
	HCO	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		
CitB	mtD-26	TATGTACTACCATGAGGACAAATATC	42°C	Simon <i>et al.</i> (1994)
	mtD-28	ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT		
16S	874-16S	TATAGATAGAAACCAATCTG	48°C	Cameron <i>et al.</i> (1992)
	16SWb	CACCTGTTTATCAAAAACAT		
				Downton & Austin (1994)

Os ciclos de temperatura das reações de PCR consistiram em um passo de desnaturação inicial de 94°C por três minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 60 segundos, anelamento por 60 segundos a uma temperatura específica para cada par de iniciadores (Tabela 2) e alongação a 72°C por 45 segundos. Ao final desses ciclos, um passo extra de alongação a 72°C por cinco minutos foi efetuado. Em todas as reações realizadas, uma amostra livre de DNA (controle negativo) foi incluída com o objetivo de avaliar a presença ou a ausência de contaminantes ou inibidores durante o processo de extração de DNA e/ou preparação das reações de PCR.

Após a amplificação das amostras, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando o tampão de corrida 1X TBE (Tris-Borato-EDTA) e um marcador de peso molecular de 100 pb (pares de base) DNA Ladder. Ao final da eletroforese, os géis foram corados por cerca de 20 minutos em solução de 0,5µg/ml de brometo de etídio e visualizados em um transiluminador de luz UV MultiDoc-It Imaging System, da UVP, a fim de verificar a qualidade e tamanho dos fragmentos amplificados. Os géis de agarose foram então fotografados e digitalizados pelo programa *Doc-It*[®] *LS Image Analysis Software*.

As amostras que apresentaram resultados satisfatórios foram enviadas para a empresa Macrogen Inc. (<http://dna.macrogen.com>), localizada em Seul, Coréia do Sul, que realizou a purificação e a reação de sequenciamento em um sequenciador automático, modelo ABI 3730xl *DNA Analyzer* (Applied BiosystemsTM). Visando corrigir possíveis erros ou ambiguidades de sequenciamento, foram sequenciadas ambas as fitas, *forward* e *reverse*, de cada amostra.

3.4 Edição, alinhamento das sequências e análise de composição molecular

Cada amostra teve sua sequência consenso construída através dos programas Pregap4 e Gap4, do pacote Staden Package, versão 1.7.0 (Bonfield *et al.* 1995). Para evitar possíveis erros de leitura, todos as sequências consenso tiveram seus eletroferogramas e seus graus de confiabilidade para cada base checados visualmente através do programa Gap4. As sequências obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no GenBank[®] (<http://ncbi.nlm.nih.gov>), através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* - Altschul *et al.*, 1997), para a confirmação de seu posicionamento taxonômico.

As sequências consenso obtidas foram editadas no programa BioEdit, versão 7.0.9.0 (Hall 1999) e alinhadas através do programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994), implementado no BioEdit. Todos os alinhamentos foram inspecionados e corrigidos manualmente quando necessário. Após o alinhamento individual, as sequências dos genes COI e CitB foram concatenadas com o auxílio do programa Geneious, versão gratuita 5.4.2 (Drummond *et al.* 2011). De acordo com Gadagkar *et al.* (2005), alinhamentos concatenados utilizando pelo menos dois genes, em geral, produzem maior acurácia nas inferências filogenéticas do que aquelas inferidas através de um único gene, além de evitar possíveis diferenças entre árvores de genes e árvores de espécies.

As características inerentes às sequências de DNA obtidas e as distâncias genéticas foram identificadas através dos programas MEGA4 (Tamura *et al.* 2007). A possível presença de códons de parada nas sequências foi verificada com o programa Geneious. Com o intuito de checar a qualidade dos dados dos alinhamentos, foi realizado um teste para verificar a saturação de bases através do programa DAMBE, versão 5.2.34 (Xia & Xie 2001). O nível de saturação das

sequências foi avaliado através da análise gráfica do número transições e transversões (ti/tv) versus a distância genética corrigida segundo o modelo de Tamura e Nei (1993).

3.5 Análises filogenéticas

As árvores foram obtidas para o conjunto dos dados concatenados através de três métodos de inferência filogenética: inferência Bayesiana (ver Huelsenbeck *et al.* 2001), máxima parcimônia (ver Farris 1983) e máxima verossimilhança (ver Swofford *et al.* 1996).

A seleção do modelo de evolução molecular mais adequado para o conjunto de dados foi feita através do programa jModelTest, versão 0.1.1 (Posada 2008) com o critério de informação Akaike corrigido (AICc), para as análises da inferência Bayesiana e de máxima verossimilhança, utilizando o grupo externo.

A análise de inferência Bayesiana foi realizada através do programa MrBayes, versão 3.1.2 (Ronquist & Ruelsenbeck 2003). As buscas consistiram em duas corridas independentes, cada uma com quatro cadeias simultâneas (uma *cold chain* e três *heated chains*). As *Markov chain Monte Carlo* (MCMC) foram iniciadas com uma árvore aleatória e o número inicial de gerações foi de 2.000.000, com as topologias sendo salvas a cada 100 gerações. Quando completado o número de gerações, era verificado visualmente se o programa teria atingido a convergência (desvio padrão < 0,01) entre as duas cadeias de Markov, caso contrário um número maior de gerações seria aplicado. Após descartar 25% das árvores obtidas (comando *burnin* = 5000), uma árvore consenso foi gerada a partir das *cold chains* de cada uma das duas corridas. O suporte dos ramos foi obtido através das probabilidades posteriores. Nesta análise, foram utilizados os modelos de evolução indicados pelo jModelTest para cada partição.

A análise de máxima parcimônia foi efetuada no programa Nona, versão 2.0 (Goloboff 1999), através da interface Winclada, versão 1.0 (Nixon 2002). Os cladogramas mais parcimoniosos foram reconstruídos por meio de busca heurística, utilizando os seguintes parâmetros: *tree bisection-reconnection* (TBR), 1000 replicações (*mult**10000), retenção de 1000 árvores na memória (*hold**1000) e 50 árvores armazenadas por replicação (*hold*/50).

A análise de máxima verossimilhança foi conduzida no programa PHYML *online web server* (Guindon *et al.* 2010). Uma vez que o programa não permite a implementação de modelos de evolução específicos para cada partição, o modelo de evolução utilizado foi aquele indicado para o conjunto de dados pelo programa jModelTest. O suporte dos ramos foi estimado com 1000 replicações de *bootstrap*.

As árvores obtidas nas análises de inferência Bayesiana, máxima parcimônia e máxima verossimilhança foram visualizadas e editadas no programa FigTree, versão 1.3.1 (Rambaut 2009).

3.6 Análises filogeográficas, populacionais e demográficas

Os haplótipos mitocondriais de *S. quadripunctata*, assim como as diversidades haplotípica (H_d) e nucleotídica (π), foram calculados com o auxílio do programa DnaSP, versão 5.10 (Librado & Rozas 2009).

Para estimar as relações genealógicas entre os haplótipos de *S. quadripunctata*, foi construída uma rede de haplótipos através do método de *median-joining network* (Bandelt *et al.* 1999), utilizando o programa NETWORK, versão 4.5 (www.fluxus-engineering.com).

A análise de variância molecular (AMOVA), implementada pelo programa Arlequin, versão 3.11 (Excoffier *et al.* 2005) e que utiliza a estatística F de Wright, foi utilizada para calcular a significância da variabilidade encontrada entre os haplótipos de *S. quadripunctata*. A AMOVA foi calculada com dois níveis hierárquicos: entre grupos (clados) e entre indivíduos dentro de um grupo (clado).

Inferências com relação à ocorrência de eventos de expansão populacional foram baseadas nas estimativas de neutralidade utilizando os testes D de Tajima (1989) e F_s de Fu (1997), implementados no programa Arlequin.

Nas análises filogenéticas optou-se apenas pela inclusão dos diferentes haplótipos encontrados para *S. quadripunctata* e não de todos os indivíduos analisados em virtude de uma maior facilidade de visualização dos dados nas árvores filogenéticas e otimização do tempo de análise computacional. Todavia, todos os indivíduos foram utilizados tanto na elaboração da rede de haplótipos quanto na AMOVA, através das frequências com que foram amostrados nas diferentes populações.

4. Resultados

4.1 Características das sequências

O DNA genômico total de 46 indivíduos, sendo 40 de *S. quadripunctata*, dois de *S. mourei*, 2 de *S. sp.nov.* e 2 de *M. caerulea*, foi extraído. Todas as amostras foram amplificadas com sucesso para o fragmento do gene COI, enquanto que apenas a amostra de *S. mourei*, oriunda do Paraguai, não pôde ser amplificada para o fragmento do gene CitB.

Após o processo de sequenciamento, o alinhamento das 46 sequências obtidas para o gene COI gerou uma matriz de 658 caracteres, correspondendo às posições 42 a 699 do mesmo gene em *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (GenBank AF466146), único meliponíneo até o momento com o genoma mitocondrial parcial sequenciado (Silvestre *et al.* 2008). O alinhamento das 45 sequências obtidas para o gene CitB resultou em uma matriz de 433 caracteres, correspondendo às posições 327 a 759 de *M. bicolor*. Não foram detectados códons de parada inesperados ou *indels* no alinhamento em nenhuma das matrizes.

Os dados dos dois genes mitocondriais concatenados produziram uma matriz de 1091 pb (Anexo A). Como não foi possível amplificar o fragmento do CitB para o indivíduo de *S. mourei* proveniente do Paraguai, os sítios desta amostra foram tratados como dados faltantes (?) para o gene em questão na matriz concatenada.

Os índices das frequências nucleotídicas dos genes COI, CitB e do conjunto concatenado podem ser observados na Tabela 3. O anexo B apresenta a matriz de distâncias entre pares de sequências, calculada utilizando a correção Kimura 2-parâmetros no programa MEGA, para o conjunto dos dados concatenados. As divergências das sequências entre todos os táxons incluídos no presente estudo variaram de 0,3 a 8,1% e entre os haplótipos de *S. quadripunctata* a distância variou de 0,3 a 5,0%.

Tabela 3. Composição percentual das bases nucleotídicas e conteúdo A+T.

Gene	A	C	T	G	A+T
COI	33,4%	12,7%	44,2%	9,7%	77,6%
CitB	34,9%	10,7%	45,2%	9,2%	80,1%
COI + CitB	34,0%	11,9%	44,6%	9,5%	78,6%

A análise gráfica do nível de saturação das sequências (Figura 4) indica que as transições do gene COI estão levemente saturadas. Apesar disso, os dados indicam um sinal filogenético apropriado para as análises.

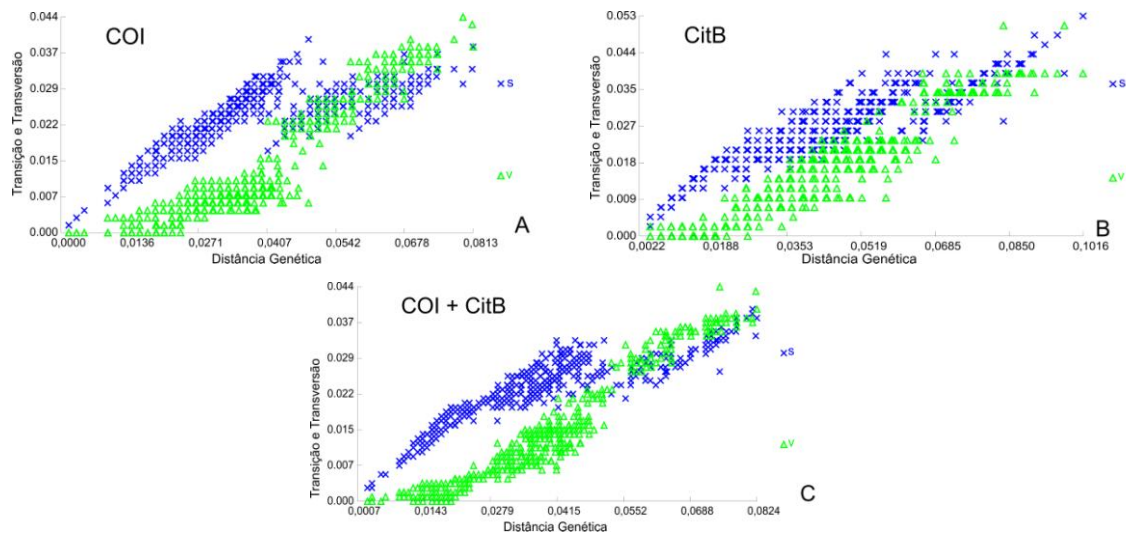


Figura 4. Gráficos dos testes de saturação mostrando as frequências de transições (xS) e transversões (ΔV) em relação à distância genética para cada gene analisado e para o conjunto de dados concatenados. A - COI; B - CitB; C - COI+CitB.

No alinhamento concatenado (1091 pb) obtido para *S. quadripunctata* foram encontrados 165 sítios polimórficos, sendo 116 informativos para a parcimônia e 49 *singletons*. Foram identificados 29 haplótipos (Tabela 4), com uma diversidade nucleotídica (π) de 0,03005 e uma diversidade haplotípica (H_d) de 0,985 (Tabela 4).

Tabela 4. Diversidade genética e resultados dos testes de neutralidade encontrados nos clados identificados e em *S. quadripunctata* como um todo.

	Ind.	H	Hd/sd	π /sd	D	Fs
Clado A	14	11	0,967 ± 0,037	0,01603 ± 0,00108	-0,51876	0,07930
Clado B	6	4	0,867 ± 0,129	0,01735 ± 0,00267	0,51534	4,05067
Clado C	5	3	0,800 ± 0,164	0,00807 ± 0,00179	0,57640	3,51013
Clado D	15	11	0,952 ± 0,040	0,01769 ± 0,00141	-0,55976	0,88168
Total	40	29	0,985 ± 0,009	0,03005 ± 0,00084	-0,57328	-1,1890

Ind.: número de indivíduos; H: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica; π : diversidade nucleotídica; D: teste de Tajima; Fs: teste de Fu; $p > 0,05$.

4.2 Análises filogenéticas

O programa jModelTest indicou o modelo evolutivo HKY+G (Hasegawa-Kishino-Yano + $\gamma = 0,0980$), escolhido através do critério de informação AICc, como o mais adequado tanto para os genes COI e CitB, quanto para o conjunto dos dados concatenados.

Serão apresentadas aqui apenas as análises filogenéticas realizadas com o conjunto dos dados concatenados, através de três métodos de reconstrução filogenética: máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e inferência bayesiana (IB). Contudo, as mesmas análises foram realizadas para os genes individuais, que resultaram em topologias semelhantes. A exceção foi a análise de MV para o gene CitB (Anexo C), em que *S. quadripunctata* não forma um grupo monofilético.

A Figura 5 apresenta o cladograma de consenso resultante da análise de MP. A análise resultou em 220 árvores igualmente parcimoniosas com comprimento de 418 passos, índice de consistência (CI) de 65 e índice de retenção (RI) de 76.

Os filogramas de consenso da MV e IB estão representados nas Figuras 6 e 7, respectivamente. A geração desses filogramas baseou-se nos modelos escolhidos pelo programa jModelTest.

Visando reduzir possíveis influências dos grupos externos e demais espécies do gênero *Schwarziana*, uma análise de IB utilizando apenas os haplótipos de *S. quadripunctata* foi realizada. Os parâmetros utilizados foram os mesmos da análise com todos os terminais, exceto o γ . A topologia resultante desta análise não foi enraizada e é apresentada na Figura 8.

Adicionalmente foram realizadas análises de MV e IB utilizando algumas sequências do gene mitocondrial 16S, com o intuito de testar as hipóteses dos clados encontrados nas análises filogenéticas anteriores. Para isso, foram utilizadas duas amostras de cada clado, além das demais espécies de *Schwarziana* e do grupo externo, totalizando 15 terminais. No grupo interno foi amplificado um fragmento de 525 pb, enquanto que no grupo externo um fragmento de 528 pb. O alinhamento dos dados concatenados (COI+CitB+16S) produziu uma matriz de 1620 caracteres e os parâmetros utilizados foram os mesmos das análises anteriores. O filograma resultante pode ser visualizado na Figura 9.

Em todas as análises filogenéticas a monofilia do gênero *Schwarziana* não é refutada e suas espécies formam grupos monofiléticos. Nas análises de MV e de IB, a espécie *S. mourei* aparece como espécie irmã de *S. quadripunctata*, enquanto que *S. sp.nov.* surge como a espécie mais basal dentro do gênero. A análise de MP indica que *S. sp.nov.* é relacionada mais estreitamente com *S. quadripunctata* e que *S. mourei* seria a espécie mais basal dentro do gênero.

Com relação a *S. quadripunctata*, é possível notar que em todas as análises, com exceção do filograma enraizado de IB, existem quatro clados monofiléticos. A distribuição geográfica dos representantes de cada um desses clados pode ser visualizada na Figura 10.

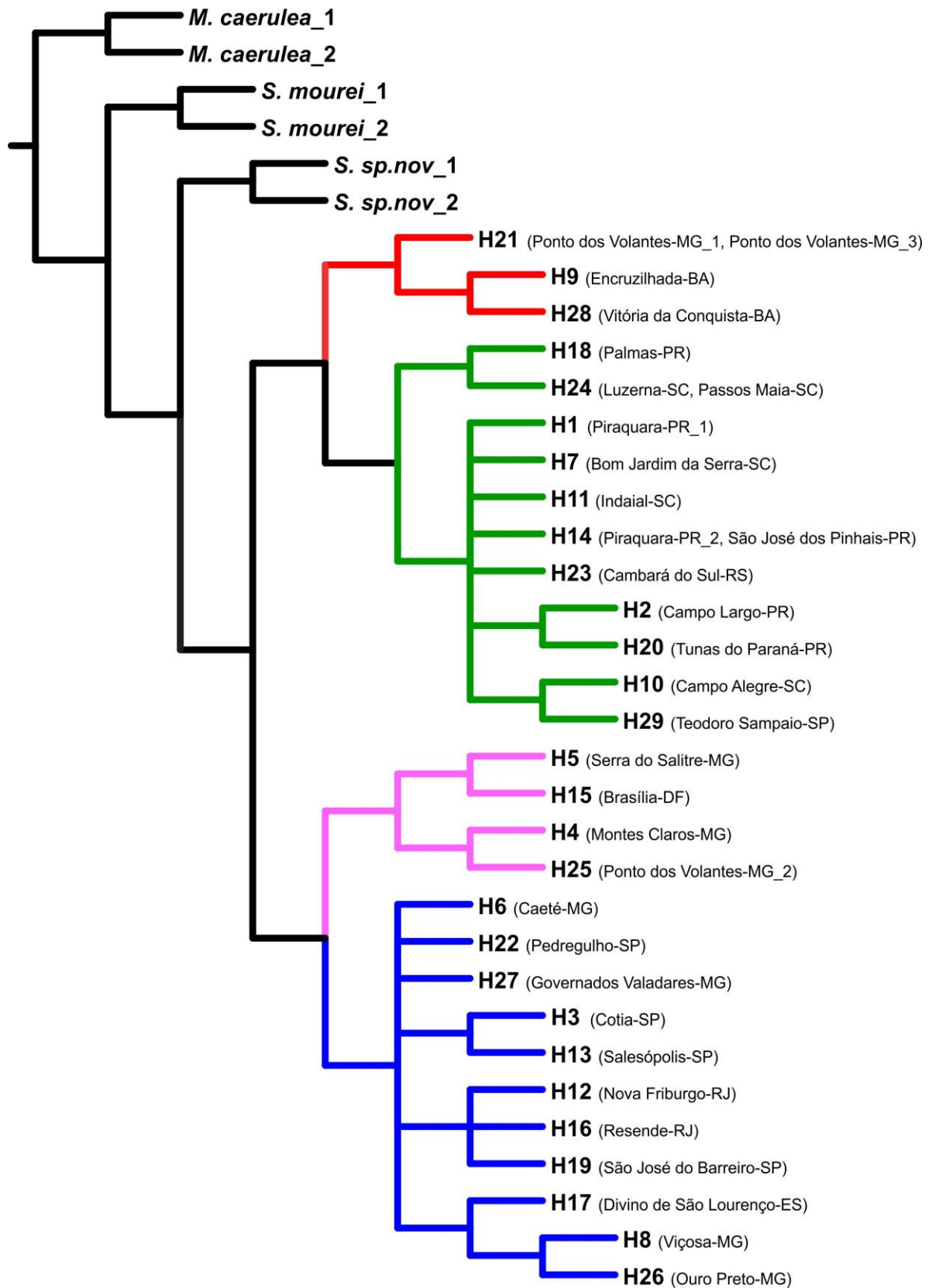


Figura 5. Árvore de consenso estrito das 220 árvores mais parcimoniosas (Comprimento: 418 passos; CI: 65; RI: 76) encontradas a partir da análise do conjunto de genes concatenados (46 terminais; 1091 caracteres; 146 informativos para a parcimônia). Em azul o Clado A; em rosa o Clado B; em vermelho o Clado C e em verde o Clado D.

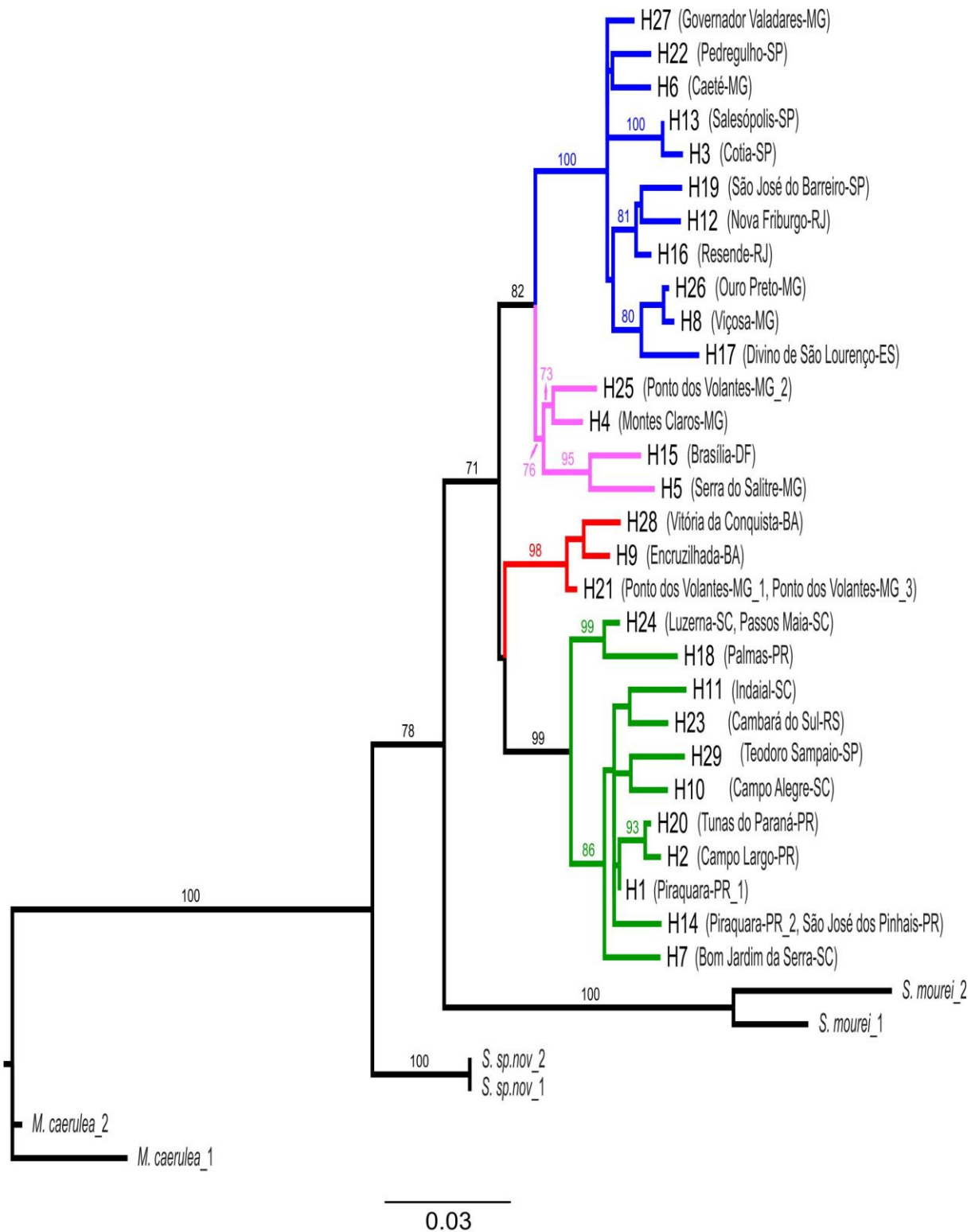


Figura 6. Filograma resultante da análise de máxima verossimilhança de 46 terminais e 1091 caracteres, provenientes do conjunto de dados concatenados. Os valores de *bootstrap* associados a cada clado estão representados em cada nó. Em azul o Clado A; em rosa o Clado B; em vermelho o Clado C e em verde o Clado D.

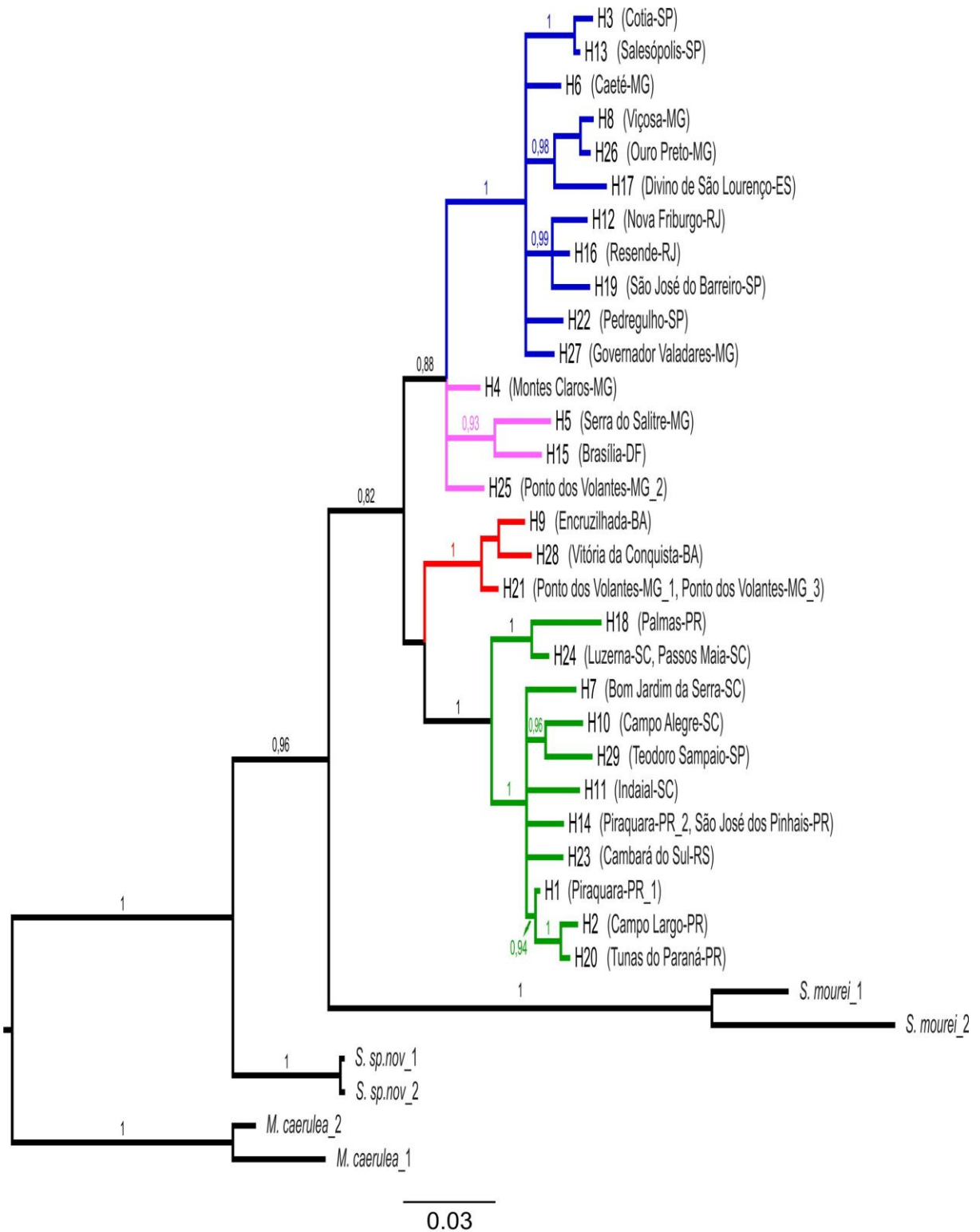


Figura 7. Filograma resultante da análise de inferência bayesiana de 46 terminais e 1091 caracteres, provenientes do conjunto de dados concatenados. Os valores de probabilidades posteriores associados a cada clado estão representados em cada nó. Em azul o Clado A; em rosa o Clado B; em vermelho o Clado C e em verde o Clado D.

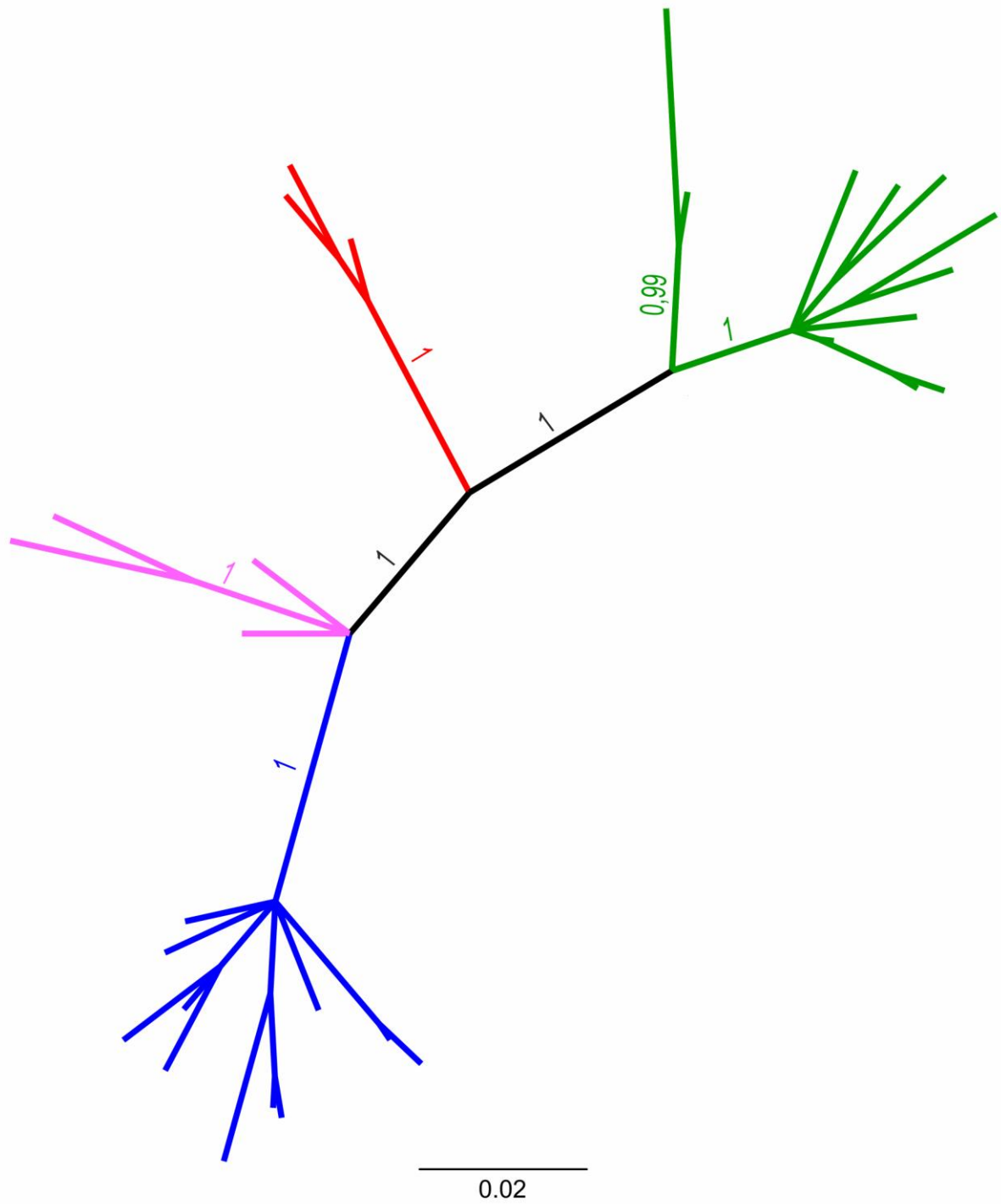


Figura 8. Árvore não enraizada resultante da análise inferência bayesiana de 40 terminais e 1091 caracteres, provenientes do conjunto de dados concatenados. Os valores de probabilidades posteriores associados a cada clado estão representados em cada nó. Em azul o Clado A; em rosa o Clado B; em vermelho o Clado C e em verde o Clado D.

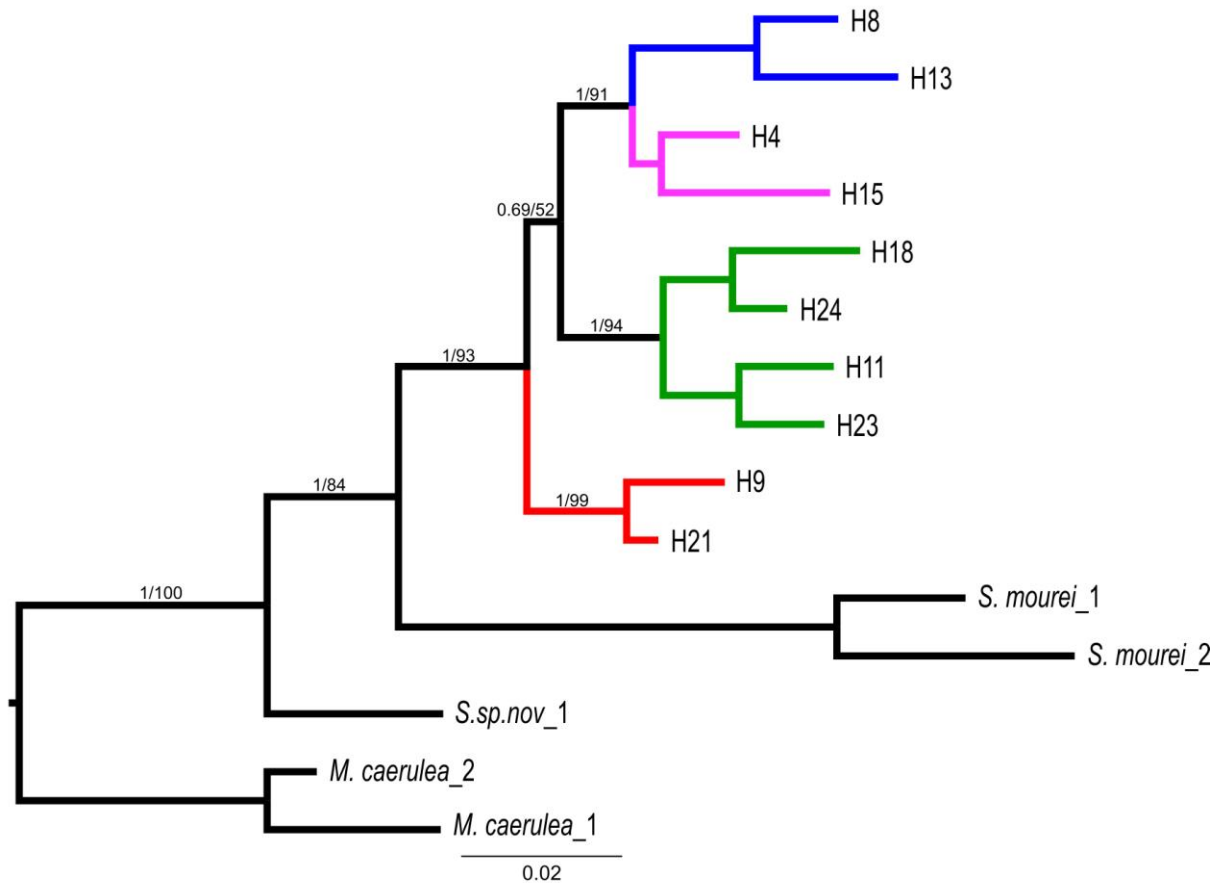


Figura 9. Filograma resultante das análises de inferência bayesiana (na figura) e máxima verossimilhança de 15 terminais e 1620 caracteres, provenientes do conjunto de dados concatenados (COI+CitB+16S). Os valores de probabilidades posteriores e *bootstrap* associados a cada clado estão representados em cada nó. Em azul o Clado A; em rosa o Clado B; em vermelho o Clado C e em verde o Clado D.

4.3 Análises filogeográficas, populacionais e demográficas

Dos 29 haplótipos encontrados para *S. quadripunctata*, 27 limitaram-se a uma determinada área geográfica. Dois haplótipos (H14 e H24) ocorreram em dois municípios diferentes, porém próximos geograficamente. A mesma localidade de Piraquara apresentou dois haplótipos diferentes (H1 e H14). As três amostras de Ponto dos Volantes resultaram em dois haplótipos (H21 e H25) associados a diferentes filogrupos, indicando uma possível zona de contato.

Os métodos de inferência filogenética revelaram a existência de um padrão geral de diferenciação genética de *S. quadripunctata* em quatro filogrupos (Clado A + Clado B + Clado C + Clado D). Cada filogrupo encontrado será considerado, a partir deste ponto, uma população distinta.

O Clado A compreende amostras originárias da Floresta Atlântica dos estados do sudeste brasileiro, totalizando 11 haplótipos. Dentro deste clado emergiram relações robustas, associadas à proximidade geográfica, entre os haplótipos H3+H13, H8+H17+H26 e H12+H16+H19. Apesar de se encontrar neste clado, o haplótipo de Pedregulho (H22), município localizado no extremo nordeste do estado de São Paulo, divisa com o estado de Minas Gerais, apresenta características morfológicas mais próximas das amostras do Cerrado (Clado B) (Melo, comunicação pessoal). Um possível caso de introgressão deve ser investigado.

O clado B, mais proximamente relacionado ao Clado A, foi sustentado nas análises de MP e MV (*bootstrap* 76). Não houve resolução nas análises de IB, sendo que apenas o grupo formado pelos haplótipos H5+H15 formou um clado. Os demais haplótipos formam uma politomia basal em relação ao Clado A. Associado ao Cerrado, este clado possui quatro haplótipos.

O clado C inclui amostras provenientes do centro-sul do estado da Bahia e do nordeste do estado de Minas Gerais, somando três haplótipos. A relação mais próxima entre os haplótipos H9+H28 pode ser associada à maior proximidade geográfica. O haplótipo H21 é formado por duas amostras de Ponto dos Volantes (amostras 1 e 3), município onde também foi encontrado o haplótipo H25 do Clado B. A distância entre as localidades de coleta desses dois haplótipos é de aproximadamente 13km.

O clado D compreende 11 haplótipos oriundos dos estados do Sul do Brasil e de Teodoro Sampaio, no extremo oeste do estado de São Paulo. Todos os haplótipos estão situados dentro dos domínios da Floresta Atlântica. A relação mais próxima entre os haplótipos H18 e H24 deve-se ao fato de estes haplótipos estarem presentes em áreas de formação campestre com elevadas altitudes (acima de 1.100 metros), localizadas na porção oeste do estado de Santa Catarina e do centro-sul do estado do Paraná. As análises filogenéticas revelam baixa estruturação geográfica entre os demais haplótipos presentes no clado.

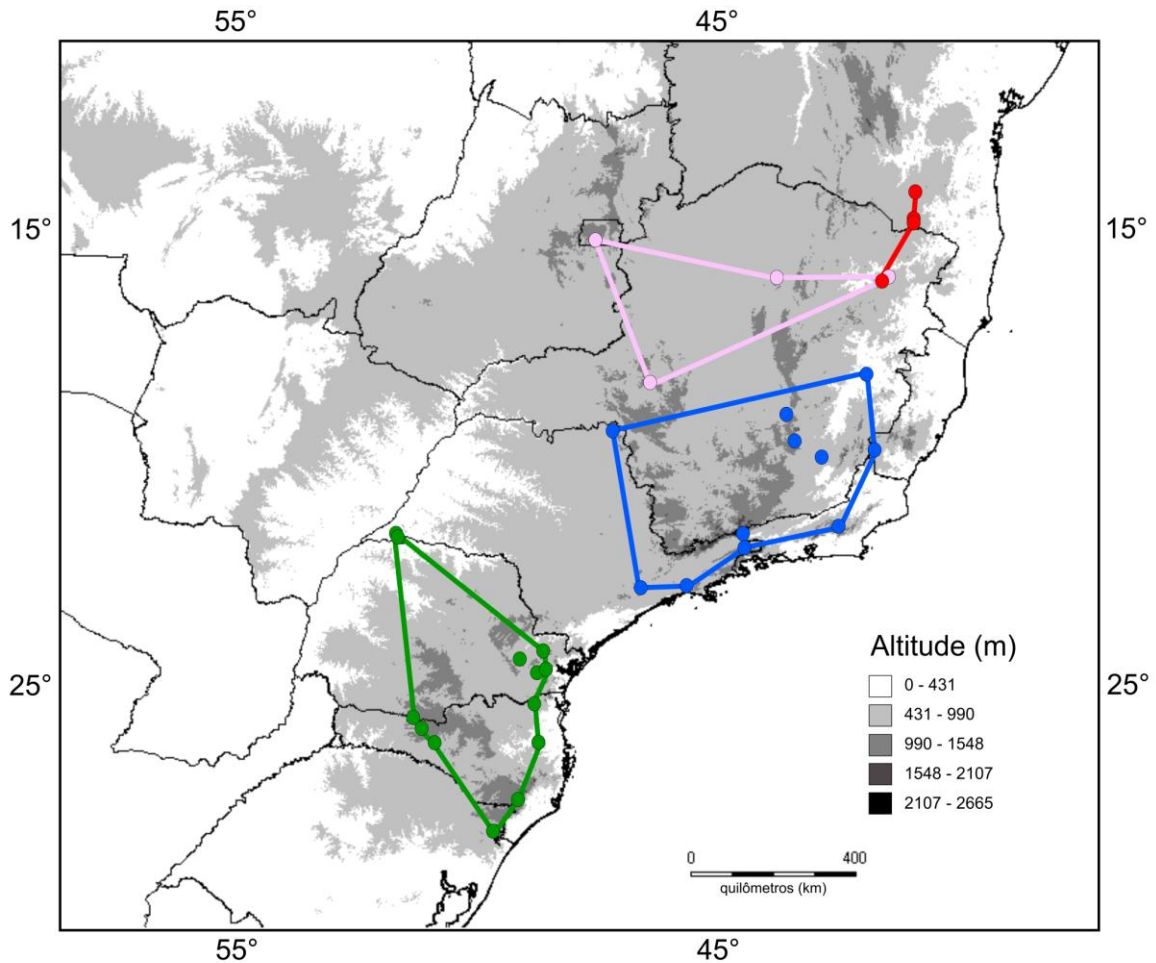


Figura 10. Mapa com indicação das 29 localidades amostrais de *S. quadripunctata* analisadas neste estudo. As diferentes cores dos círculos correspondem aos clados encontrados nas análises. Os tons acinzentados no mapa baseiam-se em reconstruções digitais do relevo, em que os tons mais escuros indicam maiores altitudes, como indicado.

A Tabela 5 mostra os valores de divergência nucleotídica média entre e dentro dos clados identificados nas análises filogenéticas e das demais espécies do gênero *Schwarziana*, calculadas utilizando a correção Kimura 2-parâmetros.

Tabela 5. Valores de divergência média, calculada através da correção Kimura 2-parâmetros, entre os clados de *S. quadripunctata* e demais espécies do gênero *Schwarziana*. Em destaque, as divergências dentro dos clados.

	CladoA	CladoB	CladoC	CladoD	<i>sp.nov.</i>	<i>mourei</i>
CladoA	1,7%					
CladoB	3,0%	2,0%				
CladoC	3,7%	3,2%	1,0%			
CladoD	4,0%	3,7%	3,3%	1,8%		
<i>sp.nov.</i>	4,8%	4,4%	4,2%	4,9%	-	
<i>mourei</i>	5,9%	5,6%	6,0%	5,9%	5,5%	-

A rede de haplótipos construída através de *median-joining* (Figura 11) permite visualizar espacialmente de uma forma mais eficiente as relações entre cada um dos haplótipos de *S. quadripunctata* encontrados. A rede concorda com a análise filogenética de IB, que indica a presença de três clados monofiléticos (clados A, C e D) e a não resolução das amostras do Cerrado.

No clado A, os grupos de haplótipos relacionados com a proximidade geográfica e encontrados nas análises filogenéticas são mantidos, mostrando que indivíduos próximos geograficamente descendem de uma mesma linhagem matrilinear. O haplótipo de Cotia (H3) parece ser derivado do haplótipo de Salesópolis (H13). Estes dois haplótipos representam as únicas amostras de *S. quadripunctata* que apresentam antenas com pilosidade longa no escapo (Melo, comunicação pessoal). O clado A separa-se das amostras do clado B por pelo menos 28 passos mutacionais, do clado C por 43 e do clado D por pelo menos 44 passos mutacionais.

No clado B não foi encontrada estruturação entre os haplótipos, concordando com os resultados das análises de IB. Este clado é separado por pelo menos 30 passos mutacionais do clado C e dos clados do sul do Brasil.

Dentro do clado C, os haplótipos da Bahia apresentam estruturação geográfica, sendo esta estruturação sustentada por um possível haplótipo ancestral extinto ou não amostrado. Pelo menos 32 passos mutacionais separam este clado daqueles do sul do Brasil.

No clado D, pode ser observada estruturação geográfica entre os haplótipos H18+H24, que separam-se dos demais haplótipos do clado por pelo menos 18 passos mutacionais. Nos demais haplótipos analisados parece não haver estruturação geográfica, corroborando as análises filogenéticas. A rede neste ponto

apresenta uma série de haplótipos extintos ou não amostrados e com poucos passos mutacionais entre si.

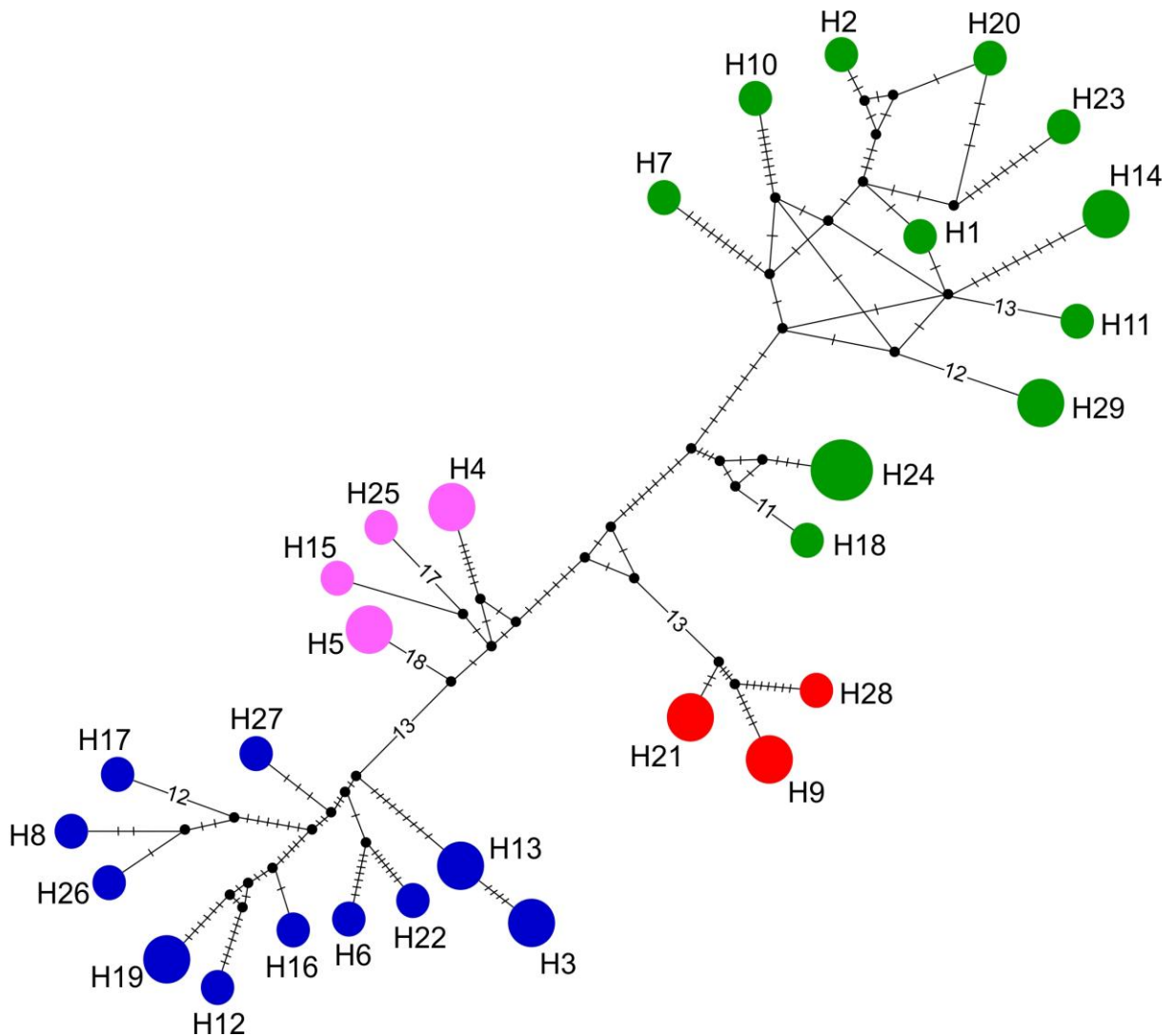


Figura 11. Rede de haplótipos median-joining, construída com o conjunto de dados concatenados, para os 40 indivíduos de *S. quadripunctata*. Cada círculo compreende um haplótipo e o seu tamanho é proporcional à sua frequência. Cada traço nas linhas que conectam os haplótipos representa um passo mutacional, mais de dez passos mutacionais foram representados por números. As cores dos haplótipos correspondem à cor de cada clado identificado nas análises filogenéticas. A codificação dos haplótipos segue aquela indicada na Tabela 1.

A análise de variância molecular (AMOVA) indicou que a maior parcela da variação observada (55,16%) ocorre entre os grupos (clados) propostos (Tabela 6), com um valor estimado do índice de fixação F_{st} de 0,55157.

Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) em *S. quadripunctata*.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	% de variação
Entre clados	3	325,657	10,71629	55,16
Entre haplótipos/ dentro de clados	36	313,643	8,71230	44,84
Total	39	639,300	19,42859	
Índice de fixação $F_{st} = 0,55157$				

Os valores de diversidade genética e os testes de neutralidade estimados para cada população inferida de *S. quadripunctata* podem ser encontrados na Tabela 4.

Os testes de neutralidade D de Tajima e F_s de Fu não foram significativos ($p > 0,05$) para nenhuma das populações analisadas, não rejeitando a hipótese de mutação neutra. Os valores negativos para o teste D de Tajima e F_s de Fu, apresentados para as populações como um todo, sugere expansão populacional recente, assim como os resultados negativos do teste D de Tajima para os Clados A e D, apesar de as estatísticas não serem significativas.

5. Discussão

A composição nucleotídica para o conjunto das sequências analisadas indica elevado percentual de A+T, corroborando o que vem sendo reportado na literatura para o DNA mitocondrial de insetos himenópteros (p. ex. Crozier & Crozier 1993, Simon *et al.* 1994, Silvestre *et al.* 2008, Batalha-Filho *et al.* 2010).

Todas as análises conduzidas neste estudo não refutaram a monofilia do gênero *Schwarziana*. Com relação ao posicionamento das espécies dentro do gênero, houveram divergências de acordo com o método de inferência filogenética empregado. Nas reconstruções que utilizam métodos probabilísticos (IB e MV), *S. mourei* foi considerada espécie irmã de *S. quadripunctata*, enquanto que a análise de máxima parcimônia apresenta *S. sp.nov* ocupando esta posição. A inclusão de um terminal representando a espécie nova da Serra da Bocaina, em São Paulo, poderia auxiliar a melhor compreensão das relações entre as espécies do gênero.

As análises filogenéticas e a rede de haplótipos mostraram a separação de *S. quadripunctata* em grupos (Clados A-D) que estão, de certa forma, relacionados à proximidade geográfica entre os pontos de coleta. Ainda que as análises de IB não tenham formado um clado monofilético com os haplótipos do Cerrado, os indivíduos a eles pertencentes apresentam características morfológicas que suportam a sua união em um único grupo (Melo, comunicação pessoal). Além disso, é possível que uma amostragem mais abrangente no Cerrado resolva a resolução deste grupo.

A rede de haplótipos apresentou uma série de ramos longos com muitos passos mutacionais (Figura 11). O acúmulo de mutações, possivelmente fixadas por deriva devido ao efeito fundador, que acompanha o comportamento de dispersão dos ninhos e/ou a perda de haplótipos intermediários ao longo das gerações podem explicar os ramos longos encontrados. O resultado da rede de haplótipos de *S. quadripunctata* faz com que ela seja incluída na Categoria I, proposta por Avise (2000), em que a perda de haplótipos intermediários em populações com ausência de fluxo gênico gera estruturação filogeográfica com padrão descontínuo de divergência genética.

O resultado da AMOVA, com percentual de variação entre os clados de 55,16% e um F_{st} de 0,55157, indicou haver uma alta estruturação entre estes clados.

Os altos valores de diversidade haplotípica e baixos valores de diversidade nucleotídica encontrados para todas as populações indicam que ocorreu expansão demográfica após um período de baixo tamanho efetivo populacional. Segundo Nei & Li (1979), o índice de diversidade nucleotídica é menos influenciável pelo tamanho amostral, tornando-o mais adequado para a comparação da variabilidade genética entre populações ou espécies diferentes.

Os valores negativos, mas não significativos, obtidos para o teste D de Tajima para a população como um todo e para os Clados A e D sugerem excesso de alelos raros para estas populações, indicando um processo de expansão populacional recente (Tajima 1993).

Hipóteses para a diversificação e distribuição atual de *S. quadripunctata*

Como já citado anteriormente, foram encontrados quatro clados, todos com congruência biogeográfica, dentro de *S. quadripunctata*. Destes, três clados (A, C e D) contemplam haplótipos encontrados na Floresta Atlântica, enquanto que o Clado B é associado ao Cerrado.

Um possível cenário para a diversificação da espécie poderia ser explicado por uma fragmentação florestal histórica que teria separado uma única espécie ancestral (*S. quadripunctata*), amplamente distribuída, em populações isoladas.

Com relação à Floresta Atlântica, sabe-se, através de uma série de estudos paleopalinológicos, que áreas atualmente cobertas por este bioma foram, no passado, áreas abertas e que isto foi causado por flutuações climáticas associadas às glaciações (Behling & Lichte 1997, Lichte & Behling 1999, Behling 2002).

Nas análises filogenéticas e na rede de haplótipos ficou evidente a quebra dos haplótipos da Floresta Atlântica em três grupos bem delimitados. O clado D é restrito a uma porção mais ao sul, enquanto que o Clado A reúne haplótipos situados mais ao norte deste bioma. O Clado C, com haplótipos encontrados principalmente nas florestas do centro-sul da Bahia, apresenta mais afinidade com os clados do sul e será discutido mais adiante.

A divisão latitudinal da Floresta Atlântica em componentes norte e sul já foi reportada para uma série de animais: em serpentes do gênero *Bothrops* (Grazziotin *et al.* 2006), em aves passeriformes (Cabanne *et al.* 2007), na abelha *Melipona quadrifasciata* (Batalha-Filho *et al.* 2010), entre outros.

Carnaval & Moritz (2008) relacionaram dados de simulações climáticas com estudos paleopalinológicos e de filogeografia, e descreveram um cenário em que, durante o Pleistoceno, as florestas da Bahia permaneceram estáveis, enquanto que ao sul desta área (especialmente na região Sudeste), as simulações indicaram que o clima não seria capaz de sustentar uma área com florestas como as atuais. Nestas áreas, concluem os autores, a floresta teria ficado restrita não a um único refúgio, mas a fragmentos muito pequenos em regiões de maior pluviosidade.

Essa maior fragmentação das florestas na região Sudeste poderia explicar as estruturas observadas dentro do Clado A, que seriam possivelmente decorrentes de recentes isolamentos por distância. Já a ausência de estruturação dentro de parte do Clado D poderia ser explicada pelo fato de as florestas associadas ao Sul do Brasil serem historicamente mais homogêneas.

A relação mais próxima entre os clados do sul e o Clado C pode ser explicada pelo fato de que as florestas em que estes clados se encontram permaneceram praticamente estáveis durante os períodos de fragmentação da Floresta Atlântica, possivelmente fazendo com que seus haplótipos tenham retido características genéticas semelhantes - o que explicaria a relação mais próxima apesar dos distanciamento geográfico.

Espécies crípticas?

Espécies crípticas são duas ou mais espécies, em geral morfológicamente indistinguíveis mas reprodutivamente isoladas, que foram erroneamente classificadas como uma única espécie nominal (Bickford *et al.* 2007, Pfenninger & Schwenk 2007).

Nas últimas duas décadas, muitos estudos filogenéticos e filogeográficos vêm descobrindo – frequentemente sem a intenção *a priori* – linhagens geneticamente divergentes, mas que são morfológicamente crípticas (Pfenninger & Schwenk 2007). De fato, a variação em dados moleculares pode sugerir a presença de múltiplas espécies crípticas (p.ex. Shaw 2001, Bain *et al.* 2003, Hebert *et al.* 2004, Pellegrino *et al.* 2005, Williams *et al.* 2006, González *et al.* 2010), mas seus limites não podem ser estabelecidos unicamente por este tipo de informação (Yeates *et al.* 2011).

Os resultados de divergência genética encontrados no presente trabalho estão apresentados na Tabela 5. Foram encontradas distâncias entre os clados variando de 3,0% (Clado A e B) até 4,0% (Clado A e D), com uma média de variação de 3,5%. Com relação aos valores de divergência intraclados, estes não foram maiores que 2% (Clado B).

Alguns autores têm proposto valores de corte de divergência genética para tornar possível a diferenciação entre aquilo que seriam espécies ou populações. Estudando padrões de variação genética do gene *CitB* em pequenos mamíferos, Bradley & Baker (2001) concluíram especificamente que: valores de divergência menores do que 2% indicariam variação intraespecífica; valores entre 2 e 11% teriam uma grande probabilidade de serem indicativos de populações coespecíficas ou de espécies válidas, que mereceriam estudos adicionais sobre seu status taxonômico; e valores de divergência superiores a 11% seriam um indicativo para o reconhecimento pleno de espécies.

Hebert *et al.* (2003), através do estudo de um fragmento do gene *COI* (a região do DNA *Barcode*), propuseram um valor de corte de 3% para as divergências genéticas. Na prática, isso significa dizer que valores abaixo desse valor apontariam indivíduos de uma mesma espécie, enquanto que valores superiores à linha de corte indicariam a presença de espécies diferentes.

Em estudos filogeográficos, as divergências intraespecíficas são raramente maiores do que 2% e são frequentemente menores do que 1% (Avice 2000). Quando as divergências observadas são maiores, elas geralmente refletem a ocorrência de isolamentos geográficos decorrentes de eventos pretéritos de fragmentação. Estas divergências podem envolver casos de incerteza taxonômica, em que linhagens compartilham um mesmo epíteto específico, mas seus status reais são incertos (Avice & Walker 1999).

Os valores de divergência genética encontrados para os filogrupos de *S. quadripunctata* correspondem aos padrões de variação sugeridos acima, o que seria um indicativo para a discriminação de unidades biológicas distintas.

Apesar disso, deve-se ter em mente que os dados moleculares não são uma panaceia para a delimitação de espécies. A informação molecular é importante e útil quando combinada com outros tipos de informação, como o exame minucioso da

morfologia, das características ecológicas e a análise das distribuições geográficas dos táxons envolvidos (Bickford *et al.* 2007).

Portanto, uma análise criteriosa da morfologia, utilizando morfometria geométrica de asas, por exemplo, que tem se mostrado muito útil no reconhecimento de espécies crípticas em himenópteros (Aytekin *et al.* 2007, Villemant *et al.* 2007), combinada com a adição de sequências nucleares ao conjunto de dados poderia dar maior suporte a uma possível separação de *S. quadripunctata* em um complexo de espécies crípticas.

6. Conclusões

- Os resultados obtidos não refutam a monofilia do gênero *Schwarziana*;
- Os diferentes métodos de reconstrução filogenética utilizados não foram consistentes com relação ao posicionamento das espécies dentro de *Schwarziana*. É possível que com o uso com o uso de marcadores nucleares e/ou de espécimes da forma nova conhecida para a Serra da Bocaina, em São Paulo, o posicionamento das espécies dentro do gênero torne-se mais claro;
- *S. quadripunctata* forma um grupo monofilético, que apresenta uma alta variabilidade genética ao longo de sua área de distribuição;
- Os resultados do estudo filogeográfico nos fazem concluir que os haplótipos de *S. quadripunctata* estão estruturados em quatro filogrupos com evidente congruência biogeográfica;
- É possível que tal estruturação seja explicada por eventos antigos, decorrentes de mudanças climáticas devido às glaciações pleistocênicas;
- A possibilidade da separação de *S. quadripunctata* em um complexo de espécies crípticas deve ser melhor investigada, pois foram encontrados resultados que sugerem tal separação;
- A adição de marcadores nucleares aos dados e um estudo criterioso da morfologia podem ajudar a solucionar o problema.

7. Referências Bibliográficas

- Alexander, B. A. & C. D. Michener. 1995. Phylogenetic studies of the families of the short-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). **The University of Kansas Science Bulletin 55**: 377-424.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research 25**: 3389-3402.
- Arbogast, B. S. & G. J. Kenagy. 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. **Journal of Biogeography 28**: 819-825.
- Arias, M. C., F. O. Francisco & D. Silvestre. 2003. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos, p. 305-309. *In*: Melo, G. A. R. & I. Alves-dos-Santos (Eds.). **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Criciúma, Editora UNESC, 320p.
- Avise, J. C. & D. Walker. 1999. Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA 96**: 992-995.
- Avise, J. C. 1994. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Chapman and Hall, New York, xiv+511p.
- Avise, J. C. 2000. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, viii+447p.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb & N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics 18**: 489-522.

- Aytekin, A. M., M. Terzo, P. Ramont & N. Çagatay. 2007. Landmark based geometric morphometric analysis of wing shape in *Sibiricobombus* Vogt (Hymenoptera: Apidae: *Bombus* Latreille). **Annales de la Société Entomologique de France** **43**: 95-102.
- Bain, R. H., A. Lathrop, R. W. Murphy, N. Orlov & H. T. Cuc. 2003. Cryptic species of a cascade frog from southeast Asia: taxonomic revisions and descriptions of six new species. **American Museum Novitates** **3417**: 60p.
- Bandelt, H. J., P. Forster & A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution** **16**: 37-48.
- Barth, F. G. 1991. **Insects and Flowers: the Biology of a Partnership**. Princeton University Press, New Jersey, 408p.
- Batalha-Filho H., A. M. Waldschmidt, L. A. O. Campos, M. G. Tavares & T. M. Fernandes-Salomão. 2010. Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): Incongruence between morphology and mitochondrial DNA. **Apidologie** **41**: 534-547.
- Batra, S. W. 1984. Solitary bees. **Scientific American** **250**: 86-93.
- Behling, H. 2002. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology** **177**: 19-27.
- Behling, H. & M. Litche. 1997. Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times in tropical southeastern Brazil. **Quaternary Research** **48**: 348-358.
- Bickford, D., D. J. Lohman, N. S. Sohdi, Ng. K. L. Peter, R. Meier, K. Winker, I. K. Krista & I. Das. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution** **22**: 148-155.
- Bonfield, J.K., K. F. Smith & R. Staden. 1995. A new DNA sequence assembly program. **Nucleic Acids Research** **23**: 4992-4999.

- Boore, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research** **27**: 1767-1780.
- Bradley, R. D. & R. J. Baker. 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals. **Journal of Mammalogy** **82**: 960-973.
- Bridge, D., C. W. Cunningham, B. Schierwater, R. DeSalle, & L. W. Buss. 1992. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **89**: 8750-8753.
- Cabanne, G. S., F. R. Santos & C. Y. Miyaki. 2007. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society** **91**: 73-84.
- Camargo J. M. F. & D. W. Roubik. 2005. Neotropical Meliponini: *Paratrigonoides mayri*, new genus and species from western Colombia (Hymenoptera, Apidae, Apinae) and phylogeny of related genera. **Zootaxa** **1081**: 33-45.
- Camargo, J. M. F. & S. R. M. Pedro. 1992. Systematics, phylogeny, and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. **Apidologie** **23**: 509-522.
- Camargo, J. M. F. & S. R. M. Pedro. 2003. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae) - bionomia e biogeografia. **Revista Brasileira de Entomologia** **47**: 311-372 .
- Camargo, J. M. F. & S. R. M. Pedro. 2007. Meliponini Lepeletier, 1836, p. 272-578. *In*: Moure, J. S, D. Urban and G.A.R. Melo (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba, xvi+1058p.
- Camargo, J. M. F. 1974. Notas sobre a morfologia de *Plebeia (Schwarziana) quadripunctata quadripunctata* (Hym., Apidae). **Studia Entomologica** **17**: 433-47.

- Cameron, S. A., J. N. Derr, A. D. Austin, J. B. Woolley & R. A. Wharton. 1992. The application of nucleotide sequence data to phylogeny of the Hymenoptera: a review. **Journal of Hymenoptera Research** **1**: 63-79.
- Cameron, S. A. 1993. Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** **90**: 8687-8691.
- Carnaval, A. C. & C. Moritz. 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Biogeography** **35**: 1187-1201.
- Cheung, W. Y., N. Hubert, & B. S. Landry. 1993. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **Technical Tips** **3**: 69-70.
- Costa, M. A., M. A. Del Lama, G. A. R. Melo & W. S. Sheppard. 2003. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. **Apidologie** **34**: 73-84.
- Crozier, R. H. & Y. C. Crozier. 1993. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and the genome organization. **Genetics** **133**: 97-117.
- Dick, C. W., D. W. Roubik, K. F. Gruber & E. Bermingham. 2004. Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. **Molecular Ecology** **13**: 3775-3785.
- Diniz-Filho, J. A. F., S. Fuchs & M. C. Arias. 1999. Phylogeographical autocorrelation of phenotypic evolution in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Heredity** **83**: 671-680.
- Dowton, M. & A. D. Austin. 1994. Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: apocritan relationships. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** **91**: 9911-9915.

- Dowton M. & A. D. Austin. 1997. The evolution of strand-specific compositional bias. A case study in the hymenopteran mitochondrial 16S rRNA gene. **Molecular Biology and Evolution** **14**: 109-112.
- Drummond, A. J., B. Ashton, S. Buxton, M. Cheung, A. Cooper, C. Duran, M. Field, J. Heled, M. Kearse, S. Markowitz, R. Moir, S. Stones-Havas, S. Sturrock, T. Thierer & A. Wilson. 2010. **Geneious v5.3**. <<http://www.geneious.com>>.
- Eardley, C. D. 2004. Taxonomic revision of the African stingless bees (Apoidea: Apidae: Apinae: Meliponini). **African Plant Protection** **10**: 63-96.
- Excoffier, L., G. Laval & S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online** **1**: 47-50.
- Farris, J. S. 1983. The logical basis of phylogenetic analysis, p. 7-36. *In*: Platnick, N. I. & V. A. Funk (Eds.). **Advances in Cladistics**, vol. 2. Columbia University Press, New York.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology** **3**: 294-297.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics** **147**: 915-925.
- Gadagkar, S. R., M. S. Rosenberg & S. Kumar. 2005. Inferring species phylogenies from multiple genes: Concatenated sequence tree versus consensus gene tree. **Journal of Experimental Zoology Part B** **304**: 64-74.
- Goloboff, P. 1999. **Nona (No Name) ver. 2.0**. Publicado pelo autor. Tucumán.
- González, P., Y. E. Sawyer, M. Avila, A. G. Armién, B. Armién & J. A. Cook. 2010. Variation in cytochrome-b haplotypes suggests a new species of *Zygodontomys* (Rodentia: Cricetidae) endemic to Isla Coiba, Panama. **Zoologia** **27**: 660-665.

- Grazziotin, F. G., M. Monzel, S. Echeverrigaray & S. L. Bonatto. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology** **15**: 3969-3982.
- Guindon, S., J. F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk & O. Gascuel. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology** **59**: 307-321.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** **41**: 95-98.
- Heard, T. A. 1999. The role of stingless bees in crop pollination. **Annual Review of Entomology** **44**: 183-206.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball & J. R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London B** **270**: 313-321.
- Hebert, P. D. N., E. H. Penton, J. M. Burns, D. H. Janzen & W. Hallwachs. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **101**: 14812-14817.
- Huelsenbeck, J. P. & F. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics** **17**: 754-755.
- Hurst, G. D. D. & F. M. Jiggins. 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. **Proceedings of the Royal Society of London B** **272**: 1525-1534.
- Librado, P. & J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** **25**: 1451-1452.

- Litche, M & H. Behling. 1999. Dry and cold climatic conditions in the formation of the present landscape in southeastern Brazil: an interdisciplinary approach to a controversial topic. **Zeitschrift für Geomorphologie 43**: 341-358.
- Martins, F. M. & M. V. Domingues. 2011. Filogeografia, p. 137-150. *In*: Carvalho, C. J. B. & E. A. B. Almeida (Orgs). **Biogeografia da América do Sul - Padrões & Processos**. Roca, São Paulo.
- Melo, G. A. R. 1999. Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera), with emphasis on the crabronid wasps. **Scientific Papers of the Natural History Museum, The University of Kansas 14**: 1-55.
- Melo, G. A. R. 2003. Notas sobre meliponíneos neotropicais, com a descrição de três novas espécies (Hymenoptera, Apidae), p. 85-91. *In*: Melo, G. A. R. & I. Alves-dos-Santos (Eds.). **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Criciúma, Editora UNESC.
- Melo, G. A. R. & R. B. Gonçalves. 2005. Higher-level bee classifications. **Revista Brasileira de Zoologia 22**: 153-159.
- Michener, C. D. 2007. **The Bees of the World**. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Michener, C. D. 1990. Classification of the Apidae (Hymenoptera). **University of Kansas Science Bulletin 54**: 75-164.
- Moritz, C., T. E. Dowling & W. M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics 18**: 269-292.
- Moure, J. S. 1943. Abelhas de Batatais (Hym. Apoidea). **Arquivos do Museu Paranaense 3**: 145-203.

- Nedbal, M. A. & J. J. Flynn. 1998. Do combined effects of asymmetric process of replication and DNA damage from oxygen radicals produce a mutation-rate signature in the mitochondrial genome? **Molecular Biology and Evolution** **15**: 219-223.
- Nei, M. & W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **76**: 5269-5273.
- Nixon, K. C. 1999-2002. **Winclada ver. 1.0**. Publicado pelo autor. Ithaca, New York, USA.
- Nogueira-Neto, P. 1954. Notas bionômicas sobre meliponíneos: III - Sobre a enxameagem. **Arquivos do Museu Nacional** **42**: 419-451.
- Pamilo, P., P. Gertsch, P. Thorén & P. Seppä. 1997. Molecular population genetics of social insects. **Annual Review of Ecological Systems** **28**: 1-25.
- Pfenninger, M. & K. Schwenk. 2007. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. **BMC Evolutionary Biology** **7**: 121.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution** **25**: 1253-1256.
- Raimond, R., I. Marcadé, D. Bouchon, T. Rigaud, J. P. Bossy & C. Souty-Grosset. 1999. Organization of the large mitochondrial genome in the isopod *Armadillidium vulgare*. **Genetics** **151**: 203-210.
- Rambaut, A. 2009. **Tree Figure Drawing Tool, Version 1.3.1**. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, UK.
- Rasmussen, C. 2008. Catalog of the Indo-Malayan/Australasian stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Zootaxa** **1935**: 1-80.

- Rasmussen, C. & S. A. Cameron. 2010. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. **Biological Journal of the Linnean Society** **99**: 206-232.
- Ridley, M. 2006. **Evolução**. Artmed, Porto Alegre, 752p.
- Roig-Alsina, A. & C. D. Michener. 1993. Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). **University of Kansas Science Bulletin** **55**: 357-392.
- Ronquist, F. & J. P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** **19**: 1572-1574.
- Roubik, D. W. 1989. **Ecology and Natural History of Tropical Bees**. Cambridge University Press, Cambridge, 514p.
- Schwarz, H. F. 1948. Stingless bees (Meliponidae) of the Western Hemisphere. **Bulletin of the American Museum of Natural History** **90**: xvii+546.
- Shaw, A. J. 2001. Biogeographic patterns and cryptic speciation in bryophytes. **Journal of Biogeography** **28**: 253-261.
- Silveira, F. A., G. A. R. Melo & E. A. Almeida. 2002. **Abelhas Brasileiras - Sistemática e Identificação**. F. A. Silveira (Ed.). Belo Horizonte, 251 p.
- Silvestre, D., M. Downton & M. C. Arias. 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. **Genetics and Molecular Biology** **31**: 451-460.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved PCR primers. **Annals of the Entomological Society of America** **87**: 651-701.

- Solorzano, C. D., A. L. Szalanski, M. Kence, J. A. McKern, J. W. Austin J.W & A. Kence. 2009. Phylogeography and population genetics of honey bees (*Apis mellifera* L.) from Turkey based on COI-COII sequence data. **Sociobiology 53**: 237-246.
- Soucy, S. L. & B. N. Danforth. 2002. Phylogeography of the socially polymorphic sweat bee *Halictus rubicundus* (Hymenoptera: Halictidae). **Evolution 56**: 330-341.
- Swofford, D. L., G. J. Olsen, P. J. Waddell & D. M. Hillis. 1996. Phylogenetic Inference, p. 407–514. *In*: Hillis, M, C. Moritz & B. K. Mable (Eds.). **Molecular Systematics**. Sinauer Associates, Sunderland.
- Tajima, F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics 123**: 585-595.
- Tajima, F. 1993. Simple methods for testing molecular clock hypothesis. **Genetics 135**: 599-607.
- Tamura K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution 24**: 1596-1599.
- Tanaka, H., D. W. Roubik, M. Kato & G. Gunsalam. 2001. Phylogenetic position of *Apis nuluensis* of northern Borneo and phylogeography of *A. cerana* as inferred from mitochondrial DNA sequences. **Insectes Sociaux 48**: 44-51.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins & T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research 22**: 4673-4680.
- Villemant, C., G. Simbolotti & M. Kenis. 2007. Discrimination of *Eubazus* (Hymenoptera, Braconidae) sibling species using geometric morphometrics analysis of wing venation. **Systematic Entomology 32**: 625-634.

- Warrior, R. & J. Gall. 1985. The mitochondrial DNA of *Hydra attenuata* and *Hydra littoralis* consists of two linear molecules. **Archives Des Sciences** **38**: 439-445.
- Weinstock, G. M. *et al.* 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. **Nature** **443**: 931-949.
- Whitfield, J. B. & S. A. Cameron. 1998. Hierarchical analysis of variation in the mitochondrial 16S rRNA gene among Hymenoptera. **Molecular Biology and Evolution** **15**: 1728-1743.
- Williams, H. C., S. J. Ormerod & M. W. Bruford. 2006. Molecular systematics and phylogeography of the cryptic species complex *Baetis rhodani* (Ephemeroptera, Baetidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** **40**: 370-382.
- Wolstenholme, J. 1992. An introduction to human chromosomes and their analysis, p. 1-20. *In*: Rooney, D. E. & B. H Czepulkowski (Eds.). **Human Cytogenetics: a Practical Approach**. Oxford University Press, Oxford.
- Xia, X & Z, Xie. 2001. DAMBE. Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity** **92**: 371-373.
- Yamada, A. M. T. D. 2010. **Relações filogenéticas do gênero *Scaura* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) e filogeografia de *Scaura latitarsis***. Tese (Doutorado em Genética). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 201p.

ANEXOS

Anexo A. Matriz alinhada das sequências de nucleotídeos obtidas a partir da união dos fragmentos dos genes COI e CitB, totalizando 1091 caracteres e 46 amostras. Os pontos de interrogação (?) indicam a ausência de dados.

	5	15	25	35	45	55	65	75	85	95		
H1	AATTTTATAC	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCTGGTAT	GTGAATTAAT		
H2	AATTTTATAC	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCTGGTAT	GTGGATTAAT		
H3	AATTTTATAC	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCGTCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
H4	AATCTTATAC	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
H5	AATCTTATAC	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
H6	AATTTTATAC	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCGTCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
H7	AATTTTATAC	ATGATATTTG	CTTTATGATC	AGGTATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGTAT	ATGAATTAAT		
H8	AATTTTATAT	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
H9	AATCTTATAT	ATAATATTTG	CCTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
H10	AATTTTATAT	ATAATATTTG	CCTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGTAT	GTGAATTAAT		
H11	AATTTTATAC	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGTAT	ATGAATTAAT		
H12	AATTTTATAC	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCGTCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
H13	AATTTTATAC	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCGTCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
H14	AATTTTATAC	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CGCCAGGTAT	GTGAATTAAT		
H15	AATCTTATAC	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
H16	AATTTTATAC	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCGTCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
H17	AATTTTATAC	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
H18	AATTTTATAT	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGTAT	GTGAATTAAT		
H19	AATTTTATAT	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCGTCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
H20	AATTTTATAC	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCTGGTAT	GTGGATTAAT		
H21	AATCTTATAT	ATAATATTTG	CCTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
H22	AATTTTATAC	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCGTCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
H23	AATTTTATAC	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CGCCAGGTAT	ATGAATTAAT		
H24	AATTTTATAT	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGTAT	GTGAATTAAT		
H25	AATCTTATAC	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAGTTAAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
H26	AATTTTATAT	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
H27	AATTTTATAT	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCGTCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
H28	AATCTTATAT	ATAATATTTG	CCTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
H29	AATTTTATAC	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CGCCAGGTAT	GTGAATTAAT		
S. sp.nov_1	AATTTTATAT	ATAATATTTG	CTTTATGATC	GGGAATAAAT	GGATCATCAT	TCAGTATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CCCCAGGAAT	ATGAATTAAT		
S. sp.nov_2	AATTTTATAT	ATAATATTTG	CTTTATGATC	GGGAATAAAT	GGATCATCAT	TCAGTATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CCCCAGGAAT	ATGAATTAAT		
S. mourei_1	AATCTTATAT	ATAATATTTG	CTTTATGATC	TGGTATAAAT	GGATCATCAT	TTAGTATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAGT	ATGAATTAAT		
S. mourei_2	AATCTTATAT	ATAGTATTTG	CTTTATGATC	AGGGATAAAT	GGATCTTCAT	TTAGTATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	CACCAGGAAT	ATGAATTAAT		
Mourella_caerulea_1	AATTTTATAT	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGAATA	GAATTAATA	GACCAGGTAT	ATGAATTAAT		
Mourella_caerulea_2	AATTTTATAT	ATAATATTTG	CTTTATGATC	AGGAATAAAT	GGATCATCAT	TTAGAATAAT	TATTCGGATA	GAATTAATA	GACCAGGTAT	ATGAATTAAT		

	105	115	125	135	145	155	165	175	185	195		
H1	AATGATCAAA	TTTATAATTC	AATCATTACT	AGTCATGCAT	TTTTAATAAT	TTTTTTTATA	GTTATACCAT	TTATAATTGG	AGGTTTTGGA	AATTTTTTAT		
H2	AATGATCAAA	TTTATAATTC	AATCATTACT	AGTCATGCAT	TTTTAATAAT	TTTTTTTATA	GTTATACCAT	TTATAATTGG	AGGTTTTGGA	AATTTTTTAT		
H3	AATGATCAAA	TCTATAATTC	TATTATCACT	AGTCATGCAT	TTTTAATAAT	TTTTTTTATA	GTTATACCAT	TTATAATTGG	AGGTTTTGGA	AATTTTTTAT		
H4	AATGATCAAA	TTTATAATTC	AATTATCACT	AGTCATGCAT	TTTTAATAAT	TTTTTTTATA	GTTATACCAT	TTATAATTGG	AGGTTTTGGA	AATTTTTTAT		

H29	TTTATTTTT	CCTAATTCAG	GAAGTGGATG	AACAGTTTAT	CCCCATTAT	CTTCATATTT	GTATCATCCT	TCTCCATCAG	TTGATTTTAC	AATTTTTTCA
S. sp.nov_1	TTTATTTTT	CCTAATTCAG	GAAGTGGATG	AACAATTTAT	CCTCCATTAT	CATCATATTT	ATATCATCCT	TCACCATCAG	TAGATTTTAC	AATTTTTTCA
S. sp.nov_2	TTTATTTTT	CCTAATTCAG	GAAGTGGATG	AACAATTTAT	CCTCCATTAT	CATCATATTT	ATATCATCCT	TCACCATCAG	TAGATTTTAC	AATTTTTTCA
S. mourei_1	TTTATTTTT	CCTAATTCAG	GAAGTGGATG	AACGATTTAT	CCTCCATTAT	CTTCATATTT	ATATCATCCT	TCCCCATCAG	TAGATTTTAC	AATTTTTTCT
S. mourei_2	TTTATTTTT	CCTAATTCAG	GAAGTGGATG	AACAATTTAT	CCTCCATTAT	CCTCCATTAT	CTTCATATTT	ATATCATCCT	TCTCCATCAG	TAGATTTTAC
Mourella_caerulea_1	TTTATTTTTC	CCTAATTCAG	GAAGTGGGTTG	AACAGTTTAT	CCTCCATTAT	CTTCATATTT	ATATCATCCT	TCTCCTTCAG	TTGATTTTAC	TATTTTTTCA
Mourella_caerulea_2	TTTATTTTT	CCTAATTCAG	GAAGTGGATG	AACAGTTTAT	CCTCCATTAT	CATCATATTT	ATATCATCCT	TCTCCTTCAG	TTGATTTTAC	TATTTTTTCA

	405	415	425	435	445	455	465	475	485	495
H1	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATCGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATTAATT
H2	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATCGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATTAATT
H3	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATCAATT
H4	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAATTATGAT	CAAATCAATT
H5	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAATTATGAT	CAAATCAATC
H6	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATCAATT
H7	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATCGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATTAATT
H8	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATTAATT
H9	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTACGAT	CAAATTAATT
H10	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATCGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATTAATT
H11	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATCGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATTAATT
H12	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATTAATT
H13	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATCAATT
H14	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATCGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATTAATT
H15	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATCAATT
H16	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATCAATT
H17	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATCAATT
H18	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATCGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAATTATGAC	CAAATTAATT
H19	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATCAATT
H20	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATCGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATTAATT
H21	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTACGAT	CAAATTAATT
H22	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATCAATT
H23	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATCGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATTAATT
H24	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAATTATGAT	CAAATTAATT
H25	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAATTATGAT	CAAATCAATT
H26	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAATTATGAT	CAAATTAATT
H27	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATCAATT
H28	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTACGAT	CAAATTAATT
H29	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATCGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAACTATGAT	CAAATTAATT
S. sp.nov_1	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAATTACGAT	CAAATTAATT
S. sp.nov_2	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAATTACGAT	CAAATTAATT
S. mourei_1	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAATTATGAT	CAAATTAATT
S. mourei_2	ATTCATATAA	CTGGAATTTT	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	AAATTATGAT	CAAATTAATT
Mourella_caerulea_1	ATTCATATAA	CAGGAATCTC	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	GAATTATGAT	CAAATTAATT
Mourella_caerulea_2	ATTCATATAA	CAGGAATCTC	ATCAATTTTA	GGATCATTAA	ATTTTATTGT	AACAATTTTT	ATAATAAAAA	ATTTTTCATT	GAATTATGAT	CAAATTAATT

	505	515	525	535	545	555	565	575	585	595
H1	TATTTTCATG	ATCAATTTCT	ATTACTGTTA	TTTTATTAAT	TCTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTCAA
H2	TATTTTCATG	ATCAATTTCT	ATTACTGTTA	TTTTATTAAT	TCTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTCAA
H3	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTTA	TTTTATTAAT	TTTATCCTTA	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA

H4	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTAA	TTTTACTAAT	TTTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
H5	TATTTTCATG	ATCAATCTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
H6	TATTTTCATG	ATCAATCTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
H7	TATTTTCATG	ATCAATTTCT	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TCTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTGTTTGATC	GTAATTTTAA
H8	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCACTA	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
H9	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	CACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
H10	TATTTTCATG	ATCAATCTCT	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TCTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTCAA
H11	TATTTTCATG	ATCAATTTCT	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
H12	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
H13	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCCTTA	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
H14	TATTTTCATG	ATCAATTTCT	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TCTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTCAA
H15	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCGTTA	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
H16	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
H17	TATTTTCATG	ATCAATCTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCACTA	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TATAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
H18	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCGTTA	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
H19	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
H20	TATTTTCATG	ATCAATTTCT	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TCTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTCAA
H21	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	CACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
H22	TATTTTCATG	ATCAATCTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATGTTA	TTATTTGATC	GTAATTTCAA
H23	TATTTTCATG	ATCAATTTCT	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTCAA
H24	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCGTTA	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
H25	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATT	GTAATTTTAA
H26	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCACTA	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
H27	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
H28	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	CACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
H29	TATTTTCATG	ATCAATCTCT	ATTACTGTAA	TCTTATTAAT	TTTATCATT	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTCAA
S. sp.nov_1	TATTTTCTTG	ATCAATTTCA	ATCACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCTTTA	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATACTA	TTATTTGATC	GAAATTTTAA
S. sp.nov_2	TATTTTCTTG	ATCAATTTCA	ATCACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCTTTA	CCAGTATTAG	CAGGAGCTAT	TACAATACTA	TTATTTGATC	GAAATTTTAA
S. mourei_1	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCATT	CCTGTATTAG	CTGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
S. mourei_2	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTAAT	TTTATCATT	CCTGTATTAG	CTGGAGCTAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
Mourella_caerulea_1	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATTACTGTAA	TTTTATTGAT	TTTATCTTTA	CCAGTATTAG	CTGGAGCAAT	TACAATACTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA
Mourella_caerulea_2	TATTTTCATG	ATCAATTTCA	ATCACTGTAA	TTTTATTGAT	TTTATCTTTA	CCAGTATTAG	CTGGAGCAAT	TACAATATTA	TTATTTGATC	GTAATTTTAA

	605	615	625	635	645	655	665	675	685	695
H1	TACATCTTTT	TTTGATCCAA	TAGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTAT	TTTGAGGAGC	TATGGTAATT	ACAAATTTAT	TATCAGCATT
H2	TACATCTTTT	TTTGATCCAA	TAGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTAT	TGTGAGGAGC	TATAGTAATT	ACAAATTTAT	TATCAGCATT
H3	TACATCTTTT	TTTGATCCAA	TAGGAGGGGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTAT	TTTGAGGAGC	AATAGTAATT	ACAAATTTAT	TGTCAGCATT
H4	TACATCTTTT	TTTGATCCAA	TAGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTAT	TTTGAGGAGC	AATAGTAATT	ACAAATTTAT	TATCAGCATT
H5	TACATCTTTT	TTTGATCCAA	TAGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTAT	TTTGAGGAGC	AATAGTAATT	ACAAATTTAT	TATCGGCATT
H6	TACATCTTTT	TTTGATCCAA	TAGGAGGAGG	GGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTAT	TTTGAGGAGC	AATAGTAATT	ACAACTTTAT	TATCGGCATT
H7	TACATCTTTT	TTTGATCCAA	TAGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTAT	TTTGAGGGGC	TATAGTAATT	ACAAATTTAT	TATCAGCATT
H8	TACATCTTTT	TTTGATCCAA	TAGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTAT	TTTGAGGAGC	AATAGTGATT	ACAAATTTAT	TGTCAGCATT
H9	TACTTCTTTT	TTTGATCCAA	TAGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTAT	TTTGAGGAGC	TATAGTAATT	ACAAATTTAT	TATCAGCATT
H10	TACATCTTTT	TTTGATCCAA	TAGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTAT	TTTGAGGAGC	CATAGTAATT	ACAAATTTAT	TATCAGCATT
H11	TACATCTTTT	TTTGATCCAA	TAGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTAT	TTTGAGGAGC	TATGGTAATT	ACAAATTTAC	TATCAGCATT
H12	TACATCTTTT	TTTGACCCAA	TAGGAGGGGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTAT	TTTGAGGGGC	AATGGTAATT	ACAAATTTAT	TGTCAGCATT
H13	TACATCTTTT	TTTGATCCAA	TAGGAGGGGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTAT	TTTGAGGAGC	AATAGTAATT	ACAAATTTAT	TGTCAGCATT
H14	TACATCTTTT	TTTGATCCAA	TAGGAGGAGG	AGACCCAAAT	TTATATCAAC	ATTTATTTAT	TTTGAGGAGC	TATGGTAATT	ACAAATTTAT	TATCAGCATT
H15	TACATCTTTT	TTTGATCCAA	TAGGAGGAGG	AGATCCAATT	TTATATCAAC	ATTTATTTAT	TTTGAGGGGC	AATAGTAATT	ACAAATTTAT	TATCGGCATT

H28	ACCTTATATT	GGAAAAATAA	TTGTTGAATG	AGTATGAGGT	GGATTTTCTA	TTAATAATTC	AACTTTAAAT	CGATTTTTTT	CTCTTCATTT	TATTTTACCA
H29	ACCTTATATT	GGAAAAATAA	TTGTTGAATG	AGTTTGAGGT	GGATTTTCTA	TTAATAATTC	AACTTTAAAT	CGATTTTTTT	CACTTCATTT	TATTTTACCA
S. sp.nov_1	GCCTTATATT	GGAAAAATAA	TTGTTGAATG	AGTATGAGGT	GGATTTTCAA	TTAATAATTC	AACTTTAAAT	CGATTTTTTT	CTCTTCATTT	TATTTTACCA
S. sp.nov_2	GCCTTATATT	GGAAAAATAA	TTGTTGAATG	AGTATGAGGT	GGATTTTCAA	TTAATAATTC	AACTTTAAAT	CGATTTTTTT	CTCTTCATTT	TATTTTACCA
S. mourei_1	ACCTTATATT	GGAAAAATAA	TTGTTGAATG	AGTATGAGGT	GGATTTTCTA	TTAACAACCT	AACTTTAAAT	CGATTTTTTT	CACTTCATTT	TATTTTACCA
S. mourei_2	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????
Mourella_caerulea_1	ACCTTATATT	GGAAAAATAA	TCGTTGAATG	AGTATGAGGT	GGATTTACAA	TTAATAATTC	AACTTTAAAT	CGATTCCTTT	CTCTTCATTT	TATTTTACCG
Mourella_caerulea_2	ACCTTATATT	GGAAAAATAA	TTGTTGAATG	AGTATGAGGT	GGATTTTCAA	TTAATAATTC	AACTTTAAAT	CGATTTTTTT	CTCTTCATTT	TATTTTACCA

	805	815	825	835	845	855	865	875	885	895
H1	TTAATTATTA	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAGTTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATGCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTAGTT
H2	TTAATTATTA	TAATAATAGT	ATTTTTCACAC	ATTATAGTTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATGCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTAGTT
H3	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATCATAATTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAAAAT	AGATATTTAT	AAAATTGGTT
H4	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAATTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATCGGTT
H5	TTAATTATTT	TAATGATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAATTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTGGTT
H6	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAATTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAGAAAT	AGATATTTAT	AAAATTGGTT
H7	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAGTTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATGCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTAATT
H8	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAATTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAGAAAT	AGATATTTAT	AAAATTGGTT
H9	TTAATTATTT	TAATATTGGT	ATTTTTCACAC	ATTATAGTTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTAGTT
H10	TTAATTATTT	TAATAATGGT	ATTTTTCACAT	ATTATAGTTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATGCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTAGTT
H11	TTAGTTATTA	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAGTTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATGCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTAGTT
H12	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAATTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAGAAAT	AGATATTTAT	AAAATTGGTT
H13	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAATTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAAAAAT	AGATATTTAT	AAAATTGGTT
H14	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAGTTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATGCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTAGTT
H15	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAATTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTGGTT
H16	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAATTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAGAAAT	AGATATTTAT	AAAATTGGTT
H17	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAATTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAGAAAT	AGATATTTAT	AAAATTGGTT
H18	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAATTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTAATT
H19	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAATTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAGAAAT	AGATATTTAT	AAAATTGGTT
H20	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAC	ATTATAGTTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATGCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTAGTT
H21	TTAATTATTT	TAATATTGGT	ATTTTTCACAT	ATTATAGTTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTGGTT
H22	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAATTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAGGAT	AGATATTTAT	AAAATTGGTT
H23	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAGTTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATGCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTAGTT
H24	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAATTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTAGTT
H25	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAGTTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTGGTT
H26	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAATTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAGAAAT	AGATATTTAT	AAAATTGGTT
H27	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAATTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAGAAAT	AGATATTTAT	AAAATTGGTT
H28	TTAATTATTT	TAATATTGGT	ATTTTTCACAT	ATCATAATTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATTCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTGGTT
H29	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAGTTT	TACATGTAAC	TGGATCAAGA	AATCCTATTC	ATGCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTAGTT
S. sp.nov_1	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAGTTT	TACATATTAC	TGGATCAAGA	AATCCAATTC	ATTCAAAAAAT	TGATATTTAT	AAAATTGTTT
S. sp.nov_2	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAGTTT	TACATATTAC	TGGATCAAGA	AATCCAATTC	ATTCAAAAAAT	TGATATTTAT	AAAATTGTTT
S. mourei_1	TTAATTATTT	TAATAATAGT	ATTTTTCACAT	ATTATAGTTT	TACATATTAC	TGGATCAAGA	AATCCAATTC	ATTCAAAAAAT	TGATATTTAT	AAAATTGTTT
S. mourei_2	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????
Mourella_caerulea_1	TTAATTATTT	TAATAATAGC	ATTTATACAT	ATTATAGTTT	TACATATTAC	TGGATCAAGA	AATCCAATTC	ATGCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTGTTT
Mourella_caerulea_2	TTAATTATTT	TAATAATAGC	ATTTATACAT	ATTATAGTTT	TACATATTAC	TGGATCAAGA	AATCCAATTC	ATGCAAGAAA	TGATATTTAT	AAAATTGTTT

	905	915	925	935	945	955	965	975	985	995
H1	TTTATCCATA	TTTTTTTATT	AAAGACTTAA	TTACTATTAT	AATAATTTTA	TTGATTTTTTA	TATTTATTAA	TTTACAATAT	CCTTATATAT	TAGGAGATCC
H2	TTTATCCATA	TTTTTTTATT	AAAGATTCAA	TTACTATTAT	AATAATTTTA	TTGATTTTTTA	TATTTATTAA	TTTACAATAT	CCTTATATAT	TAGGAGACCC

H15	TGATAATTTT	AAAATAGCTA	ATCCAATAAT	TACTCCATCA	CATATTAAAC	CAGAATGATA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A
H16	GGATAATTTT	AAAATAGCTA	ATCCAATAGT	TACTCCTTCA	CATATTAAAC	CAGAATGATA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A
H17	TGATAATTTT	AAGATAGCTA	ATCCAATAAT	TACTCCTTCA	CATATTAAAC	CAGAATGATA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A
H18	TGATAATTTT	AAAATAGCTA	ATCCAATAAT	TACTCCTTCA	CGTATTAAAC	CAGAATGATA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A
H19	TGATAATTTT	AAAATAGCTA	ATCCAATAGT	TACTCCTTCA	CATATTAAAC	CAGAATGATA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A
H20	TGATAATTTT	AAAATAGCTA	ATCCAATAGT	TACTCCTTCA	CATATTAAAC	CAGAATGATA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A
H21	TGATAATTTT	AAAATAGCTA	ATCCAATAAT	TACTCCTTCA	CATATTAAAC	CAGAATGATA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTCTACGTTT	A
H22	TGATAATTTT	AAGATAGCTA	ATCCAATAAT	TACTCCTTCA	CATATTAAAC	CAGAATGATA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A
H23	TGATAATTTT	AAAATAGCTA	ATCCAATAGT	TACTCCTTCG	CATATTAAAC	CAGAATGATA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A
H24	TGATAATTTT	AAAATAGCTA	ATCCAATAAT	TACTCCTTCA	CATATTAAAC	CAGAATGATA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A
H25	TGATAATTTT	AAAATAGCTA	ATCCAATAAT	TACTCCTTCA	CATATTAAAC	CAGAATGATA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A
H26	TGATAATTTT	AAAATAGCTA	ATCCAATAAT	TACTCCTTCA	CATATTAAAC	CAGAATGATA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A
H27	TGATAATTTT	AAGATAGCTA	ATCCAATAAT	TACTCCTTCA	CATATTAAAC	CAGAATGGTA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A
H28	TGATAATTTT	AAAATAGCTA	ATCCAATAAT	TACTCCTTCA	CATATTAAAC	CAGAATGATA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A
H29	TGATAATTTT	AAAATAGCTA	ATCCAATAGT	TACTCCTTCA	CATATCAAAC	CAGAATGATA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A
S. sp.nov_1	TGATAATTTT	AAAATAGCTA	ATCCAATAAT	CACTCCTTCA	CATATTAAAC	CAGAATGATA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A
S. sp.nov_2	TGATAATTTT	AAAATAGCTA	ATCCAATAAT	CACTCCTTCA	CATATTAAAC	CAGAATGATA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A
S. mourei_1	AGATAATTTT	AAAATGGCTA	ATCCAATAGT	TACTCCATCT	CATATTAAAC	CAGAATGATA	TTTTCTTTTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A
S. mourei_2	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	?
Mourella_caerulea_1	AGATAATTTT	AAAATAGCTA	ATCCAATAGT	AACTCCTTCA	CATATTAAAC	CAGAATGATA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A
Mourella_caerulea_2	TGATAATTTT	AAAATAGCTA	ATCCAATAGT	AACTCCTTCA	CATATTAAAC	CAGAATGATA	TTTTTTATTT	GCTTATTCAA	TTTTACGTTT	A

Anexo B. Matriz de distâncias nucleotídicas, utilizando a correção Kimura 2-parâmetros, entre pares de sequências do conjunto de dados concatenados. Em destaque cinza, as divergências entre os haplótipos de *S. quadripunctata*.

sp_1 e 2: *S. sp.nov.*; mou1: *S. mourei* (Porto Murтинho-MS); MII1 e MII2: *M. caerulea*.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	sn_1	sn_2	mo1	MI1	MI2			
H1																																					
H2	0,6																																				
H3	4,4	4,6																																			
H4	2,9	3,2	2,9																																		
H5	4,1	4,4	3,7	2,2																																	
H6	3,7	4,0	1,9	2,4	3,0																																
H7	1,2	1,7	4,4	3,2	4,4	3,6																															
H8	3,5	3,8	1,9	2,4	3,2	1,9	3,6																														
H9	2,9	3,0	4,1	2,7	3,4	3,4	3,2	3,0																													
H10	1,0	1,5	4,8	3,4	4,4	4,0	1,8	3,8	3,1																												
H11	1,3	2,0	4,5	3,4	4,2	4,0	1,8	3,8	3,2	2,1																											
H12	3,8	4,3	2,0	3,1	4,1	1,8	3,5	2,0	4,1	4,5	4,1																										
H13	4,1	4,4	0,4	2,6	3,4	1,5	4,0	1,9	3,8	4,6	4,2	1,8																									
H14	0,9	1,6	4,8	3,3	4,5	3,9	2,0	3,9	3,1	1,8	2,1	4,2	4,5																								
H15	3,9	4,2	3,7	2,2	2,0	3,1	4,0	3,3	3,5	4,4	4,2	3,8	3,4	4,3																							
H16	3,5	3,8	1,9	2,4	3,4	1,5	3,4	1,5	3,6	4,0	4,0	1,0	1,7	3,9	3,1																						
H17	4,3	4,5	2,6	3,0	3,6	2,1	4,2	1,5	4,2	4,5	4,5	2,3	2,4	4,6	3,5	2,1																					
H18	2,3	2,8	4,7	3,4	4,4	4,3	2,8	3,7	3,4	2,9	2,9	4,6	4,4	2,9	4,4	4,3	4,7																				
H19	3,9	4,0	2,2	2,8	3,6	1,9	3,8	1,7	3,8	4,2	4,4	1,3	2,0	4,3	3,7	0,9	2,4	4,5																			
H20	0,6	0,4	4,6	3,1	4,3	3,9	1,6	3,7	2,9	1,4	1,9	4,2	4,3	1,5	3,9	3,5	4,4	2,7	4,1																		
H21	2,9	3,2	3,9	2,5	3,4	3,0	3,0	3,0	0,9	3,0	3,2	3,7	3,6	3,5	3,3	3,4	4,0	3,6	3,6	3,1																	
H22	3,5	3,8	2,1	2,4	3,2	1,3	3,8	1,7	3,6	3,8	4,2	2,0	1,7	3,9	3,3	1,5	1,9	4,1	1,9	3,7	3,4																
H23	1,0	1,4	4,7	3,2	4,2	4,0	1,7	3,8	3,2	1,7	1,6	4,1	4,4	1,4	3,8	3,6	4,4	2,8	4,2	1,0	3,2	3,8															
H24	1,6	2,1	4,2	2,4	3,8	3,6	2,1	3,2	2,8	2,1	2,3	3,7	3,9	2,3	3,4	3,6	4,0	1,4	3,8	2,0	2,8	3,6	2,2														
H25	3,1	3,4	3,0	1,2	2,3	2,7	3,2	2,5	2,7	3,6	3,4	3,2	2,7	3,5	2,2	2,7	3,1	3,6	3,1	3,3	2,7	2,7	3,4	2,8													
H26	3,4	3,7	2,0	2,1	3,1	1,8	3,5	0,3	3,1	3,7	3,9	1,9	2,0	3,8	3,2	1,4	1,4	3,6	1,6	3,6	2,9	1,6	3,7	2,9	2,4												
H27	3,6	3,9	1,8	2,3	3,1	1,2	3,7	1,4	3,3	3,9	4,1	1,7	1,4	4,0	2,8	1,0	2,0	4,0	1,4	3,6	3,1	1,2	3,7	3,3	2,6	1,3											
H28	3,5	3,8	4,3	3,3	4,0	3,8	3,4	3,6	1,1	3,7	3,6	4,3	4,2	4,1	3,9	4,2	4,5	4,0	4,4	3,7	1,1	4,2	3,8	3,2	3,1	3,7	3,9										
H29	1,3	1,7	5,0	3,6	4,6	4,2	2,2	4,2	3,6	1,6	2,2	4,5	4,7	1,9	4,6	4,2	4,5	3,0	4,5	1,5	3,6	4,0	1,6	2,2	3,8	4,1	4,3	4,2									
sn_1	4,7	5,0	5,0	4,0	4,7	4,6	4,7	4,4	4,1	5,0	4,8	5,0	4,7	4,9	4,7	4,8	5,1	4,8	5,0	4,9	3,9	4,8	4,7	4,3	4,2	4,1	4,4	4,5	5,2								
sn_2	4,7	5,0	5,0	4,0	4,7	4,6	4,7	4,4	4,1	5,0	4,8	5,0	4,7	4,9	4,7	4,8	5,1	4,8	5,0	4,9	3,9	4,8	4,7	4,3	4,2	4,1	4,4	4,5	5,2	0,0							
mo1	5,6	5,9	6,4	5,4	5,6	6,0	5,7	5,6	5,8	5,9	6,0	6,0	6,1	6,0	5,8	5,7	6,4	6,3	5,8	6,0	5,8	5,9	5,6	5,7	5,6	5,3	5,6	6,2	6,4	5,5	5,5						
MI1	7,2	7,5	8,0	6,9	7,2	7,7	7,4	7,3	7,3	7,4	7,2	8,0	7,7	7,1	7,2	7,5	8,1	7,5	7,7	7,4	7,2	7,6	7,3	7,3	6,8	7,1	7,2	7,9	7,7	6,3	6,3	8,1					
MI2	6,3	6,6	7,1	5,9	6,2	6,8	6,5	6,3	6,3	6,6	6,4	7,1	6,8	6,4	6,2	6,6	7,1	6,7	6,7	6,5	6,3	6,8	6,4	6,3	6,0	6,1	6,2	6,8	6,9	5,2	5,2	7,4	2,1				

Anexo C. Filograma resultante da análise de máxima verossimilhança de 45 terminais e 433 caracteres, provenientes do gene *CitB*.

