

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E**  
**BIOLOGIA MOLECULAR**



**FILOGENIA MOLECULAR DAS ABELHAS INDÍGENAS**  
**SEM-FERRÃO (HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINI)**

**CARLOS EDUARDO SAMPAIO GUEDES**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Março de 2007**

**CARLOS EDUARDO SAMPAIO GUEDES**

**FILOGENIA MOLECULAR DAS ABELHAS INDÍGENAS SEM-FERRÃO  
(HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINI)**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Santa Cruz,  
como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em  
Genética e Biologia Molecular.**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Março de 2007**

CARLOS EDUARDO SAMPAIO GUEDES

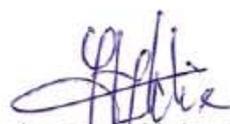
FILOGENIA MOLECULAR DAS ABELHAS INDÍGENAS SEM-FERRÃO  
(HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINI)

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Santa Cruz,  
como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em  
Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 9 de março de 2007



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



Prof. Dr. Jacques Hubert Charles Delabie  
(CEPLAC)



Prof. Dr.ª Janisete Gomes da Silva Miller  
(UESC)



Prof. Dr. Marco Antônio Costa  
(UESC – Orientador)

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais José e lara, que me ensinaram a  
buscar sempre o melhor e são responsáveis  
por tudo o que consegui e o que sou hoje.  
À Zafira, que mesmo à distancia  
esteve o tempo todo ao meu lado

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa.

Ao Dr. Marco Antônio Costa, pela orientação, amizade, confiança, atenção e paciência.

Ao Dr. Dr. Gabriel Augusto Rodrigues de Melo pelo fornecimento de algumas das espécies incluídas no presente trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Dr<sup>a</sup>. Janisete Gomes da Silva Miller, Dr. Jacques Hubert Charles Delabie e ao Dr. Gabriel Augusto Rodrigues de Melo por terem aceitado o convite para integrar à mesma.

À Dr<sup>a</sup>. Luciana Veiga Barbosa por haver intermediado o meu contato com Marco e pela amizade e confiança.

Ao amigo Róbson Dias, pela disposição em ajudar a solucionar os problemas relativos ao seqüenciamento e por sempre encontrar uma vaga para colocar as minhas placas, e também por proporcionar bons momentos de descontração, mesmo quando os resultados não iam bem.

Aos meus pais, Iara e José, pelo amor, carinho, incentivo, confiança e pelos sacrifícios que me fizeram chegar até aqui, são eles os principais responsáveis pela pessoa que sou e por todos os valores que prezo e esta conquista é tão deles quanto minha.

À Zafira, pelo amor, carinho, incentivo, pela cumplicidade e confiança e por ter estado sempre perto, mesmo de longe. Agradeço pelo simples fato de você existir na minha vida.

Ao meu irmão Junior, pela amizade, confiança, pelos momentos de descontração e pelo seu caráter.

Ao meu tio Nilson Soares e sua esposa Marlene pela acolhida no início do mestrado, agradeço pela dedicação, pelo carinho e pela amizade.

Aos meus primos Marílson e Paulo e suas respectivas esposas, pela amizade, confiança e pelo carinho.

Ao amigo Fabrício Juchum, por ter se mostrado sempre solícito e por ter me ajudado no início dos trabalhos, também pela amizade e pelos momentos de descontração.

Ao amigo Cristiano Villela, pela convivência harmônica, pela confiança e por me fazer dar boas gargalhadas com as suas lamúrias quase diárias.

À Heliana e Stênio Carvalho, pela amizade, confiança e por serem sempre solícitos.

Aos amigos Braz, Wagner, Tharcilla, Marcelo, Cinthia, Olívia, Jeiza, Claudine, Sizenando, Vanderly, Lídia, Polliana, Maíza, Lana, Graziella, Toni “bee hunter”, Samuel, Daniela, Tiago e Rafael pelos momentos de descontração e de auxílio nos trabalhos.

Ao Gilberto e à Cândida, pela amizade, pela confiança e pela grande ajuda na fase final do trabalho.

À Luciana Calazans pela amizade e por ser sempre solícita.

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional nestes dois anos.

## EPÍGRAFE

“Nada, na biologia, faz sentido exceto à luz da evolução”

Theodosius Dobzhansky

## ÍNDICE

EXTRATO .....	X
ABSTRACT .....	Xii
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	03
2.1. A Tribo Meliponini .....	03
2.1.1. Classificação .....	06
2.1.2. Evolução.....	07
2.1.3. Biogeografia .....	10
2.1.4. Filogenia.....	11
2.2. DNA mitocondrial.....	13
2.2.1. DNAr 16S .....	16
2.2.2. Citocromo b.....	18
3. METODOLOGIA.....	20
3.1. Material biológico.....	21
3.2. Extração de DNA.....	24
3.3. Seleção dos genes .....	26
3.4. Reação de Amplificação .....	27
3.5. Reação de purificação .....	29
3.6. Seqüenciamento.....	30
3.6.1. Reação de Seqüenciamento .....	30
3.6.2. Precipitação.....	30
3.6.3. Obtenção das seqüências.....	31
3.7. Análise das seqüências de DNA .....	32
3.8. Análise filogenética.....	32

3.8.1. Alinhamento dos fragmentos gênicos .....	32
3.8.2. Análise de máxima parcimônia.....	33
3.8.2.1. DNAr 16S .....	33
3.8.2.2. Citocromo b .....	34
3.8.2.3. Análise combinada .....	34
4. RESULTADOS .....	35
4.1. Amplificações por PCR.....	35
4.2. Seqüenciamento e alinhamento .....	37
4.2.1. DNAr 16S .....	37
4.2.2. Citocromo b .....	38
4.2.3. DNAr 16S e Citocromo b .....	41
4.3. Análise filogenética .....	41
4.3.1. Análise de Máxima Parcimônia com o DNAr 16S .....	41
4.3.2. Análise de Máxima Parcimônia com o citocromo b .....	48
4.3.3. Análise combinada .....	51
5. DISCUSSÃO .....	53
5.1. Análise das seqüências de DNA.....	53
5.1.1. Alinhamento do DNAr 16S .....	53
5.1.2. Alinhamento do Citocromo b .....	56
5.2. Análises Filogenéticas .....	59
5.2.1. Filogenia com base na seqüência parcial do 16S .....	59
5.2.1.1. Matriz 16SA.....	59
5.2.1.2. Matriz 16SB.....	63
5.2.2. Filogenia com base na seqüência parcial do citocromo b .....	67
5.2.3. Análise combinada DNAr 16S + citocromo b.....	71
6. CONCLUSÕES .....	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78
APÊNDICE .....	85

## EXTRATO

GUEDES, Carlos Eduardo Sampaio, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, março de 2007. **Filogenia molecular das abelhas indígenas sem-ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)**

Orientador: Dr. Marco Antônio Costa    Co-orientador: Dr<sup>a</sup>. Janisete G. da S. Miller

A tribo Meliponini (Hymenoptera: Apidae) reúne as abelhas indígenas sem ferrão. Estas abelhas são eussociais e apresentam-se distribuídas em todas as regiões tropicais do planeta. Cerca de 500 espécies são conhecidas para este grupo, que apresenta 57 gêneros. A maior diversidade do grupo é encontrada na região Neotropical, onde são importantes polinizadores de espécies nativas e cultivadas. A classificação do grupo é incerta, em parte pela dificuldade no levantamento de caracteres morfológicos bem definidos. Além disso, a carência de estudos sobre a diversidade do grupo tem contribuído para esta situação. Em consequência disso, a história biogeográfica deste grupo permanece indefinida. As poucas propostas filogenéticas morfológicas realizadas para Meliponini mostraram-se discordantes, principalmente por não haver consenso quanto à polarização dos caracteres. Dessa forma, o uso de dados de DNA para a inferência filogenética torna-se uma ferramenta fundamental para o esclarecimento de relações não-resolvidas. Propostas filogenéticas baseadas em dados moleculares já foram realizadas, todavia foram insuficientes na resolução das relações dos táxons neotropicais. Por isso, no presente trabalho buscou-se o desenvolvimento de uma análise filogenética da tribo Meliponini com a avaliação de novas regiões gênicas informativas e aumento da amostragem de táxons

neotropicais. Para isso foram selecionadas duas regiões do genoma mitocondrial, o DNAr 16S e o citocromo b. As seqüências foram obtidas através de seqüenciamento direto de produtos de PCR. As análises de máxima parcimônia foram realizadas no programa Winclada 1.00.08 utilizando busca heurística, o suporte dos ramos foi testado através de análises de *bootstrap* e *jackknife*. Os resultados aqui obtidos confirmam o monifiletismo dos Meliponini neotropicais e refutam disjunções intercontinentais corroboradas por estudos morfológicos como *Trigona sensu* Michener e das abelhas diminutas neotropicais semelhantes à *Hypotrigona*, que constituem um grupo monofilético. Diversos agrupamentos genéricos com suporte morfológico puderam ser recuperados nas diferentes análises com as duas regiões gênicas utilizadas aqui, como ocorreu com *Schwarziana* e *Mourella*, *Lestrimelitta* e *Plebeia*; *Leurotrigona*, *Trigonisca* e *Celetrigona*, demonstrando que os dados moleculares utilizados apresentaram informação filogenética para a recuperação das relações dos principais grupos dentro de Meliponini. Apesar do pequeno número de espécies de *Melipona* aqui utilizadas, a análise do citocromo b sugere o polifiletismo do subgênero *Eomelipona*, levantando a questão sobre a validade de determinados grupos propostos com base em dados morfológicos. A análise combinada dos genes permitiu um aumento da resolução da árvore filogenética e do suporte de parte dos ramos, recuperando grupos bem determinados pela morfologia como *Schwarzula* e *Scaura*, e a relação destes com *Plebeia*. As espécies *Scaura atlantica* e *Scaura latitarsis* constituíram um grupo monofilético como proposto por estudos morfológicos. A avaliação independente do citocromo b demonstrou que esta região não é adequada para resolver os agrupamentos mais basais, sendo mais indicado para estudos filogenéticos em nível intragenérico, ou intergenérico quando os gêneros envolvidos forem proximamente relacionados. Os resultados aqui obtidos não corroboram as propostas biogeográficas vigentes, nem a classificação adotada por alguns taxonomistas. Investigações mais aprofundadas sobre as relações recuperadas na presente análise se fazem necessárias principalmente no que se refere a estudos moleculares intragenéricos, muito escassos para os Meliponini.

Palavra-chave: 16S, citocromo b, parcimônia, Meliponina.

## ABSTRACT

GUEDES, Carlos Eduardo Sampaio, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, março de 2007. **Molecular phylogeny of indigenous stingless bees (Hymenoptera:Apidae:Meliponini)**

Advisor: Marco Antônio Costa Advisor Committee Members: Dr<sup>a</sup>. Janisete G. da S. Miller

The tribe Meliponini (Hymenoptera: Apidae) congregates the stingless bees, a group of eusocial bees that is distributed throughout the tropical regions of the world. The group comprises about 500 species encompassing 57 genera. The highest diversity is found in the neotropical region, where they are important pollinators of native and cultivated species. The classification of the group is uncertain, in part due to the lack of analysis using well-defined morphological characters. Moreover the lack of studies on the diversity of the group has contributed for this situation. Consequently, the biogeography of the group remains unresolved. The few previous morphological phylogenetic proposals for the Meliponini, present conflicting results, mainly due to the lack of consensus on the character's polarization. The use of molecular phylogenetic inference has become a basic tool for the clarification of unresolved relationships. Molecular phylogenetic analyses had been previously carried out in Meliponini , however they had been insufficient in the resolution of the neotropical relationships among the genera included. Therefore, in the present work we carried out a phylogenetic analysis of the tribe Meliponini with the evaluation of new informative genome regions and increase of the neotropical species sampling. Two regions of the mitochondrial genome were selected, the DNAr 16S and cytochrome b gene. The

sequences were obtained through direct sequencing of PCR products. The analysis of maximum parsimony was carried out using the program Winclada 1.00.08 using the heuristic search option. Branch supports were tested through the calculation of bootstrap and jackknife values. The results obtained confirm the monophyly of the neotropical Meliponini and refute intercontinental disjunctions supported by previous morphological studies *e.g.* *Trigona sensu* Michener and the minute neotropical *Hypotrigona*-like bees, that constitute a monophyletic group. Several groups with morphological support have been recovered in the present molecular phylogenetic analyses using both mitochondrial regions, as, for example, *Schwarziana* and *Mourella*, *Lestrimelitta* and *Plebeia*; *Leurotrigona*, *Trigonisca* and *Celetrigona*, demonstrating that the selected molecular data were phylogenetically informative to recover the relationships among representative groups of the neotropical Meliponini. Although a small number of species of *Melipona* was included, the analysis with cytochrome b suggest that the subgenus *Eomelipona* is polyphyletic, raising questions on the validity of some groupings based on morphological data. The combined analysis of the two genes increased the resolution of the cladogram and the support of part of the branches, recovering groups well supported by the morphology *e.g.* *Schwarzula* and *Scaura*, and their relationship with *Plebeia*. The species *Scaura latitarsis* and *Scaura atlantica* constituted a monophyletic group in agreement with recent morphologic studies. The independent evaluation of cytochrome b demonstrated that this region is not appropriated to recover the most basal groups of Meliponini, being more indicated for phylogenetic studies at intrageneric level, or among close related genera. The present results do not corroborate either the previous biogeographic proposals, or the classification adopted by some researchers. More detailed studies will be necessary, specially to resolve the poorly understood intrageneric relationships within the Meliponini.

Key Words: DNAr 16S , cytochrome b, Maximum parsimony, Meliponina.

## 1. INTRODUÇÃO

A tribo Meliponini (Hymenoptera: Apidae) reúne as abelhas indígenas sem ferrão. Estas abelhas são eussociais e apresentam-se distribuídas em todas as regiões tropicais do planeta, sendo encontradas na América, África, Sudeste da Ásia, e Oceania. Existem cerca de 500 espécies conhecidas, distribuídas em 57 gêneros, das quais cerca de 75% ocorrem na região Neotropical. As abelhas desta tribo apresentam grande diversidade de formas, hábitos de nidificação e comportamento, estando entre os principais polinizadores nos ecossistemas tropicais do mundo. Além de terem importante papel ecológico, estas abelhas também apresentam importância econômica, pois são polinizadoras de plantas cultivadas e algumas espécies têm o seu mel e cera explorados pelas populações humanas.

A classificação do grupo tem sido controversa entre os taxonomistas, principalmente pela dificuldade em levantar caracteres morfológicos bem definidos que sirvam de sinapomorfias para a inferência das relações entre os gêneros, bem como a polarização dos mesmos em estudos filogenéticos. Outro fator que tem contribuído para isso é a ausência de estudos que visem avaliar a diversidade destas abelhas nas diferentes regiões do globo, tendo alguns gêneros sido revisados pela última vez por Schwarz ainda na década de 40 (Silveira et al., 2002).

Em consequência da classificação controversa e da incerteza quanto às relações filogenéticas de Meliponini, a história biogeográfica do grupo permanece indefinida. Grandes disjunções intercontinentais são encontradas entre gêneros como *Trigona sensu* Michener (Michener 1990, 2000) e grupos considerados monofiléticos como *Plebeia* (neotropical) + *Austroplebeia* (australiano) (Camargo e Pedro, 1992a) e *Hypotrigona* (africano) + *Leurotrigona*, *Celetrigona*, *Trigonisca* e

*Dolichotrigona* (neotropicais) (Michener, 1990). Este padrão não é encontrado em nenhum outro grupo de abelhas, o que lança suspeitas sobre a veracidade destes agrupamentos, principalmente para abelhas com pequena capacidade de dispersão como as da tribo Meliponini.

Poucas propostas filogenéticas foram realizadas para Meliponini. Michener (1990) propôs a primeira filogenia baseada em análise cladística para este grupo, todavia Camargo e Pedro (1992a, b) questionaram a polarização e a validade de alguns caracteres utilizados e propuseram uma filogenia alternativa, com muitos pontos discordantes em relação à de Michener (1990).

Diante desta situação, o uso de dados de DNA para a inferência filogenética torna-se uma ferramenta fundamental para o esclarecimento de relações não-resolvidas pelos caracteres morfológicos. A utilização de seqüências de DNA específicas tem sido feita com sucesso na reconstrução de filogenias de diversos grupos taxonômicos, no entanto, as poucas análises feitas com as abelhas sem ferrão foram insuficientes na quantidade e qualidade dos dados utilizados deixando uma série de indefinições e pontos de dúvida (Costa et al., 2003). Recentemente Rasmussen e Cameron (2007) realizaram uma proposta baseada em quatro regiões gênicas, porém o pequeno número de táxons neotropicais utilizados não permitiu uma inferência mais detalhada das relações entre os gêneros deste grupo, o mais diverso entre os Meliponini.

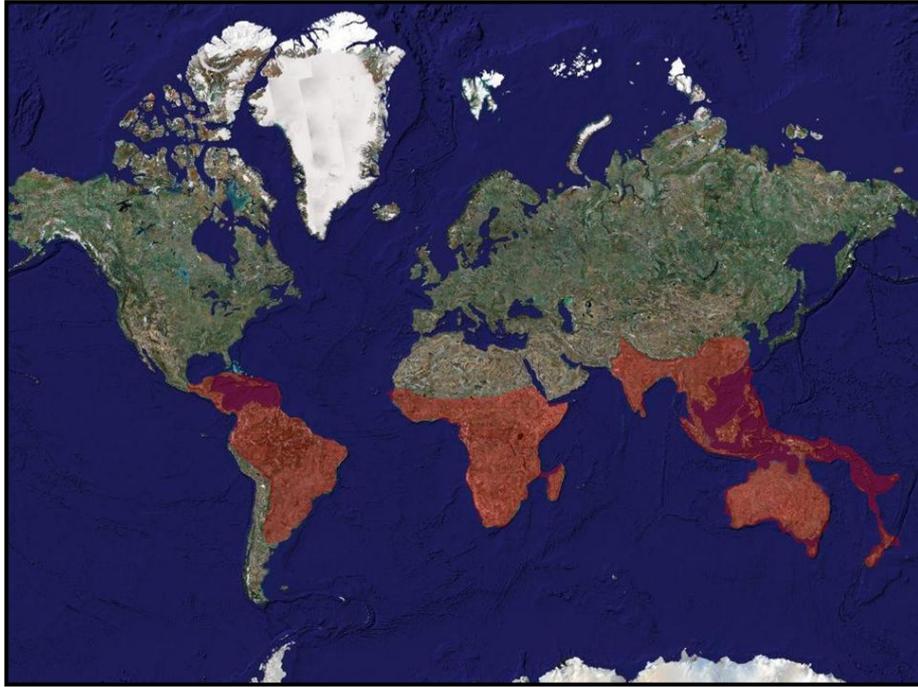
Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma análise filogenética da tribo Meliponini com a avaliação de novas regiões gênicas informativas e aumento da amostragem de táxons neotropicais.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. A Tribo Meliponini

A tribo Meliponini é uma das quatro tribos de abelhas corbiculadas da subfamília Apinae (Roig-Alsina e Michener, 1993; Michener 2000). Esta tribo é composta por abelhas que apresentam distribuição pantropical (Figura 1) com aproximadamente 500 espécies conhecidas distribuídas em 57 gêneros (Tabela 2), com maior diversidade na região Neotropical, onde ocorrem cerca de 75% das espécies conhecidas (Costa et al., 2003; Camargo e Roubik, 2005). Apesar desta estimativa, Michener (2000) afirma que atualmente é impossível se conhecer o número real de espécies diante da grande quantidade de espécies crípticas e da ausência de análise detalhada da maioria dos gêneros.

As abelhas da tribo Meliponini, assim como as de Apini, são eussociais (Koulianos, 1999; Michener, 2000; Cameron e Mardulyn, 2001), ou seja, apresentam divisão de castas entre as fêmeas: as operárias, que coletam e processam o alimento, cuidam das larvas, constroem os ninhos e defendem as colônias; e a rainha que tem a função reprodutiva (Weinstock et al., 2006). As colônias destas abelhas são perenes e podem conter de algumas dezenas a mais de 100.000 indivíduos. Os seus ninhos podem ser construídos em cavidades preexistentes como ocos de árvores, frestas em paredes ou paredões rochosos; em cupinzeiros ou formigueiros e no solo, em cavidades preexistentes ou escavadas pelas próprias abelhas. Entretanto algumas espécies constroem seus ninhos expostos sobre paredões rochosos, galhos de árvores ou em paredes de construções humanas (Michener, 2000).



**Figura 1.** Distribuição geográfica da tribo Meliponini. As áreas vermelhas do mapa representam as regiões de ocorrência das espécies de Meliponini.

Fonte: <http://maps.google.com/>

Os Meliponini desempenham um relevante papel ecológico, pois constituem um dos mais importantes grupos de polinizadores de plantas nativas e cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Heard, 1999). Estudos demonstram que os integrantes desta tribo são os principais polinizadores de espécies nativas na América tropical (Dick, 2001), nas florestas tropicais e subtropicais da África (Eardley, 2004), Ásia e Oceania (Heard, 1999). Além do papel ecológico estas abelhas apresentam importância econômica, pois são polinizadores de muitas espécies cultivadas, como o café (*Coffea arabica*) (Ricketts, 2004), o côco (*Cocos nucifera*), a manga (*Mangifera indica*), o urucum (*Bixa orellana*), o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), a macadâmia (*Macadamia integrifolia*) (Heard, 1999), o tomate (*Lycopersicon esculentum*), o pimentão (*Capsicum annuum*), o pepino (*Cucumis sativus*), além de uma série de outras espécies (Slaa et al., 2006). Para este fim, algumas espécies de abelhas têm sido manejadas e mantidas em criações (Meliponários), sendo explorados, além do seu potencial como polinizadores, o mel e a cera por elas produzidos (Cortopassi-Laurino et al., 2006).

**Tabela 1.** Lista dos gêneros de Meliponini de acordo com a classificação de Moure (1951,1961) adicionados de dois novos gêneros *Meliwillea* (Roubik et al, 1997) e *Paratrigonoides* (Camargo e Roubik, 2005). Os nomes dos gêneros são seguidos de seus respectivos autores.

<b>Gênero</b>	<b>Distribuição</b>
<i>Aparatrigona</i> Moure	Neotropical
<i>Apotrigona</i> Moure	Africano
<i>Austroplebeia</i> Moure	Australiano
<i>Axestotrigona</i> Moure	Africano
<i>Camargoia</i> Moure	Neotropical
<i>Celetrigona</i> Moure	Neotropical
<i>Cephalotrigona</i> Schwarz	Neotropical
<i>Cleptotrigona</i> Moure	Africano
<i>Dactilurya</i> Cockerell	Africano
<i>Dolichotrigona</i> Moure	Neotropical
<i>Duckeola</i> Moure	Neotropical
<i>Friesella</i> Moure	Neotropical
<i>Frieseomelitta</i> Ihering	Neotropical
<i>Geniotrigona</i> Moure	Indo-Malaio
<i>Geotrigona</i> Moure	Neotropical
<i>Heterotrigona</i> Schwarz	Indo-Malaio
<i>Homotrigona</i> Moure	Indo-Malaio
<i>Hypotrigona</i> Cockerell	Africano
<i>Lepidotrigona</i> Schwarz	Indo-Malaio
<i>Lestrimelitta</i> Friese	Neotropical
<i>Leurotrigona</i> Moure	Neotropical
<i>Liotrigona</i> Moure	Africano
<i>Lisotrigona</i> Moure	Indo-Malaio
<i>Lophotrigona</i> Moure	Indo-Malaio
<i>Meliplebeia</i> Moure	Africano
<i>Melipona</i> Illger	Neotropical
<i>Meliponula</i> Cockerell	Africano
<i>Meliwillea</i> Roubik, Segura e Camargo	Neotropical
<i>Mourella</i> Schwarz	Neotropical
<i>Nannotrigona</i> Cockerell	Neotropical
<i>Nogueirapis</i> Moure	Neotropical
<i>Odontotrigona</i> Moure	Indo-Malaio
<i>Oxytrigona</i> Cockerell	Neotropical
<i>Papuatrigona</i> Michener e Sakagami	Papua-Nova Guiné
<i>Parapartamona</i> Schwarz	Neotropical
<i>Paratrigona</i> Schwarz	Neotropical
<i>Paratrigonoides</i> Camargo e Roubik	Neotropical
<i>Pariotrigona</i> Moure	Indo-Malaio
<i>Platytrigona</i> Moure	Indo-Malaio
<i>Partamona</i> Schwarz	Neotropical
<i>Plebeia</i> Schwarz	Neotropical
<i>Plebeiella</i> Moure	Africano
<i>Plebeina</i> Moure	Africano
<i>Ptilotrigona</i> Moure	Neotropical
<i>Scaura</i> Schwarz	Neotropical
<i>Scaptotrigona</i> Moure	Neotropical

<i>Schwarziana</i> Moure	Neotropical
<i>Schwarzula</i> Moure	Neotropical
<i>Sundatrigona</i> Inoue e Sakagami	Indo-Malaio
<i>Tetragona</i> Lepeletier e Serville	Neotropical
<i>Tetragonilla</i> Moure	Indo-Malaio
<i>Tetragonisca</i> Moure	Neotropical
<i>Tetragonula</i> Moure	Indo-Malaio/Australiano
<i>Trichotrigona</i> Camargo e Moure	Neotropical
<i>Tetrigona</i> Moure	Indo-Malaio
<i>Trigona</i> Jurine	Neotropical
<i>Trigonisca</i> Moure	Neotropical

Estas abelhas apresentam grande diversidade de formas e tamanhos, porém alguns caracteres morfológicos caracterizam os integrantes da tribo Meliponini, distinguindo-a das demais tribos de abelhas corbiculadas, são eles: (i) a presença de uma série de cerdas na margem apical externa da tíbia posterior da operária, denominada penicílio; (ii) a venação das asas reduzida e (iii) ferrão vestigial (Moure 1961; Michener, 1990, 2000).

### 2.1.1. Classificação

Os gêneros da tribo Meliponini têm sido classificados de diferentes maneiras nos últimos 60 anos (Costa, 1998; Costa et al., 2003). Em seu trabalho publicado na década de 1940, Michener (1944) agrupava os membros de Meliponini em dois gêneros, *Melipona* e *Trigona*. Ainda na década de 1940, Schwarz (1948) reuniu as abelhas cleptoparasitas no gênero *Lestrimelitta*, reconhecendo assim três gêneros. Moure (1951) elevou alguns subgêneros a gênero e agrupou as abelhas sem ferrão em três tribos distintas, Meliponini, contendo apenas o gênero *Melipona*; Lestrimelittini com o gênero *Lestrimelitta* e Trigonini contendo todos os demais gêneros, totalizando 12 gêneros e 19 subgêneros. Na década seguinte, Moure (1961) revisou a sua classificação e extinguiu a tribo Lestrimellitini, integrando o gênero *Lestrimelitta* à tribo Trigonini que juntamente com Meliponini constituía a subfamília Meliponinae, que passou a contar com 11 gêneros e 24 subgêneros neotropicais, 10 gêneros na região Etiópica e 13 gêneros na região Indo-Malaia e Australiana. Michener (1990) propôs a existência de 21 gêneros, sendo *Trigona* o maior deles, incluindo uma série de subgêneros presentes nas regiões Neotropical, Indo-Malaia e

Australiana. Camargo e Pedro (1992a, b) reconheceram 55 gêneros para a subfamília Meliponinae e Roubik et al. (1997) descreveram um novo gênero endêmico da América Central, *Meliwillea*. Por conseguinte Costa et al. (2003) reconheceram 56 gêneros na sua análise filogenética. Carmargo e Roubik (2005) descreveram o novo gênero presente na região oeste da Colômbia, *Paratrigonoides*, totalizando 57 gêneros descritos para a tribo Meliponini. Em contraste a essa classificação, Michener (2000) considerou a existência de apenas 23 gêneros mantendo o grande gênero *Trigona*, presente nas regiões Neotropical, Indo-Maláia e Australiana.

Como é perceptível ainda não há consenso quanto à classificação dos Meliponini, seja quanto à posição do táxon supragenérico que agrupa as abelhas corbiculadas sem ferrão, considerado por alguns autores como Subfamília Meliponinae (Moure 1951, 1961; Michener 1979, 1990; Camargo e Pedro, 1992 a, b), como Tribo Meliponini (Roig-Alsina e Michener, 1993; Michener 2000; Costa et al., 2003) ou como Subtribo Meliponina (Silveira et al., 2002); seja quanto ao número de gêneros e subgêneros e suas relações. Esta situação se deve em grande parte à ausência de caracteres morfológicos bem definidos que permitam o estabelecimento seguro das relações filogenéticas dentro do grupo e à ausência de estudos mais abrangentes, que reflitam a diversidade de abelhas sem ferrão existentes no mundo.

### 2.1.2. Evolução

O fóssil mais antigo de abelhas encontrado até o momento, data de aproximadamente 65 milhões de anos. Trata-se de um fóssil de um Meliponini típico, encontrado entre as décadas de 1920 e 1930 em um âmbar de New Jersey (Engel, 2000) descrita como *Trigona prisca* por Michener e Grimaldi (1988) e revisado por Engel (2000), que o transferiu para o novo gênero fóssil *Cretotrigona*. Segundo Roig-Alsina e Michener (1993) a tribo Meliponini constitui um dos grupos mais derivados de abelhas, por isso a descoberta deste fóssil faz recuar em alguns milhões de anos as estimativas referentes à origem e diversificação das abelhas (Engel, 2000; Engel, 2001).

Moure (1951,1961), na ausência de uma filogenia para o grupo, propôs três linhas filéticas: *Hypotrigona*, *Tetragona* - *Tetragonisca* e *Plebeia*.

*Hypotrigona sensu* Moure, integra o grupo dos menores Meliponini conhecidos, com cerca de 2,0 mm (Camargo e Pedro, 1992b). As abelhas que compõem essa linha possuem a área quirotriquiada, estrutura micropilosa presente na face interna da tíbia posterior das operárias, de 1,5 a 3,0 vezes mais larga que a margem lisa posterior (Camargo e Pedro, 1992a), incluem-se aqui *Celetrigona*, *Dolichotrigona*, *Leurotrigona* e *Trigonisca*, da região Neotropical; *Liotrigona* e *Hypotrigona* (s. str.), da região Etiópica; e *Lisotrigona* e *Pariotrigona* da região Indo-Malaia (Camargo e Pedro, 1992b). De acordo com Moure (1951), esta linha filética agrupa os Meliponini mais primitivos, porém ele levanta a possibilidade desta semelhança morfológica ser fruto de convergência, relacionada principalmente à redução do tamanho nestas abelhas. Com a interpretação dos caracteres utilizados na filogenia de Michener (1990), essas abelhas aparecem em clados relacionados, com exceção de *Lisotrigona*, relação que não se repete no trabalho de Camargo e Pedro (1992a).

A linha *Tetragona* - *Tetragonisca* (Moure, 1951, 1961) possui representantes em todas as regiões tropicais. Esta linha caracteriza-se por seus integrantes apresentarem a área quirotriquiada restrita à banda média longitudinal da tíbia, incluem-se neste grupo: *Camargoia*, *Cephalotrigona*, *Duckeola*, *Frieseomelitta*, *Geotrigona*, *Lestrimelitta*, *Oxytrigona*, *Ptilotrigona*, *Tetragona*, *Tetragonisca*, *Trichotrigona*, *Trigona* (s. str.), na região Neotropical; *Dactylurina* na região Etiópica; *Geniotrigona*, *Heterotrigona*, *Homotrigona*, *Lepidotrigona*, *Lophotrigona*, *Odontotrigona*, *Platytrigona*, *Papuatrigona*, *Tetragonilla*, *Tetragonula*, *Tetrigona*, *Trigonella* na região Indo-Malaia e *Tetragonula* na região Australiana (Camargo e Pedro, 1992b). De acordo com Michener (1990) todo esse grupo está contido no gênero *Trigona*, exceto os gêneros neotropicais *Cephalotrigona*, *Lestrimelitta*, *Oxytrigona*, *Trichotrigona* e o gênero Etiópico *Dactylurina*, que estaria relacionado a outro gênero Africano, *Plebeina*. Os resultados obtidos por Costa et al. (2003) e por Rasmussen e Cameron (2007) contrariam a existência desta linha filética, sendo a mesma polifilética.

A linha filética *Plebeia* (Moure, 1951) é, segundo Camargo e Pedro (1992b), pouco definida, sendo a relação entre os seus táxons incerta e questionável. Aqui são incluídos os gêneros que possuem uma área quirotriquiada alargada, com apenas uma pequena margem lisa posterior com depressão ou não, chegando à parte posterior da tíbia. Fazem parte deste grupo

os gêneros: *Friesella*, *Mourella*, *Plebeia* (s. str.) e *Schwarziana* na região Neotropical; *Meliplebeia*, *Plebeiella* e *Plebeina* na região Etiópica; e *Austroplebeia* na região Australiana (Moure, 1951). Além destes, Camargo e Pedro (1992b) consideram como gêneros associados à essa linha os neotropicais: *Melipona*, *Nogueirapis*, *Partamona*, *Parapartamona*, *Scaura*, *Schwarzula* e mais remotamente relacionados *Aparatrigona*, *Paratrigona*, *Scaptotrigona* e *Nannotrigona*. Da região Neotropical, *Friesella* e *Mourella* são gêneros monotípicos com distribuição restrita ao sul-sudeste do continente Sul Americano (Camargo e Wittmann, 1989; Costa, 1998), ao passo que *Plebeia* e *Schwarziana* aparecem como gêneros neotropicais politípicos, sendo o primeiro o mais diversificado, distribuindo-se do México à Argentina, com maior diversidade na região sul-sudeste do continente Sul Americano (Costa, 1998).

De acordo com Camargo e Wittmann, (1989), existe a possibilidade de que alguns dos gêneros inclusos em *Plebeia sensu* Moure tenha se dado por fruto de convergência, todavia descartam que as semelhanças entre *Plebeia* s. str. e *Austroplebeia* sejam fruto de convergência, afirmando que isso se deve à ocorrência de sinapomorfias ente os gêneros. Esta afirmação não tem suporte nos resultados obtidos por Michener (1990), que relacionam *Austroplebeia* aos táxons Africanos. Em contrapartida Camargo e Pedro (1992b) afirmam que *Austroplebeia* não apresenta sinapomorfias com os demais grupos, mas mesmo assim estaria mais proximamente relacionado às formas Neotropicais. Os resultados obtidos por Costa et al. (2003) colocam *Austroplebeia* como um grupo à parte dos demais Meliponini, corroborando em parte a afirmação de Camargo e Pedro (1992b). Em contrapartida, os resultados obtidos por Rasmussen e Cameron (2007) mostram o gênero indo-malaio *Lisotrigona* como grupo irmão de *Austroplebeia*, e o clado formado por ambos aparece relacionado com gêneros africanos, o que está mais de acordo com a proposta de Michener (1990).

### 2.1.3. Biogeografia

A biogeografia é uma ciência que busca entender a distribuição dos organismos sobre a Terra no passado e no presente, relacionando-a aos eventos geológicos e climáticos no decorrer da escala geológica (Brown e Lomolino, 1998; Futuyma, 1998).

A história biogeográfica dos Meliponini é controversa, com diferentes autores apresentando diferentes pontos de vista, se devendo isso, em grande parte, às relações filogenéticas ainda incertas entre os gêneros. Como citado anteriormente, os Meliponini têm ampla distribuição nas regiões tropicais do planeta e alguns dos grupos definidos pelos estudos morfológicos apresentam grandes disjunções intercontinentais em sua distribuição. Segundo Michener (1979) este padrão disjuncional não ocorre em nenhum outro grupo de abelhas.

Michener (1979) afirma que a melhor explicação para a atual distribuição de Meliponini seria a sua origem em Gondwana, antes do início da fragmentação do supercontinente do sul, pois os representantes deste grupo não apresentam uma grande capacidade de dispersão, nem a habilidade de cruzar oceanos. Camargo e Wittmann (1989) concordaram com esta hipótese e utilizaram-na para explicar a origem e distribuição da linha *Plebeia*. Camargo e Pedro (1992b) consideraram essa hipótese plausível e corroboraram-na propondo uma explicação para a disjunção dentro da linha *Tetragonisca* - *Tetragona*. Segundo estes autores, a presença de membros desta linha na região Neotropical, seu centro de dispersão, e na região Indo-Malaia e a sua ausência na região Etiópica, deve-se a uma via de dispersão através da região Holártica anterior à separação total entre a América do Norte e Eurásia, e anterior ao soergimento da cordilheira do Himalaia. Os fósseis dos Meliponini *Cretotrigona prisca* e *Kelneriapis eocenica*, do âmbar de New Jersey e do Mar Báltico respectivamente, seriam indícios desta rota de dispersão. Para explicar a via de migração dos membros da linha *Tetragonisca* - *Tetragona* à América do Norte, Camargo e Pedro (1992b) apoiaram-se na proposta da existência de uma comunicação entre a América do Sul e a América do Norte, anterior ao soergimento do istmo do Panamá, através do arco proto-caribenho que se estabeleceu no Cetáceo Superior ou no Terciário Inferior.

Diferindo de sua posição anterior, Michener (1990) defende que a origem dos Meliponini deu-se ao oeste de Laurásia, o que corresponde atualmente à América do Norte, de onde se dispersaram por toda a região Holártica, atingindo a América do Sul quando esta já se encontrava isolada da África. Ele sustenta esta hipótese baseado nos resultados obtidos em sua filogenia e no registro fóssil, que comprova a existência de uma ampla distribuição dos Meliponini na região Holártica, quando esta apresentava um clima mais quente. Todavia Camargo e Pedro (1992b) questionam a posição de Michener (1990) utilizando como argumento as relações entre *Plebeia*, neotropical, e *Austroplebeia*, australiana, e a ausência de formas relacionadas na região Indo-Malaia, o que envolve uma rota de migração através da Antártida. Isto só poderia ter ocorrido entre o Cretáceo Superior e o Terciário Inferior, quando havia conexões entre América do Sul, Antártida e Austrália, o que implica na presença da linha *Plebeia* anteriormente a este período. Além disso, Camargo e Wittmann (1989) apontam uma origem gondwânica para esta linha. Michener (2000) volta a defender a origem gondwânica de Meliponini, utilizando argumentação semelhante à de Camargo e Pedro (1992b). Porém, os resultados obtidos por Costa et al. (2003) e corroborados em grande parte por Rasmussen e Cameron (2007), trazem uma série de novas hipóteses e propostas quanto às relações entre os gêneros neotropicais, indo-malaios, africanos e australianos; lançando uma série de novas questões relativas à biogeografia do grupo.

#### **2.1.4. Filogenia**

Poucas propostas filogenéticas foram lançadas para o grupo. A primeira filogenia baseada em análise cladística para Meliponini foi proposta por Michener (1990) e baseou-se na análise de apenas 17 caracteres morfológicos que na sua maioria apresentavam apenas dois estados, com exceção de quatro destes que apresentavam três estados. Nesta proposta *Melipona* aparece como o gênero mais basal, posicionando-se no cladograma como grupo irmão dos demais Meliponini; o gênero *Trigona sensu* Michener aparece como monofilético, com representação na região Neotropical (*Camargoia*, *Duckeola*, *Frieseomelitta*, *Geotrigona*, *Ptilotrigona*, *Tetragona*, *Tetragonisca*, *Trigona sensu stricto*), na região Indo-Malaia (*Geniotrigona*, *Heterotrigona*, *Homotrigona*, *Lepidotrigona*,

*Lophotrigona*, *Odontotrigona*, *Platytrigona*, *Tetragonilla*, *Tetragonula*, *Tetrigona*, *Trigonella*) e na região Australiana (*Tetragonula*), representando uma grande disjunção intercontinental na distribuição deste clado. Algo semelhante ocorre com o clado que agrupa o gênero Neotropical *Trigonisca* (s. lat.), que inclui os gêneros *Celetrigona*, *Dolichotrigona*, *Leurotrigona* e *Trigonisca* (s. str.) a gêneros do Velho Mundo, em particular *Hypotrigona*.

Camargo e Pedro (1992a) reconstruíram a filogenia de Meliponini utilizando o mesmo conjunto de dados morfológicos, porém omitiram caracteres de machos, adicionaram dois novos caracteres e modificaram a polarização de alguns outros, resultando num total de apenas 12 caracteres. Nesta proposta, Camargo e Pedro encontraram, em contraste à posição de Michener (1990), uma divisão clara entre um clado contendo os gêneros africanos e um clado oposto contendo os demais gêneros de Meliponini. Outro ponto contrastante em relação à filogenia de Michener (1990) é a presença de *Melipona* inserida no clado não-africano, tendo *Plebeia* como seu grupo irmão, contrariando a posição de grupo irmão dos demais Meliponini proposto por Michener (1990). *Austroplebeia* aparece relacionado aos gêneros Neotropicais na proposta de Camargo e Pedro (1992) o que também vai de encontro à proposta de Michener (1990), que coloca este gênero relacionado às formas africanas. Um dos pontos concordantes entre as filogenias é a presença de disjunções intercontinentais dentro de gêneros, como em *Trigona sensu* Michener e como no clado que agrupa *Plebeia*, *Lestrimelitta* (neotropicais) e *Lisotrigona* e *Pariotrigona* (indo-malaios).

É evidente a discordância entre as duas filogenias e, devido ao pequeno número de caracteres morfológicos levantados e utilizados na análise, as duas propostas devem ser vistas criticamente. Dessa forma, diante da ausência de um estudo utilizando dados moleculares, Costa et al., 2003, propuseram a primeira filogenia molecular para Meliponini. Esta filogenia foi inferida através da utilização de seqüências do gene rDNA16S de 34 espécies de 22 gêneros, totalizando um universo 462 caracteres obtidos pelo alinhamento das seqüências com 187 destes caracteres informativos para a análise de parcimônia. Nesta filogenia, Costa et al. (2003) propõem o monofiletismo dos Meliponini neotropicais contrariando as propostas de Michener (1990) e Camargo e Pedro (1992a). *Hypotrigona* aparece como grupo irmão de todos os demais Meliponini discordando da proposta de Michener (1990), que coloca *Melipona* nesta posição,

todavia na proposta de Costa et al. (2003) o gênero *Melipona* surge como um gênero derivado relacionado a *Plebeia*, como proposto por Camargo e Pedro (1992a, b). O gênero *Austroplebeia* aparece isolado das formas africanas, indo-malaias e neotropicais, o que segundo Costa et al. (2003) reflete o seu isolamento geográfico, sendo este ponto de vista discordante tanto da proposta de Michener (1990) como da proposta de Camargo e Pedro (1992). Neste trabalho, Costa et al. (2003) obtiveram uma filogenia consistente, mas que apresentava alguns grupos com baixo suporte ou sem uma resolução clara, em parte devido à utilização de um único gene como marcador e ao número relativamente baixo de táxons de Meliponini utilizados.

Rasmussen e Cameron (2007) propuseram uma filogenia molecular para os Meliponini do “Velho Mundo”. Nesta proposta os autores utilizaram seqüências provenientes de quatro genes: do DNAr 16S, da rodopsina de comprimento de onda longo, do fator de alongação - 1 $\alpha$  e da argininoquinase. Os resultados mostraram uma clara divisão em três clados principais, um composto pelos gêneros africanos, outro composto por gêneros indo-malaios e australianos e o terceiro formado pelos gêneros neotropicais como previsto por Costa et al. (2003). Apesar da prévia confirmação do monofiletismo dos gêneros neotropicais, Rasmussen e Cameron (2007) não tratam deste fato em seu trabalho, talvez pelo pequeno número de táxons neotropicais utilizados. Outro ponto abordado é o não monofiletismo de *Trigona sensu* Michener, fato que corrobora o resultado encontrado por Costa et al. (2003), assim como a presença de *Melipona* inserida no clado neotropical. Desta forma, torna-se importante a investigação das relações entre os gêneros neotropicais para uma melhor compreensão das relações filogenéticas dentro deste grupo.

## **2.2. DNA Mitocondrial**

O DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) animal é uma molécula pequena, circular, rica em adenina e timina, que geralmente apresenta 37 genes, dos quais 13 codificam polipeptídios, 22 produzem RNAs transportadores (RNAt) e dois originam RNAs ribossomais (RNAr) constituintes das subunidades do ribossomo mitocondrial. Além destes genes, há uma região não codificante responsável pelo controle da replicação e da transcrição (Simon, et al., 1994; Boore, 1999).

Os estudos com o genoma mitocondrial têm aumentado a disponibilidade de seqüências completas para esta organela (Silvestre e Arias, 2006). Atualmente, existem 984 genomas mitocondriais animais completos disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), dentre estes *Trichoplax adhaerens* (Filo Placozoa) apresenta o maior tamanho, com 43.079 nucleotídeos, enquanto *Paraspadella gotoi* (Filo Chaetognatha) possui o menor, com 11.423 nucleotídeos. Apesar desta discrepância, o genoma mitocondrial animal apresenta em média 16.000 nucleotídeos (Boore, 1999; Weinlich et al., 2004; Silvestre e Arias, 2006). Para o Filo Arthropoda existiam, até fevereiro de 2007, 127 genomas mitocondriais completos, sendo três destes pertencentes à ordem Hymenoptera, um pertencente à vespa *Vanhornia eucnemidarum* (NC 008323) da família Vanhorniidae e dois pertencentes a abelhas da família Apidae, *Apis mellifera ligustica* (NC 001566) com 16.343 nucleotídeos e *Melipona bicolor* (NC 004529) com 14.422 nucleotídeos. A quantidade de genomas mitocondriais completamente seqüenciados vêm aumentando num ritmo acelerado. Silvestre et al. (2002) relataram em seu trabalho a existência de apenas 22 espécies de Arthropoda com o DNAmít completamente seqüenciado, hoje, cinco anos depois, já existem 127 genomas completos para este filo, o que resulta numa taxa de 20 novos genomas por ano. Apenas na primeira semana de janeiro de 2007, cinco novos genomas mitocondriais de Arthropoda foram depositados no GenBank, o que disponibiliza uma grande quantidade de informação, seja para estudos genômicos, seja para a busca de novas seqüências úteis como marcadores genéticos.

O DNAmít tem sido largamente utilizado como marcador molecular em estudos com animais, e isso deve-se a alguns fatores: (i) este pode ser amplificado com facilidade para diversos táxons; (ii) as seqüências podem ser obtidas sem a necessidade de clonagem, pois se trata de um genoma haplóide; (iii) apresenta uma alta taxa de evolução (iv) e toda a molécula apresenta uma mesma história genealógica, devido à ausência de recombinação (Hurst e Jiggins, 2005). Além destas características, Weinlich et al. (2004) destaca como características favoráveis à utilização do DNAmít: o tipo de herança, que geralmente é materna; o alto nível de substituição de nucleotídeos e o seu tamanho reduzido. Graças a estas características, o DNAmít tem sido muito empregado em estudos populacionais, biogeográficos, filogenéticos (Hurst e

Jiggins, 2005) e até mesmo taxonômicos, através da tentativa do estabelecimento dos códigos de barra de DNA (Hebert et al., 2003).

Apesar das facilidades de obtenção e trabalho quando comparado ao DNA nuclear, o DNA mitocondrial pode apresentar uma série de fatores complicadores, que segundo Hurst e Jiggins (2005) seriam: a herança materna, pois o DNAm<sub>t</sub> só reflete a história das fêmeas, podendo os machos apresentar uma história distinta que não pode ser detectada; a existência de seqüências do DNAm<sub>t</sub> integradas ao genoma nuclear, que poderiam ser amplificadas por primers mitocondriais, confundindo as análises e a seleção indireta causada por simbiontes herdáveis maternalmente como *Wolbachia*, que tenderiam a causar distorções nos resultados de estudos populacionais, filogenéticos e biogeográficos. Além disso, o DNAm<sub>t</sub> de Hymenoptera possui uma das proporções mais elevadas de adenina (A) e timina (T) entre os animais (Cameron, 1993; Simon et al., 1994; Downton e Austin, 1997a; Whitfield e Cameron, 1998), o que gera pronunciado desvio composicional e aumenta a ocorrência de homoplasias que podem causar resultados distorcidos em estudos filogenéticos e filogeográficos.

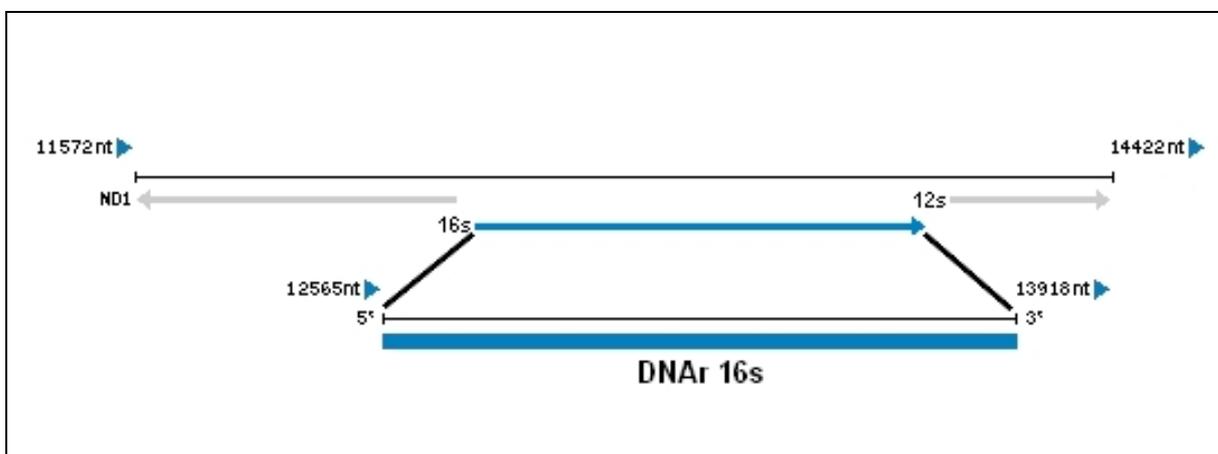
Diversos estudos utilizando marcadores oriundos do genoma mitocondrial têm sido realizados com abelhas da subfamília Apinae. Como já citado, *Apis mellifera ligustica* e *Melipona bicolor* tiveram seus genomas mitocondriais seqüenciados e depositados no GenBank. Apesar da existência de apenas dois genomas mitocondriais completos para esta subfamília, vários trabalhos têm sido realizados para a caracterização do DNAm<sub>t</sub>, principalmente para algumas espécies da tribo Meliponini. Nesta tribo, cinco espécies do gênero *Plebeia* (Francisco et al., 2001), sete do gênero *Melipona* (Weinlich et al., 2004), duas do gênero *Partamona* (Brito e Arias, 2005), uma do gênero *Tetragonisca* e uma do gênero *Schwarziana* (Arias et al., 2006) tiveram o seu DNAm<sub>t</sub> caracterizado. Os marcadores oriundos do DNAm<sub>t</sub> também têm sido utilizados com sucesso na reconstrução filogenética das abelhas corbiculadas (Cameron, 1993; Whitfield e Cameron, 1998; Koulianos, 1999; Cameron e Mardulin, 2001;), no estudo da filogenia em nível tribal (Costa et al., 2003; Rasmussen e Cameron, 2007) e genérico (Tanaka et al., 2001; Cameron e Williams, 2003; Arias e Sheppard, 2006).

### 2.2.1. DNAr 16S

O DNAr 16S (Figura 2) é um gene mitocondrial, cujo produto é um rRNA constituinte da subunidade maior do ribossomo mitocondrial (Alberts et al., 2002). Este gene apresenta regiões com taxas de evolução muito diferentes, o que indica que as seqüências obtidas a partir do 16S contêm informações que são úteis para a reconstrução filogenética em mais de um nível taxonômico (Simon, et al., 1994; Whitfield e Cameron, 1998). Por ser um gene mitocondrial, o 16S apresenta um alto conteúdo de AT, até 81,4% (Costa et al., 2003), o que segundo Downton e Austin (1997a) é resultado da predominância de transições G→A causadas pela assimetria na capacidade de pareamento das bases nos “ramos” do RNAr 16S, o que leva a um aumento no conteúdo de A, causando consequentemente um aumento no conteúdo de T. Em estudos filogenéticos, o conteúdo de AT tende a aumentar dos ramos mais basais para os mais derivados nos cladogramas, o que indica continuidade no processo de desvio composicional dentro de Hymenoptera (Downton e Austin, 1997a; Whitfield e Cameron, 1998). Esta tendência pode gerar resultados equivocados em estudos filogenéticos, tornando necessária a pesagem diferencial dos caracteres quando este gene é utilizado para comparar níveis taxonômicos superiores.

Seqüências oriundas do DNAr 16S têm sido utilizadas para estudos filogenéticos numa grande variedade de níveis taxonômicos (Whitfield e Cameron, 1998). Downton e Austin (1994) utilizaram seqüências do 16S na reconstrução das relações filogenéticas entre as superfamílias de Apocrita, com resultados congruentes com os obtidos por dados morfológicos. Chen et al. (2004) propuseram uma filogenia molecular para as vespas da família Eurytomidae baseada no uso do 16S, COI e de mais dois genes nucleares associados, e obtiveram resultados incongruentes entre os genes mitocondriais e nucleares, tendo os autores argumentado da raridade de incongruências tão marcantes quanto a encontrada por eles entre os dois grupos de fragmentos gênicos. Cameron (1993) utilizou uma região do DNAr 16S para reconstruir a filogenia das abelhas corbiculadas da subfamília Apinae, e obteve resultados incongruentes com os dados morfológicos, porém concordantes com reconstruções posteriores utilizando dados de DNA (Mardulyn e Cameron, 1999; Koulianos et al., 1999; Cameron e Mardulyn, 2001). Costa et al. (2003) usaram um fragmento do DNAr

16S na avaliação das relações entre as abelhas da tribo Meliponini e obtiveram um resultado incongruente com as propostas anteriores baseadas em dados morfológicos, exceto para alguns grupos menores bem definidos morfológicamente que puderam ser recuperados pelos dados moleculares. Cameron e Williams (2003) associaram o uso do 16S com mais dois genes, um nuclear e outro mitocondrial, a fim de avaliar as relações dentro do subgênero *Fervidobombus*. O resultado obtido mostrou congruência entre os cladogramas obtidos a partir dos dados dos três fragmentos gênicos e o obtido através dos dados morfológicos.



**Figura 2.** Localização do gene codificante para o RNAr 16S no genoma mitocondrial de *Melipona bicolor*. A ponta das setas representa o sentido de transcrição. A figura foi construída com base nos dados disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Como é perceptível, o 16S pode ser utilizado para estudos filogenéticos, que envolvam espécies próximas, tribos, subfamílias e até famílias proximamente relacionadas. Todavia deve ser usado com cautela para estudos entre gêneros e grupos de espécies pouco relacionadas, pois as regiões variáveis do gene podem apresentar-se saturadas de substituições, ao passo que as regiões conservadas podem não apresentar variação suficiente (Whitfield e Cameron, 1998).

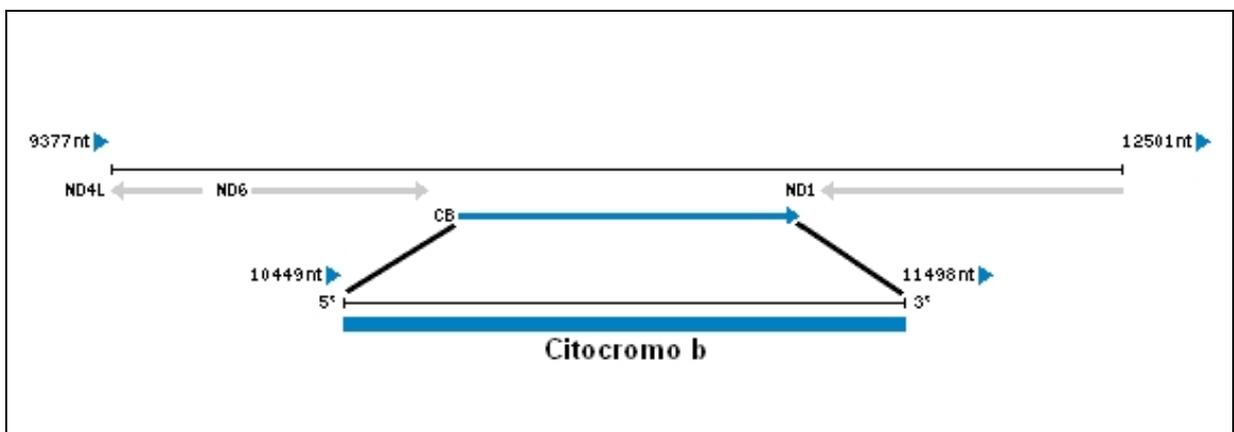
### 2.2.2. Citocromo B

O citocromo b (Figura 3) é um gene mitocondrial codificante para uma das proteínas que integram o complexo citocromo bc1 que compõe a cadeia transportadora de elétrons. Este gene, como todos os de origem mitocondrial, apresenta um desvio composicional na sua seqüência de nucleotídeos, havendo saturação por AT (Simon, et al., 1994; Leys et al., 2000; Simmons e Weller, 2001; Bull et al., 2003). Como é típico para um gene codificador de proteínas, a segunda posição do códon é a menos variável e a terceira a mais variável, havendo um desvio composicional mais pronunciado nesta posição que chega a apresentar 95% de A e T (Simmons e Weller, 2001; Bull et al., 2003) levando, na maioria dos casos, à uma saturação da seqüência por homoplasias (Leys et al., 2000).

Em Apidae, o citocromo b apresenta uma taxa de evolução acelerada, tanto para a sua seqüência nucleotídica, quanto para a de aminoácidos, o que segundo Simmons e Weller (2001) estaria relacionado ao aumento na taxa metabólica associado à endotermia facultativa, como é observável em *Apis*. Estas abelhas regulam sua temperatura e a do ninho utilizando mecanismos fisiológicos e comportamentais, mantendo a temperatura corporal sempre entre 28°C e 36°C.

O citocromo b é largamente utilizado em estudos de filogenia molecular de vertebrados, porém, seu emprego ainda é restrito no que se refere aos invertebrados, tendo começado a ser utilizado apenas recentemente (Simmons e Weller, 2001). Apesar deste uso recente, regiões do citocromo b têm sido empregadas em estudos filogenéticos compreendendo variados níveis taxonômicos dentro de Apidae. Koulianos et al. (1999) avaliaram as relações entre as tribos de abelhas corbiculadas de Apinae utilizando um fragmento do citocromo b e obteve resultados consistentes com os de Cameron (1993), obtidos com o DNAr 16S, e de estudos posteriores como o de Cameron e Mardulyn (2001) utilizando quatro genes, entre eles o citocromo b. Bull et al. (2003) analisaram a divergência filogenética de abelhas australianas da tribo Allodapini utilizando uma região do citocromo b aliada a mais dois fragmentos gênicos. Neste trabalho, os autores obtiveram topologias concordantes entre os diferentes métodos utilizados, porém, alguns grupos apresentaram baixo suporte, o que estes atribuíram à rápida divergência do grupo. Koulianos e Schmid-Hempel (2000) utilizaram uma região do citocromo b associada a uma do citocromo

oxidase I para avaliar as relações filogenéticas entre abelhas do gênero *Bombus*. Os resultados obtidos não foram congruentes com nenhum outro estudo prévio o que, segundo os autores, deve-se à confusa classificação do grupo, já que os dados apresentaram pouca homoplasia e todas as árvores compartilharam alguns grupos e padrões. Leys et al. (2000) realizaram uma análise filogenética do gênero *Xylocopa*, utilizando o citocromo b associado ao citocromo oxidase 1. Estes autores obtiveram três clados bem resolvidos, porém as relações entre estes clados e os demais subgêneros não foi definida, devido em parte à saturação de AT - que deve ter contribuído para o aumento das homoplasias - e a uma rápida evolução entre os subgêneros.



**Figura 3.** Localização do gene para o citocromo b no genoma mitocondrial de *Melipona bicolor*. A ponta das setas representa o sentido de transcrição. A figura foi construída com base nos dados disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Este gene mostrou-se útil para a reconstrução filogenética, porém devem ser tomadas uma série de medidas a fim de minimizar os efeitos das homoplasias causadas pela saturação por AT, principalmente na terceira posição do códon, onde elas tendem a ser mais numerosas. Alguns trabalhos têm usado a pesagem diferencial de caracteres para a última posição do códon obtendo melhorias na resolução dos clados e dos índices nos cladogramas. Diante da ausência de relatos na literatura sobre a utilização deste gene para estudos com Meliponini, a sua avaliação torna-se necessária.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Material Biológico

As amostras utilizadas foram obtidas a partir da coleção do professor Marco Antônio Costa, que conta com espécimes preservados em etanol, provenientes do Sul, Sudeste e Nordeste brasileiro e da Austrália. Estas amostras foram coletadas em meliponários de instituições de pesquisa, em ninhos nos ambientes naturais de ocorrência das espécies ou durante visita às plantas. Algumas destas foram coletadas há mais de dez anos e ainda apresentaram DNA em boas condições de preservação para extração, amplificação por PCR e seqüenciamento. Material adicional foi coletado por Antônio Carvalho, Olívia Duarte e Cinthia Martins. Além destas, foram obtidas amostras de *Austroplebeia* coletadas na região de Sydney, Austrália, fornecidas pela Dra. Patrícia Drumond; *Heterotrigona* da Tailândia, coletadas pelo Dr. Walter S. Sheppard (Washington State University – Pullman, WA, USA) e espécies da África do Sul da coleção do Dr. Gabriel A. R. Melo (UFPR), que também forneceu amostras de diversos gêneros neotropicais. A lista completa das espécies utilizadas pode ser vista na Tabela 2. Os espécimes da coleção do Professor Marco Antônio Costa encontram-se depositados no Laboratório de Citogenética e Marcadores da Universidade Estadual de Santa Cruz e o material gentilmente cedido pelo Dr. Gabriel Augusto Rodrigues de Melo encontra-se depositado no Museu do Departamento de Entomologia da Universidade Federal do Paraná. Sequências adicionais foram obtidas no GenBank (Tabelas 2; 3 e 4).

**Tabela 2.** Lista das espécies seqüenciadas no presente trabalho para o citocromo b e, ou DNAr 16S.

<b>Espécie</b>	<b>Origem</b>
<i>Austroplebeia australis</i>	Duaringa, Austrália
<i>Austroplebeia symei</i>	GinGin, Austrália
<i>Axestotrigona junodi</i>	África do Sul GM014
<i>Celetrigona longicornis</i>	Rondonópolis, MT, Brasil GM040
<i>Cephalotrigona capitata</i>	Florestal, MG, Brasil
<i>Friesella schrottkyi</i>	Viçosa, MG, Brasil
<i>Frieseomelitta dispar</i>	Ilhéus, BA, Brasil
<i>Frieseomelitta sp.</i>	Jaíba, MG, Brasil
<i>Frieseomelitta varia</i>	Viçosa, MG, Brasil*
<i>Geotrigona sp.</i>	Montes Claros, MG, Brasil
<i>Heterotrigona itama</i>	Chartaburi, Tailândia
<i>Hypotrigona sp.</i>	África do Sul, GM015
<i>Lestimelitta limao</i>	Ribeirão Preto, SP, Brasil
<i>Lestrimelitta sp.</i>	Jaíba, MG, Brasil
<i>Leurotrigona muelleri</i>	Viçosa, MG, Brasil*
<i>Melipona asilvai</i>	Viçosa, MG, Brasil*
<i>Melipona marginata</i>	São Paulo, SP, Brasil
<i>Melipona quadrifasciata</i>	Viçosa, MG, Brasil
<i>Melipona subnitida</i>	RN, Brasil
<i>Mourella caerulea</i>	Guarapuava, PR, Brasil GM027
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	Viçosa, MG, Brasil
<i>Nogueirapis butteli</i>	Rio Curicuriari, AM, Brasil GM026
<i>Oxytrigona tataira</i>	Cajuru, SP, Brasil
<i>Partamona cupira</i>	Viçosa, MG, Brasil*
<i>Partamona helleri</i>	Viçosa, MG, Brasil
<i>Plebeia phrynostoma</i>	Viçosa, MG, Brasil
<i>Plebeia droryana</i>	Viçosa, MG, Brasil
<i>Plebeia julianii</i>	Londrina, PR, Brasil
<i>Plebeia nigriceps</i>	Presidente Prudente, SP, Brasil
<i>Plebeia pugnax (n. nud.)</i>	São Paulo, SP, Brasil
<i>Plebeia remota</i>	Cunha, SP, Brasil
<i>Plebeia saiqui</i>	Cunha, SP, Brasil
<i>Plebeia sp.</i>	Jaíba, MG, Brasil
<i>Plebeia sp.1</i>	RN, Brasil
<i>Plebeia wittimanni</i>	Canguçu, RS, Brasil
<i>Ptilotrigona lurida</i>	Rio Curicuriari, AM, Brasil GM021
<i>Scaptotrigona postica</i>	Ribeirão Preto, SP, Brasil
<i>Scaptotrigona sp.</i>	São Luís, MA, Brasil
<i>Scaura atlantica</i>	Ilhéus, BA, Brasil
<i>Scaura latitarsis</i>	Ribeirão Preto, SP, Brasil
<i>Scaura longula</i>	Luziânia, GO, Brasil
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	Viçosa, MG, Brasil
<i>Schwarzula sp.</i>	Jaíba, MG, Brasil
<i>Schwarzula timida</i>	Rondonópolis, MT, Brasil GM042
<i>Tetragonisca angustula</i>	Viçosa, MG, Brazil
<i>Tetragonula carbonaria</i>	Sydney, Austrália
<i>Trigona cilipes</i>	Mato Grosso, Brasil
<i>Trigona fuscipennis</i>	Ribeirão Preto, SP, Brasil
<i>Trigona hyalinata</i>	Ilhéus, BA, Brasil
<i>Trigonisca sp.</i>	Rondonópolis, MT, Brasil GM044

\* Estas espécies não ocorrem em Viçosa, porém foram coletadas em meliponários ali estabelecidos.

**Tabela 3.** Lista das espécies presentes em Costa et al. (2003) e utilizadas no presente trabalho, as seqüências do DNAr 16S foram obtidas a partir do GenBank, os números de acesso encontram-se na coluna à direita.

<b>Espécie</b>	<b>Origem</b>	<b>Acesso</b>
<i>Austroplebeia australis</i>	Duaringa, Austrália	AF343112
<i>Austroplebeia symei</i>	GinGin, Austrália	AF343113
<i>Axestotrigona togoensis</i>	Harare, Zimbábue	AF343117
<i>Friesella schrottkyi</i>	Viçosa, MG, Brasil	AF343099
<i>Frieseomelitta doederleini</i>	Bom Jesus, PI, Brasil	AF343101
<i>Heterotrigona itama</i>	Chartaburi, Tailândia	AF343115
<i>Hypotrigona gribodoi</i>	Northern Province, África do Sul	AF343114
<i>Lepidotrigona ventralis</i>	Chiang Mai, Tailândia	AF343118
<i>Lestimelitta limao</i>	Ribeirão Preto, SP, Brasil	AF343106
<i>Meliplebeia beccarii</i>	Mgahinga, Uganda	AF343109
<i>Melipona compressipes</i>	Cameron e Mardulyn (2001)	AF181589
<i>Melipona quadrifasciata</i>	Viçosa, MG, Brasil	AF343100
<i>Meliwillea bivea</i>	Zurqui, Costa Rica	AF343108
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	Viçosa, MG, Brasil	AF343102
<i>Oxytrigona tataira</i>	Cajuru, SP, Brasil	AF343104
<i>Paratrigona subnuda</i>	C. do Castelo, ES, Brasil	AF343105
<i>Partamona helleri</i>	Viçosa, MG, Brasil	AF343098
<i>Plebeia droryana</i>	Viçosa, MG, Brasil	AF343092
<i>Plebeia julianii</i>	Londrina, PR, Brasil	AF343096
<i>Plebeia nigriceps</i>	Pres. Prudente, SP, Brasil	AF343094
<i>Plebeia remota</i>	Cunha, SP, Brasil	AF343097
<i>Plebeia saiqui</i>	Cunha, SP, Brasil	AF343093
<i>Plebeia wittimmani</i>	Canguçu, RS, Brasil	AF343095
<i>Plebeina denoiti</i>	Harare, Zimbábue	AF343116
<i>Scaptotrigona depilis</i>	Cameron e Mardulyn (2001)	AF181588
<i>Scaptotrigona luteipennis</i>	Cameron (1993)	L22900
<i>Scaptotrigona subobscuripennis</i>	Zurqui, Costa Rica	AF343103
<i>Scaura latitarsis</i>	Ribeirão Preto, SP, Brasil	AF343111
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	Viçosa, MG, Brasil	AF343110
<i>Tetragonisca angustula</i>	Viçosa, MG, Brasil	AF343107
<i>Trigona amalthea</i>	Tanaka et al. (2001)	AF214667
<i>Trigona fuscipennis</i>	Ribeirão Preto, SP, Brasil	AF343091
<i>Trigona hypogea</i>	Cameron (1993)	L22901
<i>Apis cerana</i>	Tanaka et al. (2001)	AF153089
<i>Apis dorsata</i>	Tanaka et al. (2001)	AF153098
<i>Apis florea</i>	Cameron (1993)	L22894
<i>Apis mellifera</i>	Tanaka et al. (2001)	AF214666
<i>Bombus avinoviellus</i>	Cameron (1993)	L22897
<i>Bombus pennsylvanicus</i>	Cameron (1993)	L22896
<i>Bombus terrestris</i>	Cameron e Mardulyn (2001)	AF181582
<i>Bombus variabilis</i>	Cameron (1993)	L22898
<i>Eufriesea caerulescens</i>	Cameron (1993)	L22904
<i>Euglossa imperialis</i>	Cameron e Mardulyn (2001)	AF1815841
<i>Eulaema polychroma</i>	Cameron (1993)	L22903

**Tabela 4.** Lista das espécies presentes em Rasmussen e Cameron (2007) utilizadas no presente trabalho, as seqüências do DNAr 16S foram obtidas a partir do GenBank, os números de acesso encontram-se na coluna à direita.

<b>Espécie</b>	<b>Origem</b>	<b>Acesso</b>
<i>Axestotrigona ferruginea</i>	Bwindi, Uganda	DQ790448
<i>Apotrigona infuscata</i>	Bwindi, Uganda	DQ790447
<i>Dactylurina staudingeri</i>	Yaounde, Camarões	DQ790451
<i>Dolichotrigona browni</i>	San Martin, Peru	DQ790457
<i>Geniotrigona incisa</i>	Sulawesi, Indonésia	DQ790392
<i>Geniotrigona thoracica</i>	Kedah, Malásia	DQ790393
<i>Geotrigona fulvohirta</i>	San Martin, Peru	DQ790466
<i>Homotrigona fimbriata</i>	Tak, Tailândia	DQ790403
<i>Hypotrigona ruspolii</i>	Yaounde, Camarões	DQ790441
<i>Lepidotrigona ventralis</i>	Labang, Sabah, Malásia	DQ790400
<i>Lepidotrigona terminata</i>	Sabah, Malásia	DQ790399
<i>Lisotrigona furva</i>	Pathumthani, Tailândia	DQ790444
<i>Lophotrigona canifrons</i>	Pasoh, Malásia	DQ790404
<i>Meliplebeia ogouensis</i>	Bwindi, Uganda	DQ790453
<i>Meliponula bocandei</i>	Bwindi, Uganda	DQ790452
<i>Nannotrigona melanocera</i>	Junín, Peru	DQ790460
<i>Odontotrigona haematoptera</i>	Labang, Sabah, Malásia	DQ790405
<i>Parapartamona tungurahuaana</i>	Equador, Loja	DQ790464
<i>Paratrigona onorei</i>	Pasco, Peru	DQ790462
<i>Partamona auripennis</i>	San Martin, Peru	DQ790463
<i>Platytrigona hobbyi</i>	Sugud, Sabah, Malásia	DQ790401
<i>Plebeia frontalis</i>	Puebla, México	DQ790459
<i>Plebeiella lendliana</i>	Bwindi, Uganda	DQ790454
<i>Plebeina hildebrandti</i>	L. Trichardt, África do Sul	DQ790455
<i>Sundatrigona moorei</i>	Mahua, Sabah, Malásia	DQ790402
<i>Tetragonilla atripes</i>	Pasoh, Malásia	DQ790409
<i>Tetragonilla rufibasalis</i>	Malásia, Sabah, Labang	DQ790410
<i>Tetragonula hockingsi</i>	Queensland, Austrália,	DQ790430
<i>Tetragonula mellipes</i>	Western Australia, Austrália,	DQ790428
<i>Tetrigona apicalis</i>	Pasoh, Malásia	DQ790406
<i>Tetrigona binghami</i>	Labang, Sabah, Malásia	DQ790408
<i>Tetrigona melanoleuca</i>	Sabah, Malásia	DQ790407
<i>Trigona amazonensis</i>	Madre de Dios, Peru	DQ790469

**Tabela 5.** Lista das espécies cujas seqüências do citocromo b foram obtidas a partir do GenBank, os números de acesso encontram-se na coluna à direita.

<b>Espécie</b>	<b>Origem</b>	<b>Acesso</b>
<i>Lestrimelitta limao</i>	Koulianos et al. (1999)	AF002724
<i>Melipona compressipes</i>	Cameron e Mardulyn (2001)	AF181615
<i>Tetragona dorsalis</i>	Koulianos et al. (1999)	AF002725
<i>Trigona hypogea</i>	Cameron e Mardulyn (2001)	AF181617
<i>Trigona necrophaga</i>	Koulianos et al. (1999)	AF002726
<i>Apis mellifera ligustica</i>	Crozier e Crozier (1992)	M87052
<i>Apis nigrocincta</i>	Cameron e Mardulyn (2001)	AF181609
<i>Bombus lucorum</i>	Koulianos et al. (1999)	AF002722
<i>Bombus pennsylvanicus</i>	Cameron e Mardulyn (2001)	AF181611
<i>Bombus ruderarius</i>	Koulianos et al. (1999)	AF002723
<i>Bombus terrestris</i>	Koulianos et al. (1999)	AF002721
<i>Eufriesea caerulescens</i>	Cameron e Mardulyn (2001)	AF181613
<i>Euglossa imperialis</i>	Koulianos et al. (1999)	AF002730
<i>Eulaema bombiformis</i>	Koulianos et al. (1999)	AF002728
<i>Eulaema meriana</i>	Cameron e Mardulyn (2001)	AF181614
<i>Exaerete frontalis</i>	Koulianos et al. (1999)	AF002729

### 3.2. Extração de DNA

Para a extração do DNA das abelhas foi utilizando o protocolo de Han e McPheron (1997). Algumas alterações foram realizadas, a fim de adaptar o método ao tamanho das abelhas utilizadas, bem como aumentar o rendimento final da extração. O processo foi executado de acordo com a descrição que se segue:

1. Prepara-se a Solução X (Tabela 6) adicionando 1µl de proteinase-K (20 mg/ml) para cada 200 µl da solução;
2. Coloca-se o tórax da abelha em um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml contendo 200 µl de solução X;
3. Macera-se o tórax manualmente usando uma ponteira de 1 ml;
4. Incuba-se em banho-maria a 55°C por 30 min;
5. Adiciona-se 200µl de solução Y (Tabela 6) e incuba-se no gelo por 10 min;

6. Adiciona-se 0,5 volumes de fenol. Em seguida inverte-se o tubo por 20 vezes e incuba-se no gelo por 3min;
7. Centrifuga-se em microcentrífuga a 14.000 RPM por 2 min;
8. Adiciona-se 0,5 volumes de clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1). Em seguida inverte-se o tubo por 20 vezes e incuba-se no gelo por 3 min;
9. Centrifuga-se em microcentrífuga a 14.000 RPM por 5 min;
10. Transfere-se o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 ml. Adiciona-se 1 volume (400  $\mu$ l) de clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1). Inverte-se o tubo por 20 vezes;
11. Centrifuga-se em microcentrífuga a 14.000 RPM por 5 min;
12. Transfere-se o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 ml. Adiciona-se 0,1 volume (40  $\mu$ l) de acetato de amônio e 2,5 volumes (1000  $\mu$ l) de etanol gelado (ou 2 volumes de isopropanol). Inverte-se o tubo lentamente por 10 vezes armazenando-o em seguida a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 60 min;
13. Centrifuga-se em microcentrífuga a 14.000 RPM por 20 min;
14. Descarta-se o sobrenadante, deixando o tubo secar por 2h à temperatura ambiente;
15. Redissolve-se o DNA-RNA em 50  $\mu$ l de TE 1X.

**Tabela 6.** Composição dos tampões X e Y utilizados na extração de DNA. Os volumes são para o preparo de 50 ml de cada uma das soluções.

Componente	Solução X	Solução Y
Tris-HCl 2M (pH 8,0)	0,25 ml	7,50 ml
SDS 10%	2,50 ml	3,70 ml
NaCl 5M	0,60 ml	-
Sacarose 50%	5,00 ml	5,00 ml
EDTA 0,5M (pH 8,0)	1,00 ml	10,00 ml
H <sub>2</sub> O	40,60 ml	23,80 ml

Após cada extração, foi feita a eletroforese do DNA em gel de agarose 0,8%, a fim de verificar-se a qualidade do material extraído. Após a aplicação de uma alíquota de 3,0 µl no gel, o DNA restante foi estocado em freezer a -20°C e posteriormente utilizado nas reações de amplificação.

### 3.3. Seleção dos genes

A seleção das regiões gênicas teve como base os resultados de estudos anteriores, bem como a disponibilidade de informações sobre o nível de variação da região e a sua adequação ao nível taxonômico deste trabalho. Foram testados os genes do fator de alongação  $1\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ), da rodopsina de comprimento de onda longo (opsina - *LW-Rh*), do RNA ribossomal mitocondrial 16S (DNAr 16S) e do citocromo b (*Cb*).

A região do *EF-1 $\alpha$*  testada foi aquela descrita por Danforth et al. (1999). A dificuldade encontrada para essa região, deve-se à presença de duas cópias deste gene no genoma das abelhas. Algumas das espécies de Meliponini utilizadas apresentaram amplificação de fragmentos de ambas as cópias do *EF-1 $\alpha$*  e mesmo com a elevação do nível de estringência, com o aumento da temperatura de anelamento dos primers, não foi possível a eliminação da segunda cópia amplificada. Seria necessário o desenho de uma nova seqüência específica para a região alvo, a cópia F2 do gene, entretanto, diante da baixa performance de amplificação desta região ela foi deixada em segundo plano.

Para a opsina, foram testados os primers descritos por Mardulyn e Cameron (1999), porém os mesmos não apresentaram boa performance na amplificação de alguns gêneros e um problema adicional com a qualidade do primer adquirido, impeliu à sua rejeição para o presente trabalho.

O DNAr 16S foi a primeira região selecionada com amplificação bem sucedida, já tendo sido testada com sucesso, por Costa et al. (2003) na reconstrução da filogenia dos Meliponini. O fragmento obtido com este par de primers corresponde às posições 13392 a 13943 do genoma mitocondrial de *Apis mellifera ligustica*. Os primers utilizados foram desenhados por Costa (1998) e estão registrados abaixo:

<b>Nome</b>	<b>Seqüência</b>	<b>Sentido</b>
LR13943F	5' CACCTGTTTATCAAAAACAT 3'	<i>Forward</i>
LR13392R	5' CGTCGATTTGAACTCAAATC 3'	<i>Reverse</i>

A segunda região selecionada foi o Citocromo b, que foi utilizado com sucesso por Koulianos et al. (1999) dentro do grupo das abelhas corbiculadas de Apinae e que ainda não havia sido testada para estudos dentro da tribo Meliponini. Os primers utilizados foram desenhados por Koulianos et al. (1999) e estão descritos abaixo:

<b>Nome</b>	<b>Seqüência</b>	<b>Sentido</b>
Cb1	5' CG(A/T)TTAATTCATATAAATGG 3'	<i>Forward</i>
Cb2	5' TATCATTC(A/T)GGTTTAATATG 3'	<i>Reverse</i>

### **3.4. Reação de Amplificação**

A amplificação dos fragmentos gênicos selecionados deu-se através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que foi realizada em termociclador Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700 da Applied biosystems utilizando-se o kit da *Taq* DNA Polimerase da Fermentas Life Sciences. A reação sucedeu-se num volume total de 25µl, contendo os componentes listados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Composição da mistura para a PCR para um volume final de 25µl.

<b>Componente</b>	<b>Volume</b>	<b>Concentração Final</b>
H <sub>2</sub> O deionizada	12,00 µl	-
Tampão*	2,50 µl	1X
MgCl <sub>2</sub>	3,20 µl	10,00 mM
dNTPs	2,50 µl	0,25µM de cada
Primer F	1,25 µl	1,00µM
Primer R	1,25 µl	1,00µM
Taq DNA polimerase	0,30 µl	1,50u
DNA	2,00 µl	1,00 a 5,00 ng/µl

\*Concentração final 75,00 mM de Tris-HCL (pH 8,8), 20,00 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,01% de Tween20

Ambos os fragmentos gênicos, 16S e Citocromo b, foram submetidos a 40 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, com um passo de extensão final de 7 min. As temperaturas de anelamento dos primers utilizados foram aumentadas em relação ao recomendado na literatura - Costa et al. (2003) utilizaram 42°C para o 16S e Koulianos et al. (1999) utilizaram 50°C para o Citocromo b. Os ciclos e as temperaturas de anelamento utilizadas para os dois pares de primers estão representados no quadro a seguir:

<b>Passo</b>		<b>Primers</b>			
		<b>DNAr 16S</b>		<b>Citocromo b</b>	
		<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
1x	Desnaturação Inicial	94°C	180s	94°C	180s
40x	Desnaturação	94°C	60s	92°C	60s
	Anelamento	47°C	90s	52°C	60s
	Extensão	64°C	90s	72°C	60s
1x	Extensão Final	64°C	420s	72°C	420s

Terminada a amplificação, alíquotas de 3 $\mu$ l dos produtos de PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (25 $\mu$ g/ $\mu$ l), a fim de avaliar a eficácia da PCR. Após 1h de corrida eletroforética a 90V, as bandas foram visualizadas no gel através de luz ultravioleta e fotografado no EDAS 240 da KODAK, os arquivos de imagem foram armazenados e analisados. O tamanho dos fragmentos e as respectivas concentrações de DNA (ng/ $\mu$ l) foram determinados através da comparação entre as bandas obtidas e o padrão  $\Phi$ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) da Fermentas Life Sciences. Os produtos da PCR foram estocados em freezer a -20°C.

### **3.5. Reação de Purificação**

Os produtos da PCR foram tratados com Exonuclease I de *Escherichia coli* (EXO I) e Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP), ambas da Usb. A EXO I atua clivando as ligações fosfodiéster entre os nucleotídeos que compõem o primer, por ser uma exonuclease esta só é capaz de atuar em DNA fita simples, eliminando assim os resíduos de primer ainda presentes no produto da PCR. A SAP atua clivando o fosfato dos desoxiribonucleotídeos (dNTPs) remanescentes da reação de amplificação, inativando-os. A mistura para a reação de purificação foi composta por 0,66 $\mu$ l de EXOI; 0,66  $\mu$ l de SAP; 0,68 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O deionizada autoclavada e 12 $\mu$ l de produto da PCR, totalizando 14 $\mu$ l. A reação foi efetuada em um termociclador Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700 da Applied biosystems, com a seguinte programação: 37°C por 30 min e 80°C durante 15 min. Ao fim da reação, o produto foi estocado em freezer a -20°C até a utilização para a reação de seqüenciamento.

## 3.6. Seqüenciamento

### 3.6.1. Reação de Seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando-se o DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit (MegaBACE™) da GE Healthcare. A mistura de reação foi composta por 2,0µl do DYEnamic™; 0,5µl de primer *Forward* ou *Reverse* (3,2µM); 1,5µl de H<sub>2</sub>O deionizada autoclavada e 1,0µl de produto da PCR purificado (~50ng/µl). Em algumas ocasiões o volume de água foi modificado em função da variação de concentração do DNA, buscando-se sempre inserir na mistura de 45 a 60ng do DNA purificado. As amostras de cada espécie foram feitas em seis réplicas, três com o primer *Forward* e três com o *Reverse*, tanto para o 16S como para o citocromo b, e foram distribuídas em uma microplaca para PCR de 96 poços da Axygen (PCR-96-FS-C). Após a preparação, a mistura de reação foi colocada em um termociclador Mastercycler® 5333 da Eppendorf e submetida a 40 ciclos de reação de terminação com as seguintes especificações: 94°C por 30s; 52°C, para o citocromo b e 47°C para o 16S por 30s; 72°C por 80s. Ao fim do processo, o material foi embrulhado em folha de alumínio e estocado em freezer a -20°C.

### 3.6.2. Precipitação

O material proveniente da reação de seqüenciamento foi precipitado com a finalidade de eliminar os resíduos de primer, dNTPs e didesoxirribonucleotídeos (ddNTPs) remanescentes do processo anterior. A precipitação foi realizada na presença de pouca luminosidade e obedeceu aos seguintes passos:

1. Adicionou-se 1µl de acetato de amônio 7,5M (acompanha o DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit) em cada poço;
2. Fez-se uma curta centrifugação (1000 RPM por 10s), adicionou-se 25µl de etanol absoluto, selou-se a placa com adesivo e em seguida agitou-se em vortex rapidamente;

3. Incubou-se a placa por 15 min no escuro a 4°C;
4. Centrifugou-se durante 45 min a 4000RPM a 4°C;
5. Descartou-se o sobrenadante;
6. Adicionou-se 140µl de etanol 70%;
7. Centrifugou-se por 15 min a 4000 RPM a 4°C;
8. Descartou-se o sobrenadante;
9. Centrifugou-se a placa invertida a 1700 RPM por 10s;
10. Adicionou-se 5µl de formamida 70% (acompanha o DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit), centrifugando rapidamente (1000 RPM por 10s).

Quando não foi utilizado imediatamente para o seqüenciamento o material precipitado e purificado foi envolvido em folha de alumínio e estocado em freezer a -20°C. Antes de serem aplicadas no seqüenciador, as amostras foram agitadas em vortex a 1000 RPM por 30 min.

### **3.6.3. Obtenção das seqüências**

O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador MegaBACE™ 1000 Sequencing System da GE Healthcare. Para isso, os 96 capilares do seqüenciador foram carregados com a matriz de poliacrilamida linear MegaBACE™ Long Read Matrix da GE Healthcare, tendo as amostras sido injetadas após o processo de carregamento e equilíbrio da matriz. A injeção das amostras deu-se a 2KV por 90s e a corrida eletroforética foi efetuada a 9KV por 120 min a 44°C com tampão MegaBACE™ 10x Running buffer (GE Healthcare) diluído 10 vezes.

Ao fim do seqüenciamento, as seqüências de DNA foram armazenadas no disco rígido do computador conectado ao MegaBACE™. Estas foram previamente analisadas e exportadas no formato SCF com o auxílio do programa MegaBACE™ Sequence Analyzer versão 3.0.0208.1401 (GE Healthcare).

### **3.7. Análise das seqüências de DNA**

As seqüências importadas a partir do computador conectado ao MegaBACE™ 1000 foram analisadas e organizadas com o auxílio da ferramenta Seqman do programa Lasergene 7.0 da DNASTAR®. No Seqman os arquivos SCF contendo os eletroferogramas das seis seqüências, três do primer *forward* e três do primer *reverse*, obtidas para cada uma das espécies foram alinhados e as suas seqüências comparadas a fim de obter-se uma seqüência consenso. Após verificação e correção das seis seqüências, o consenso foi exportado e salvo no formato FASTA (.fas), para posterior alinhamento.

### **3.8. Análise filogenética**

#### **3.8.1. Alinhamento dos fragmentos gênicos**

O alinhamento das seqüências obtidas por seqüenciamento e do GenBank foi realizado com o auxílio da ferramenta Clustal W integrada ao programa MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar, Tamura e Nei, 2004). Após o alinhamento automático algumas posições foram ajustadas manualmente, a fim de maximizar a homologia entre as bases. Para o rDNA16S o alinhamento foi realizado manualmente utilizando como base o bloco de seqüências previamente alinhadas utilizadas por Costa et al. (2003). Os dois blocos de seqüências alinhadas para o citocromo b e DNAr 16S foram unidos em um único conjunto de dados manualmente, as seqüências previamente alinhadas foram inseridas em paralelo para cada uma das espécies que tiveram seqüências em comum. Após a realização dos alinhamentos os arquivos foram convertidos para o formato NEXUS (.nex) utilizando programa MEGA 3.1 (Kumar, Tamura e Nei, 2004).

Ainda no programa MEGA 3.1 (Kumar, Tamura e Nei, 2004) foram geradas matrizes de divergência não corrigidas para cada um dos blocos de alinhamentos, utilizando o método da *p-distance* e calculadas as frequências de A, T, G e C.

### **3.8.2. Análise de máxima parcimônia**

As análises de parcimônia foram realizadas no programa Winclada 1.00.08 (Nixon, 2002) através de busca heurística, já que a quantidade de táxons utilizados exigiria um grande esforço computacional para uma análise baseada em busca exaustiva. Para a maior parte das análises foram utilizados os seguintes parâmetros: *Maximum trees to keep: 10.000; Number of replications 10.000; Starting trees per rep: 10*, com os demais comandos como default. A avaliação do suporte dos ramos por *jackknife* e *bootstrap* foi realizada no Winclada 1.00.08 (Nixon, 2002) e teve os seguintes parâmetros: *Number of replications: 1000; number of search reps:10; starting trees per rep:10; max trees: 200*.

#### **3.8.2.1. DNAr 16S**

Foram realizadas duas etapas de análises para o rDNA16S. A primeira delas enfocou espécies neotropicais utilizando-se o conjunto de dados obtidos por seqüenciamento e o utilizado por Costa et al., (2003), para esta análise foram utilizados os mesmos parâmetros citados anteriormente. A segunda análise combinou o conjunto de dados utilizados na análise anterior com os dados produzidos por Rasmussen e Cameron (2007), presentes na Tabela 4, que enfocou a fauna do Velho Mundo. Foram utilizadas como grupo externo as espécies de Apini, Bombini e Euglossini presentes na Tabela 3.

### 3.8.2.2. Citocromo b

Diferentes análises foram realizadas com o citocromo b, a primeira delas incluiu todos os táxons presentes no alinhamento representado no Apêndice B, tendo como grupo externo as espécies de Apini, Bombini e Euglossini presentes na Tabela 5. Uma segunda análise foi efetuada restringindo-se o grupo externo a apenas Bombini e por fim foi realizada a terceira análise, excluindo-se a terceira posição dos códons.

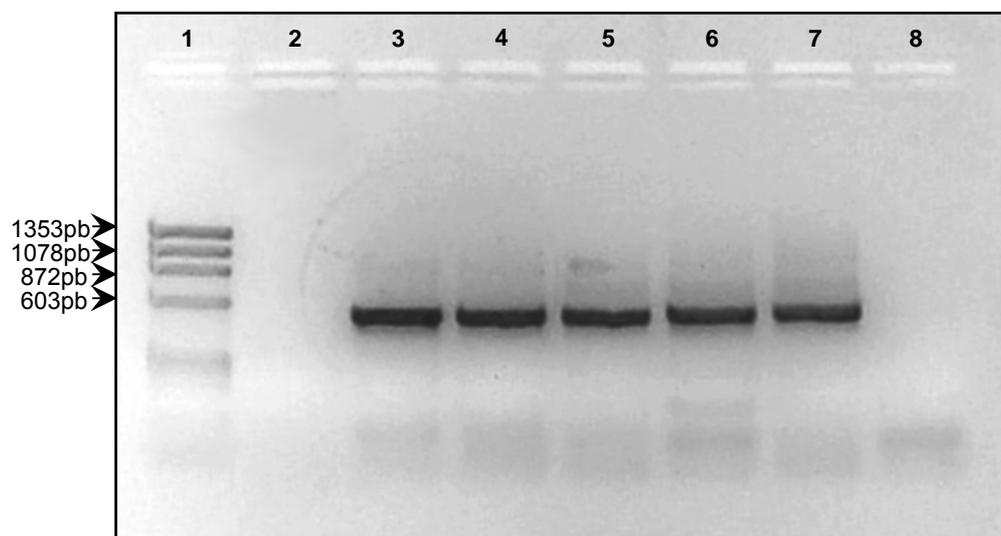
### 3.8.2.3. Análise combinada

Para a análise da matriz combinando os dados do DNAr 16S e do citocromo b, foram utilizados os mesmos parâmetros descritos no início desta seção. Uma análise adicional, mais exaustiva, foi realizada alterando-se o número de replicações, que passou a ser de 100.000. Nesta análise o grupo externo foi composto pelas espécies *Apis mellifera ligustica* (Apini), *Bombus pennsylvanicus*, *B. terrestris* (Bombini) e *Eufriesea caerulescens*, *Euglossa imperialis* (Euglossini).

## 4. RESULTADOS

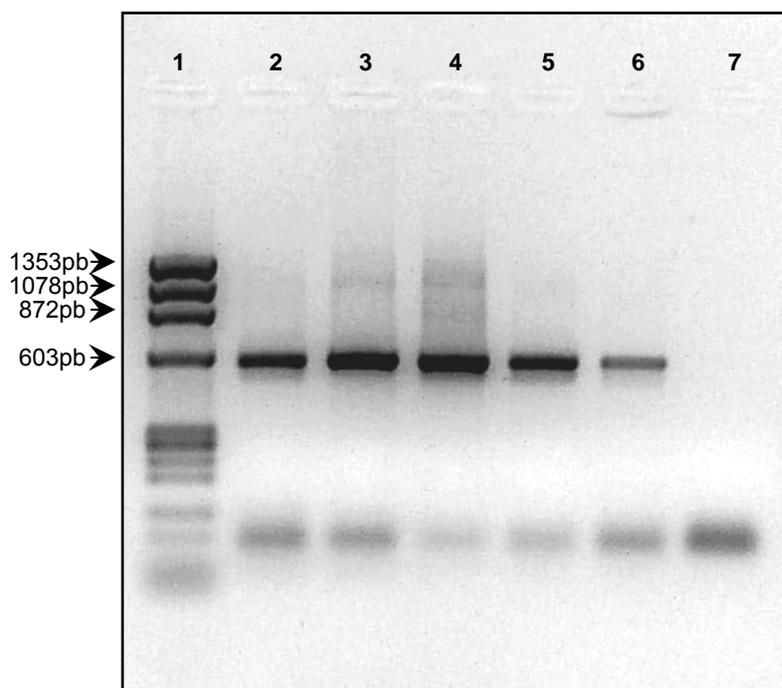
### 4.1. Amplificações por PCR

O par de primers LR13943F e LR13392R (Costa et al., 2003) foi eficiente na amplificação do DNAr 16S de todas as espécies utilizadas, produzindo um fragmento de aproximadamente 550 pares de bases (Figura 4). A utilização da temperatura de anelamento em 42°C, como descrito por Costa et al. (2003), causou o aparecimento de bandas inespecíficas, fato que foi resolvido com a elevação dessa temperatura em 5°C.



**Figura 4** - Gel demonstrativo da qualidade da amplificação por PCR para o fragmento do DNAr 16S em gel de agarose 1,5%. A faixa número 1 contém o marcador  $\Phi$ X174 DNA/BsuRI (HaeIII), as faixas de número 3 à 7 contêm amostras de DNA de diferentes espécies de Meliponini amplificadas e a faixa 8 o controle negativo.

A amplificação do gene para o citocromo b utilizando os primers Cb1 e Cb2, (Koulianus et al., 1999) produziu um fragmento de aproximadamente 600 pares de bases (Figura 5). Algumas espécies apresentaram bandas não-específicas, o que foi resolvido com aumento da temperatura de anelamento do primer em 2°C. Todavia *Axestotrigona junodi* continuou apresentando uma segunda banda, mesmo com aumentos superiores a 2°C na temperatura de anelamento, inviabilizando sua inclusão na análise. O par de primers não foi útil para a amplificação do DNA de *Nogueirapis butteli* e *Plebeia nigriceps*. É possível que essas espécies apresentem substituições de base no sítio de anelamento dos primers. As amplificações realizadas com este par de primers foram menos uniformes que as realizadas com o 16S, havendo variação do nível de amplificação entre as diferentes espécies.



**Figura 5** - Gel demonstrativo da qualidade da amplificação por PCR para o fragmento do citocromo b em gel de agarose 1,5%. A faixa número 1 contém o marcador  $\Phi$ X174 DNA/BsuRI (HaeIII), as faixas de número 2 à 6 contêm amostras de DNA de diferentes espécies de Meliponini amplificadas e a faixa 7 o controle negativo.

## 4.2. Seqüenciamento e alinhamento

### 4.2.1. DNAr 16S

Foram obtidas 23 novas seqüências de espécies representativas de 20 gêneros de Meliponini a partir do seqüenciamento dos fragmentos do DNAr 16S. O comprimento destas variou entre 396 pb para *Hypotrigona sp.* e 510 pb para *Scaura longula*.

O alinhamento manual das seqüências obtidas, contendo 10 novos gêneros, com o bloco de seqüências utilizado por Costa et al. (2003), resultou, após a exclusão das extremidades, numa matriz (Matriz 16S A) de 464 caracteres composta por 67 táxons. Destes, 57 pertenciam à tribo Meliponini, representada por 32 gêneros; três à tribo Bombini; três à tribo Euglossini, representada por três gêneros; e quatro à tribo Apini. O nível máximo de divergência entre as seqüências dos táxons incluídos nesta matriz foi de 28,23%, entre *Heterotrigona itama* e *Apis cerana*. Entre os Meliponini o nível máximo de divergência encontrado foi de 19,14%, entre *Tetragonula carbonaria* e *Trigona amalthea*. O conjunto de seqüências apresentou um desvio composicional, verificando-se uma alta porcentagem de A+T= 81,1% , como pode ser visto na Tabela 8.

**Tabela 8.** Composição nucleotídica média da matriz contendo as seqüências obtidas no presente trabalho e as utilizadas por Costa et al. (2003).

Base	Freqüência média (%)	Limite de variação (%)
A	41,7	38,5 – 45,6
T	39,4	36,3 – 41,9
G	12,4	10,5 – 14,7
C	6,5	5,0 – 9,5

As proporções de A, T, G e C de cada uma das espécies utilizadas pode ser vista no Apêndice D.

A adição de novas seqüências recentemente depositadas no GenBank (Rasmussen e Cameron 2007) alinhadas com o bloco composto pelo material seqüenciado no presente trabalho e o material utilizado por Costa et al (2003), geraram uma matriz (Matriz 16S B) com 452pb e 98 táxons. Neste alinhamento estão representadas 88 espécies da tribo Meliponini pertencentes a 48 gêneros, dos quais 26 com origem neotropical. Os 10 táxons restantes foram os mesmos de Bombini, Euglossini e Apini citados anteriormente. Na análise de divergência das seqüências foi encontrado um valor máximo de 26,44% entre *Tetragonilla atripes* e *Apis cerana*, os menores valores de divergência ficaram abaixo de 1%. As proporções de A, T, G e C sofreram pequenas variações, mantendo a alta freqüência de AT previamente detectada, como pode ser visto na Tabela 9. Houve um pequeno decréscimo de 0,8% na freqüência de AT quando foram adicionadas as seqüências de Rasmussen e Cameron (2007), resultando em 80,3%. Isso parece estar relacionado à ocorrência de uma maior proporção de G e C nos táxons de Meliponini do “Velho Mundo”, como pode ser visto no Apêndice A e D.

**Tabela 9.** Composição nucleotídica média da matriz contendo as seqüências obtidas no presente trabalho, as utilizadas por Costa et al. (2003) e parte das seqüências obtidas por Rasmussen e Cameron (2007).

Base	Freqüência média (%)	Limite de variação (%)
A	41,4	36,9 – 45,6
T	38,9	34,2 – 41,9
G	12,9	10,5 – 16,4
C	6,8	5,6 – 10,1

#### 4.2.2. Citocromo b

O seqüenciamento do fragmento amplificado pelo par de primers Cb1 e Cb2 resultou em seqüências que variaram entre 403pb para *Leurotrigona muelleri* e 537pb para *Nannotrigona testaceicornis*. Não foi possível a obtenção das seqüências de *Nogueirapis butteli*, *Plebeia nigriceps* e *Axestotrigona junodi* por

problemas na amplificação, como citado anteriormente. Também não foi possível a obtenção das seqüências de *Ptilotrigona lurida* e *Hypotrigona sp.*, a primeira por não ter apresentado boa performance na amplificação, talvez por um anelamento deficiente dos primers utilizados e a segunda por não produzir seqüências com qualidade suficiente para serem aproveitadas no presente trabalho. Para *Plebeina denoiti* foi obtido um fragmento muito curto, apenas 303pb, sendo o mesmo descartado devido à grande quantidade de dados faltantes.

O alinhamento das seqüências obtidas com as cinco seqüências de Meliponini disponíveis no GenBank resultou numa matriz com 473 caracteres e 60 espécies, dos quais 49 pertencem à tribo Meliponini incluindo um total de 23 gêneros, cinco à tribo Euglossini, quatro à tribo Bombini e dois à tribo Apini. O nível de divergência entre as seqüências de Meliponini variou de 0,53%, entre *Scaura latitarsis* e *Scaura atlantica* e entre *Plebeia phrynostoma* e *Plebeia droryana*, a 29,55% entre *Tetragonula carbonaria* e *Austroplebeia symei*. O valor máximo de divergência nesta matriz de dados - 32,18% - foi registrado entre *T. carbonaria* e o gênero do grupo externo *Eulaema meriana*. *T. carbonaria* foi marcadamente divergente nesta matriz. Quando comparada a outros táxons do grupo externo, estes valores foram de 31,9% em relação a *Eulaema bombiformis* e 30% em relação às espécies de Apini. Desconsiderando-se as seqüências de Euglossini e de Apini o maior nível de divergência em relação ao grupo externo é de 28,76% entre *T. carbonaria* e *Bombus terrestris*, ou seja um valor inferior a 30%.

Nas seqüências obtidas para o citocromo b, assim como nas do DNAr 16S, foi observada uma alta taxa de A e T (80,8%), como pode ser visto na Tabela 10. A composição nucleotídica da seqüência de *Tetragonula carbonaria* apresentou-se distinta das demais, com os menores conteúdos de A e T (25,9 e 42,4%) e consequentemente os maiores conteúdos de G e C (15,6 e 16,1%).

**Tabela 10.** Composição nucleotídica média da matriz contendo as seqüências do citocromo b.

Base	Freqüência média (%)	Limite de variação (%)
A	34,9	25,9 – 37,4
T	45,9	42,4 – 49,6
G	9,1	7,4 – 15,6
C	10,1	8,6 – 16,1

Uma análise da composição nucleotídica de acordo com a posição do códon, mostrou um maior desvio na 3ª posição, apresentando um conteúdo de AT= 97,4% (Tabela 11). Mais uma vez, *Tetragonula carbonaria* apresentou os valores mais discrepantes, o conteúdo de citosina (C=13,5%) e guanina (G=12,9%) na terceira posição do códon, chegou a ser quase duas vezes maior que o maior valor encontrado quando se excluiu *T. carbonaria* da análise, e quase 13 vezes maior que os menores valores encontrados. A exclusão de *T. carbonaria* modificou sensivelmente os valores da freqüência média de nucleotídeos para a 3ª posição do códon, A= 47,9% T= 49,9% G= 0,8% e C=1,4%, o que demonstra o quão discrepante é a composição da seqüência de *T. carbonaria*, pois a exclusão de um único táxon num universo de 60 fez a freqüência média de AT aumentar em 0,4%. A composição de A, T, G e C para cada uma das espécies pode ser vista no Apêndice E.

**Tabela 11.** Composição nucleotídica média da matriz contendo as seqüências do citocromo b de acordo com a posição do códon.

Base	Freqüência média (%)		
	Posição		
	1ª	2ª	3ª
A	35,1	22,2	47,6
T	39,3	48,6	49,8
G	14,7	11,6	1,0
C	10,9	17,6	1,6

### 4.2.3. DNAr 16S e citocromo b

A união das seqüências das espécies em comum para o 16S e para o Citocromo b em um único bloco de alinhamento resultou numa matriz composta por 40 táxons e com 909 caracteres (Apêndice C). Dos 40 táxons representados na matriz, 35 pertenciam à tribo Meliponini, dois à tribo Bombini, dois à tribo Euglossini e um à tribo Apini. A análise de divergência entre as seqüências dos táxons utilizados mostrou valores que variaram de 1,6% entre *Lestrimelitta limao* e *Lestrimelitta sp.* a 27,8% entre *Tetragonula carbonaria* e *Apis mellifera ligustica*. Como foi encontrado nos dois genes separadamente, o desvio composicional também está presente na análise conjunta, sendo a proporção de A+T = 81,1% idêntica à encontrada para o fragmento do DNAr 16S, a alta ocorrência de A e T pode ser vista na Tabela 12.

**Tabela 12.** Composição nucleotídica média da matriz conjunta, contendo as seqüências do citocromo b e DNAr 16S.

Base	Freqüência média (%)	Limite de variação (%)
A	38,0	35,4 – 39,6
T	43,1	39,6 – 45,7
G	12,4	9,3 – 15,6
C	6,5	5,3 – 7,2

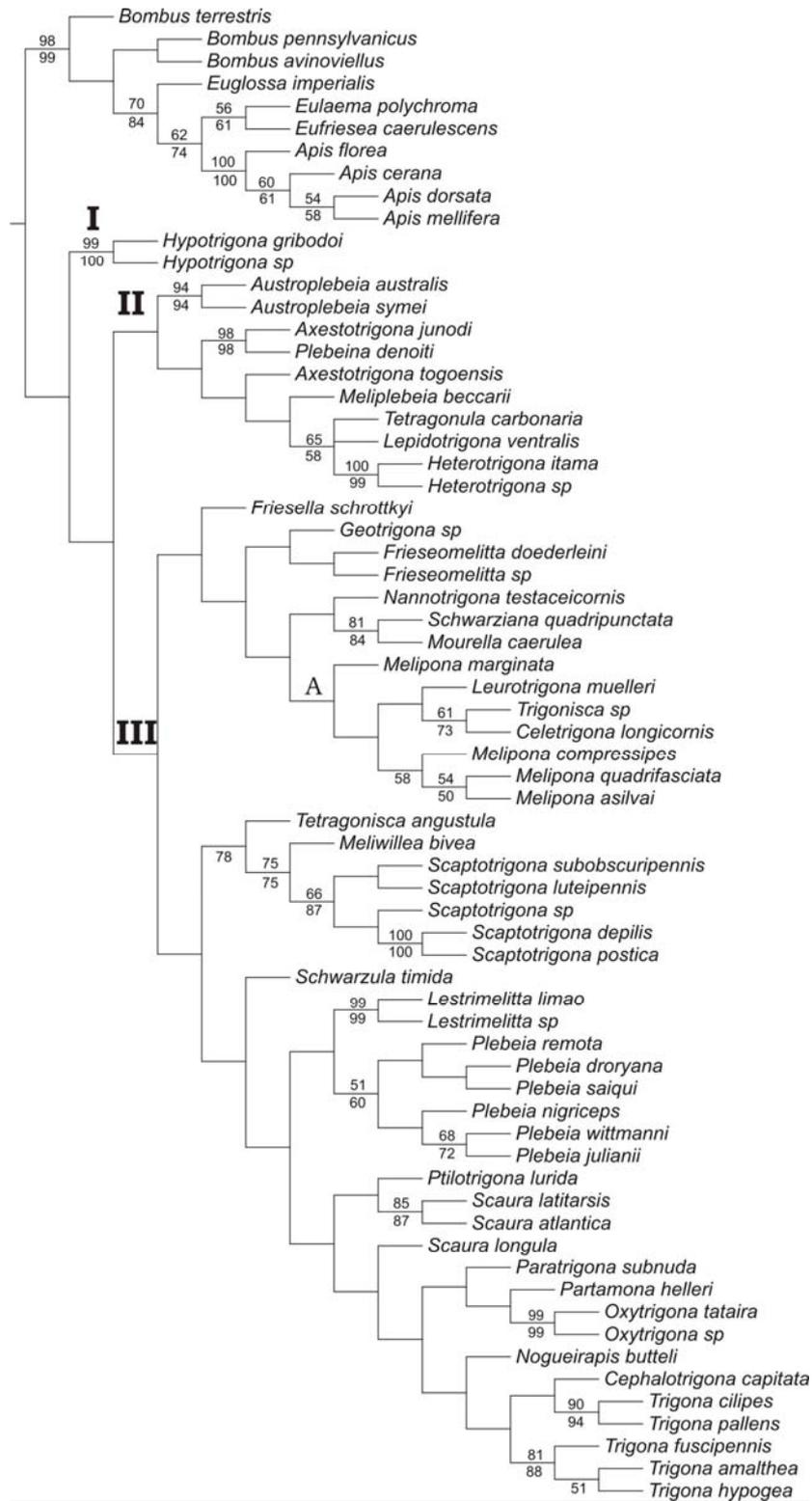
### 4.3. Análise Filogenética

#### 4.3.1. Análise de Máxima Parcimônia com o DNAr 16S

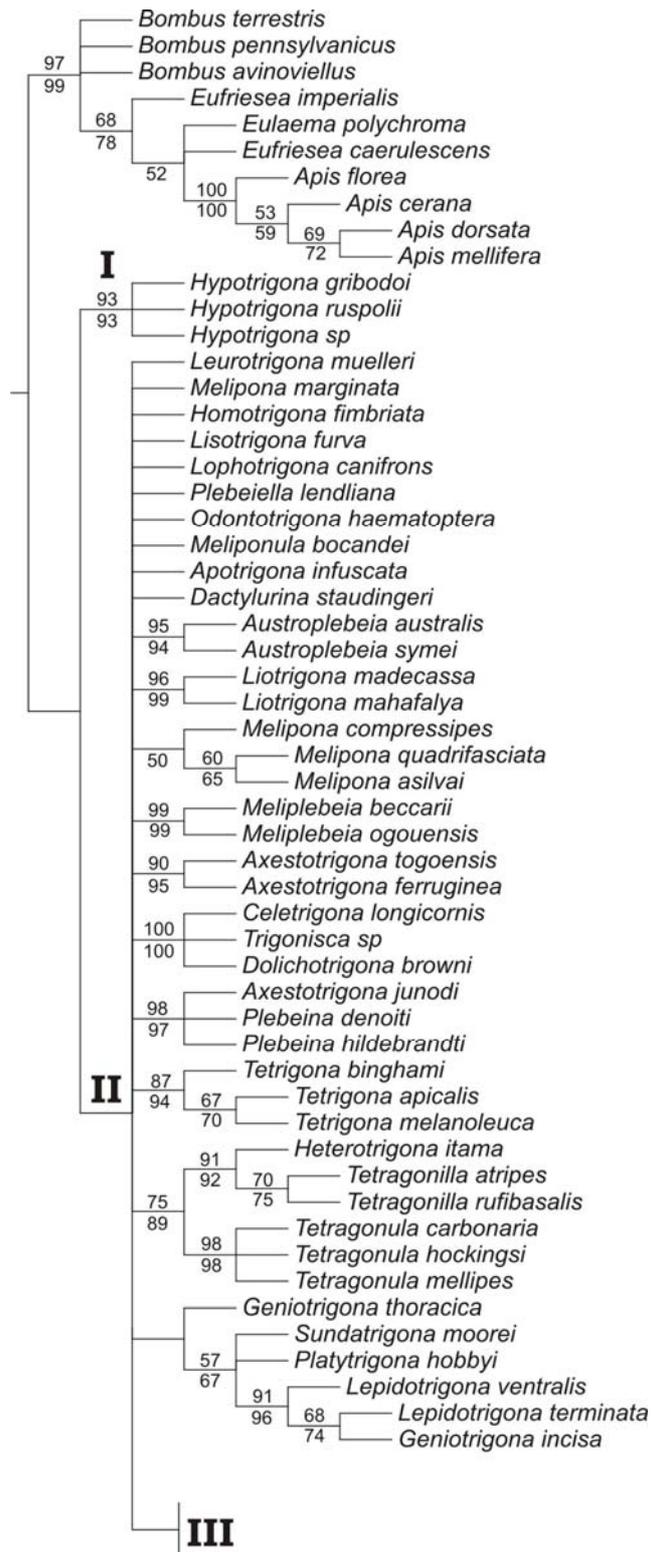
A matriz 16S A apresentou 248 sítios variáveis, o que corresponde a 53% da seqüência, sendo 190 destes informativos para análise de máxima parcimônia. Esta análise resultou em duas árvores mais parcimoniosas com 1202 passos, índice de consistência de 0,30 e índice de retenção 0,55; a árvore de consenso estrito é mostrada na Figura 6. Meliponini aparece nesta análise como um grupo monofilético apresentando três clados principais: o clado I, onde *Hypotrigona*

aparece como grupo irmão de todos os demais Meliponini; o clado II, que apresenta *Austroplebeia* como grupo irmão dos táxons etiópicos e indomalaios e o clado III que reúne os gêneros neotropicais.

A matriz 16S B apresentou 246 sítios variáveis dos quais 204 foram informativos para parcimônia. A análise deste conjunto de dados resultou em 590 árvores mais parcimoniosas com 1606 passos, índice de consistência 0,25 e índice de retenção 0,57, estando a árvore de consenso estrito representada na Figura 7. Três cladogramas podem ser destacados: o clado I, onde o gênero africano *Hypotrigona* aparece como o grupo mais basal de Meliponini; o clado II, que reúne todos os demais gêneros de Meliponini incluídos na análise e o clado III, que está inserido no clado II, mas merece destaque por agrupar todos os gêneros neotropicais, exceto *Melipona*, *Leurotrigona*, *Celetrigona*, *Dolichotrigona* e *Trigonisca* que formam agrupamentos menores inseridos na grande politomia presente no clado II. Uma das árvores mais parcimoniosas é representada na figura 8.



**Figura 6** - Consenso estrito das duas árvores mais parcimoniosas para o DNAr 16S. Os números acima das linhas correspondem aos valores de *bootstrap* e os abaixo correspondem aos valores de *jackknife*, estão representados os valores maiores que 50%. Comprimento da árvore = 1207; CI = 0,30; RI = 0,55.



**Figura 7** - Consenso estrito das 590 árvores mais parcimoniosas para o DNAr 16S. Os números acima das linhas correspondem aos valores de *bootstrap* e os abaixo correspondem aos valores de *jackknife*, estão representados os valores maiores que 50%. Comprimento da árvore = 1783; CI = 0,23; RI = 0,51.

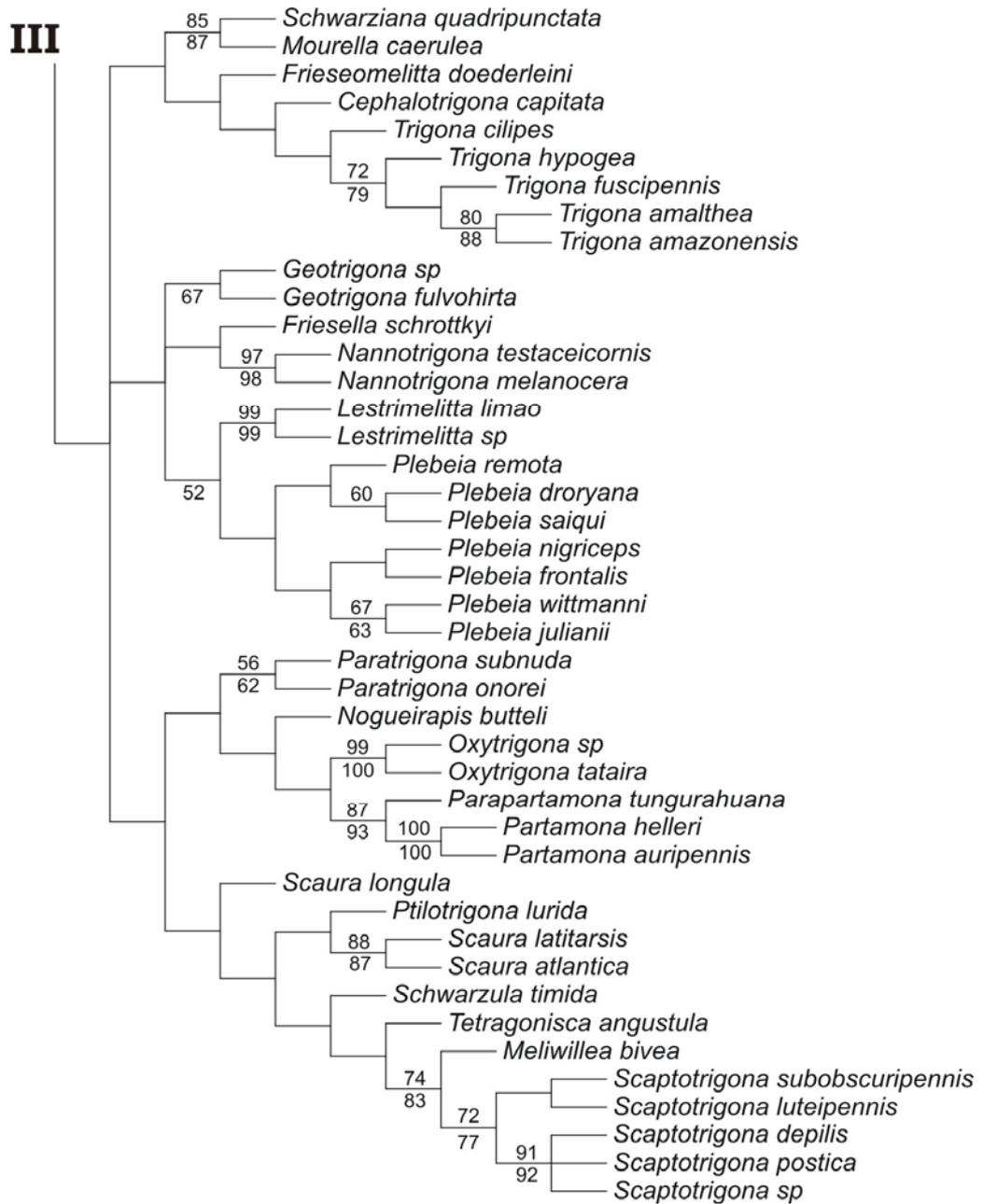
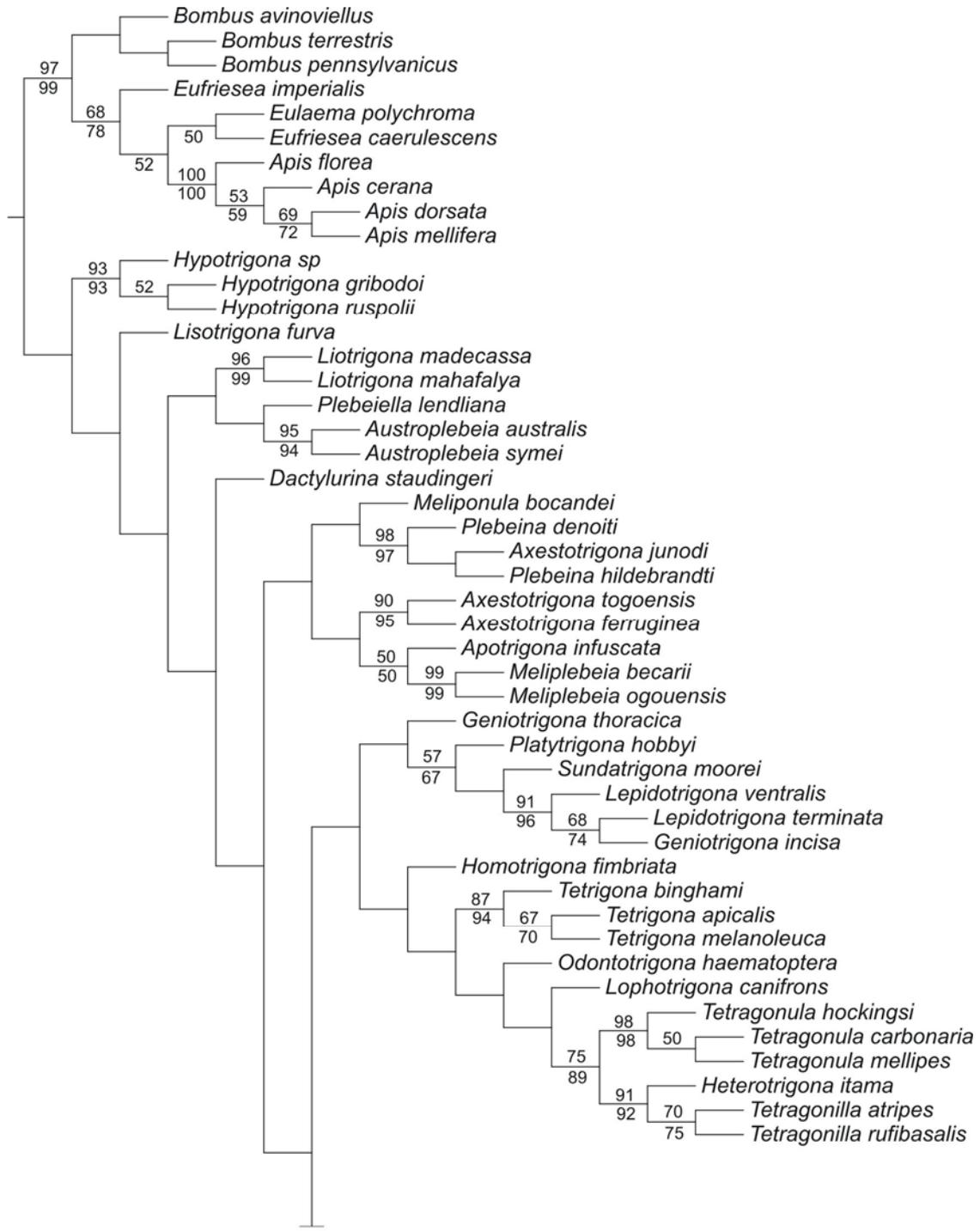


Figura 7 - Continuação.



**Figura 8** - Uma das 590 árvores mais parcimoniosas para o DNAr 16S. Os números acima das linhas correspondem aos valores de *bootstrap* e os abaixo correspondem aos valores de *jackknife*, estão representados os valores maiores que 50%. Comprimento da árvore = 1606; CI = 0,25; RI = 0,57.

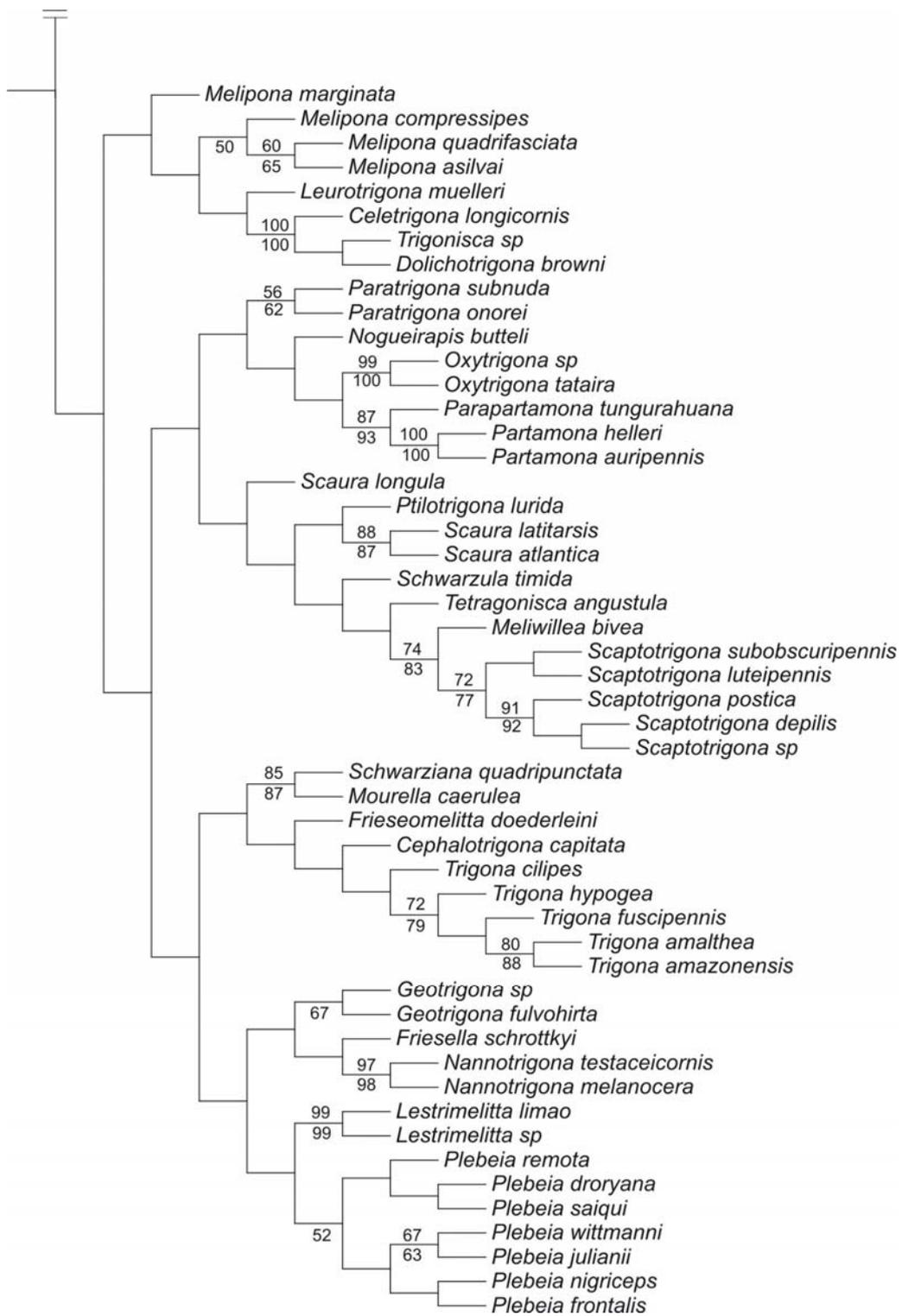
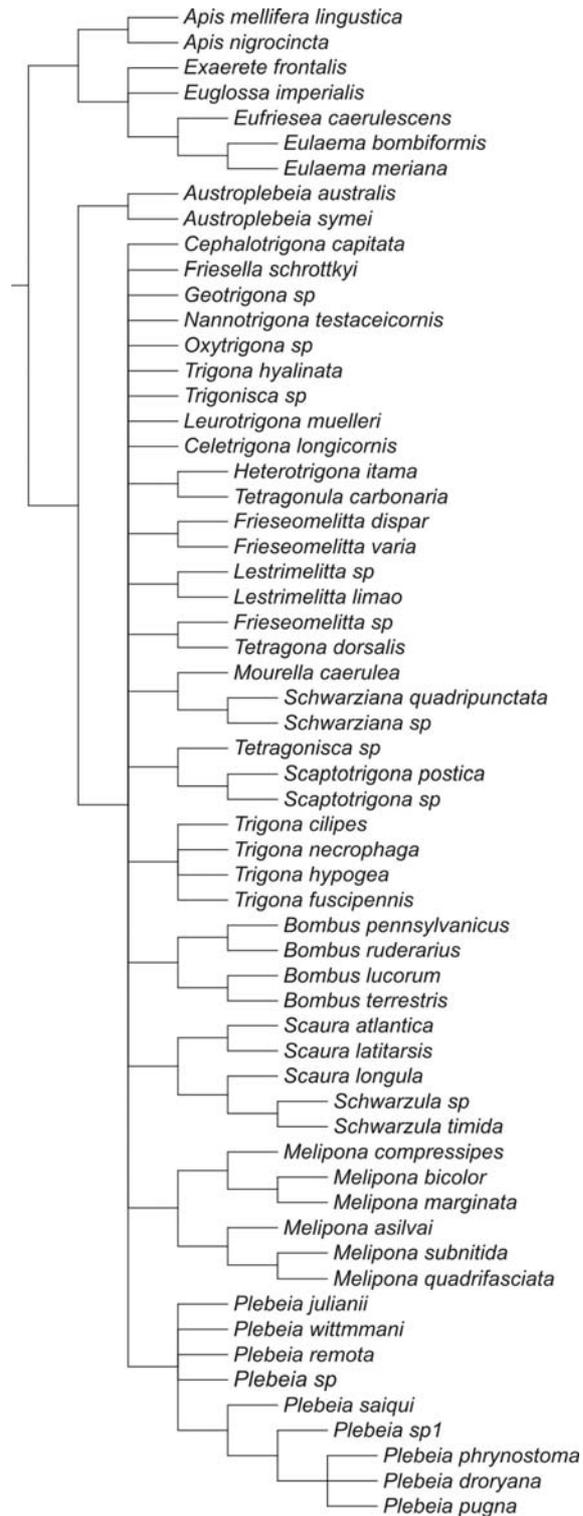


Figura 8 - Continuação.

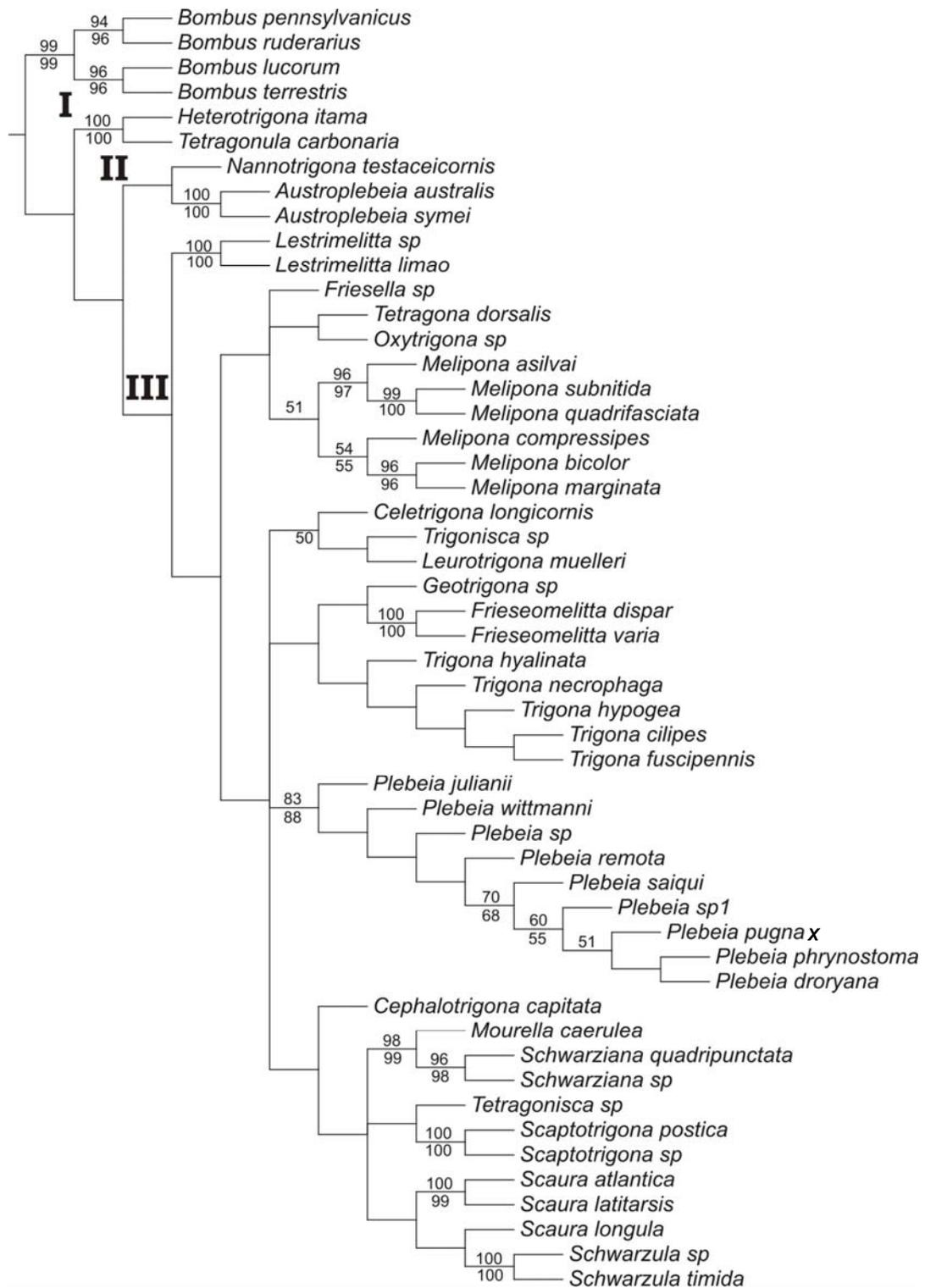
#### 4.3.2. Análise de Máxima Parcimônia com o citocromo b

O alinhamento das seqüências do citocromo b resultou numa matriz com 302 sítios variáveis, sendo 266 deles informativos para parcimônia. A análise filogenética por máxima parcimônia originou seis árvores com comprimento de 1540 passos, com índice de consistência 0,30 e índice de retenção 0,52. Apesar do pequeno número de árvores obtidas, a concordância entre as mesmas não foi grande, pois o consenso estrito resultou em uma árvore com grande número de politomias (Figura 9), além disso, Bombini apareceu inserido em Meliponini, posicionando-se na maioria das vezes na extremidade oposta à de Apini+Euglossini.

Devido à constante inserção de Bombini no clado dos Meliponini e ao alto nível de divergência, acima de 30%, entre as espécies de Apini+ Euglossini e alguns táxons do grupo interno, foi decidida a avaliação da sua eliminação da análise, mantendo apenas Bombini como grupo externo. Com estas exclusões a matriz passou a contar com 52 táxons, apresentando 287 sítios variáveis, com 241 destes informativos para parcimônia. A análise resultou em sete árvores mais parcimoniosas, com comprimento de 1218 passos, índice de consistência de 0,35 e índice de retenção de 0,52. Três clados principais podem ser visualizados na árvore de consenso estrito (Figura 10), o clado I congrega a espécie indomaláia *Heterotrigona itama* e a australiana *Tetragonula carbonaria*; o clado II reuniu as espécies do gênero *Austroplebeia* e *Nannotrigona testaceicornis*, o único representante neotropical que surge fora do clado III, onde estão todos os outros gêneros neotropicais incluídos nesta análise.



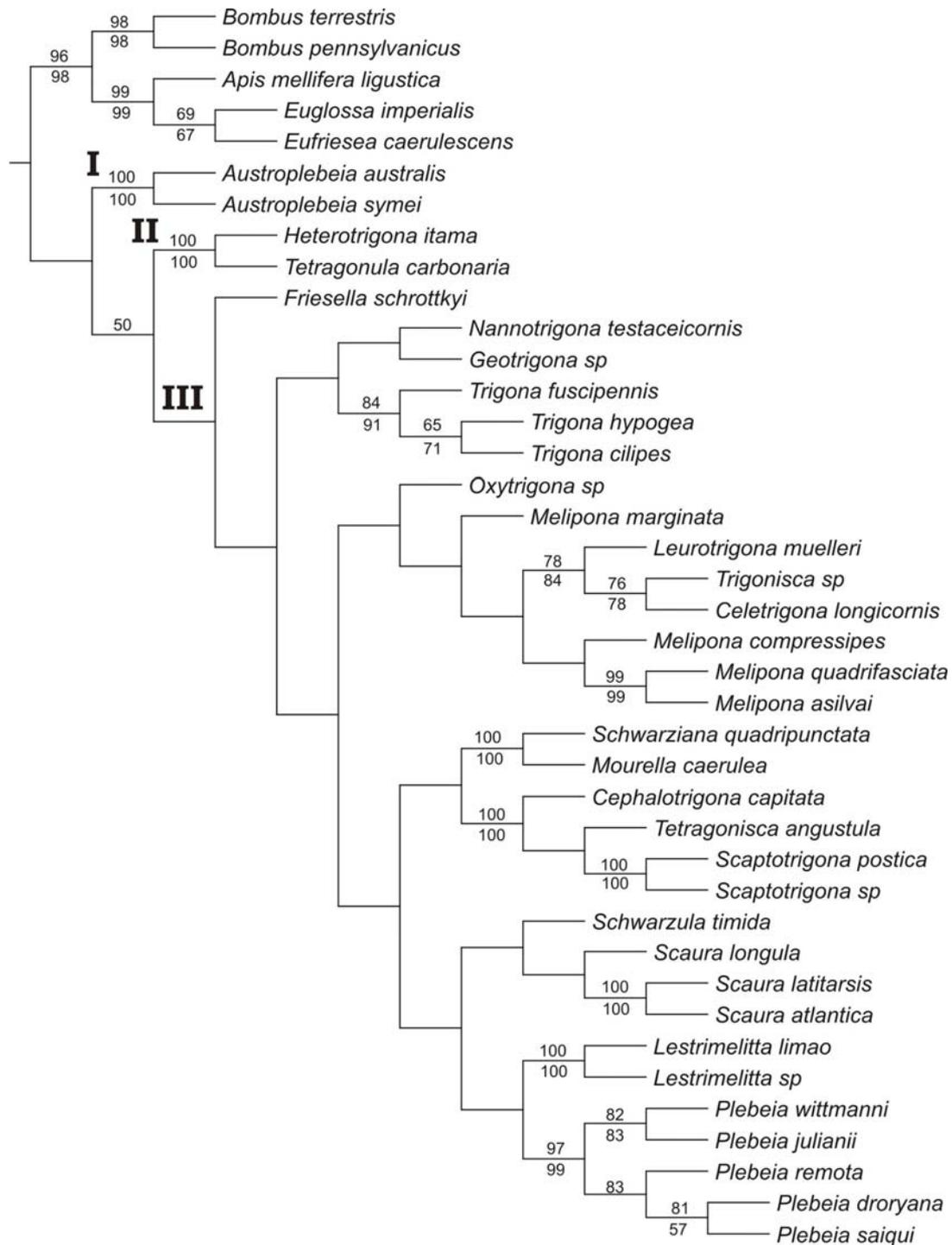
**Figura 9** - Consenso estrito das seis árvores mais parcimoniosas para o citocromo b. Comprimento da árvore = 1396; CI = 0,27; RI = 0,45.



**Figura 10** - Consenso estrito das sete árvores mais parcimoniosas para o citocromo b utilizando Bombini como grupo externo. Os números acima das linhas correspondem aos valores de *bootstrap* e os abaixo correspondem aos valores de *jackknife*, estão representados os valores  $\geq 50\%$ . Comprimento da árvore = 1225; CI = 0,34; RI = 0,52.

### 4.3.3. Análise combinada

A matriz reunindo o DNAr 16S e o citocromo b apresentou 478 sítios variáveis, dos quais 382 foram informativos para parcimônia. A análise de máxima parcimônia realizada no programa Winclada 1.00.08 (Nixon, 2002), resultou em uma única árvore mais parcimoniosa (Figura 11) com comprimento de 1896 passos, com índice de consistência 0,36 e índice de retenção de 0,46. Assim como na análise do 16S, o cladograma apresentou três clados principais para os Meliponini: o clado I apresenta *Austroplebeia* como o grupo irmão dos demais Meliponini, no clado II *Heterotrigona itama* e *Tetragonula carbonaria* surgem como grupo irmão dos Meliponini neotropicais que constituem o clado III, retratando mais uma vez o monofiletismo dos Meliponini neotropicais.



**Figura 11** - Única árvore mais parcimoniosa resultante da análise combinada DNAr 16S + citocromo b. Os números acima das linhas correspondem aos valores de *bootstrap* e os de baixo correspondem aos valores de *jackknife*, só estão representados os valores maiores que 50%. Comprimento da árvore = 1896; CI=0,36; RI = 0,46.

## **5. DISCUSSÃO**

### **5.1. Análise das seqüências de DNA**

#### **5.1.1. Alinhamento do DNAr 16S**

O uso do DNAr 16S têm sido freqüente em trabalhos de filogenia molecular com Hymenoptera, (Cameron e Mardulyn, 2001; Cameron e Williams, 2003; Costa et al., 2003; Chen et al., 2004; Deans et al., 2006; Rasmussen e Cameron, 2007), tendo sido útil em diferentes níveis taxonômicos. A região utilizada para o presente trabalho corresponde à metade 3' do gene (Costa, 1998) e é uma das regiões mais utilizadas do 16S, principalmente por ser mais conservada que a extremidade 5' (Simon et al., 1994).

Uma característica desta região gênica, que se torna evidente no alinhamento apresentado na figura 11 do Apêndice é a presença de blocos extremamente conservados e outros variáveis e também de regiões com incidência de grande quantidade de inserções/deleções. Embora não tenha sido feita a análise estrutural no presente trabalho, este fato, provavelmente, está relacionado à estrutura secundária e terciária do RNAr 16S, bem como à sua interação com as proteínas constituintes do ribossomo mitocondrial (Simon et al., 1994). Na estrutura secundária do 16S há regiões de formação de dupla fita que tendem a apresentar uma maior conservação das seqüências de nucleotídeos e alças que via de regra apresentam maior variação nas seqüências. Regiões do 16S altamente conservadas estão relacionadas com domínios de ancoragem das proteínas ribossomais, de processamento do RNA mensageiro, de ancoragem

dos RNAs transportadores e nas hélices centrais que compõem o núcleo da subunidade ribossomal (Simon et al., 1994).

O nível máximo de divergência encontrado entre os táxons de Meliponini incluídos na matriz 16S A, foi de 19,14%, um valor semelhante ao encontrado por Costa et al (2003), 19%, demonstrando que nenhuma das novas seqüências adicionadas à matriz apresentou grande desvio na composição nucleotídica deste gene, pois a taxa variou em apenas 0,14 pontos percentuais. O alto conteúdo de A+T encontrado na matriz, 81,1%, é muito semelhante ao relatado por Costa et al. (2003) que foi de 81,4%. Este alto conteúdo de AT é, segundo Whitfield e Cameron (1998), reflexo de um desvio composicional fita-específico resultante de uma predominância de transições  $G \rightarrow A$ , provavelmente causadas pela assimetria na capacidade de pareamento das bases nos ramos; todavia Downton e Austin (1997b) afirmam que estas mudanças não estão restritas aos ramos e foram verificadas também nas regiões de alças. Segundo estes autores uma hipótese para explicar esta tendência de enriquecimento por AT, seria a predominância de transições  $G-C \rightarrow A-T$  causadas por danos oxidativos, que gerariam desaminação da desoxicitosina gerando desoxiuracila, que no ciclo seguinte de replicação do DNA mudaria o pareamento da fita complementar, havendo a substituição de guanina por uma adenina. Desvios composicionais na seqüência do DNAr 16S semelhantes aos encontrados no presente estudo, acima de 80%, são relatados por Cameron (1993) entre as abelhas corbiculadas, Downton e Austin (1997b) entre os Apocrita, Belshaw e Donald (1997) entre as vespas da subfamília Aphidiinae e Whitfield e Cameron (1998) na maior parte das superfamílias de Hymenoptera.

A adição das seqüências apresentadas na Tabela 4 à matriz 16S A fez a porcentagem de sítios variáveis aumentar de 53% para 54,4% o que era esperado devido à introdução de materiais na sua maioria africanos, australianos e indo-malaios, que segundo os resultados de Costa et al. (2003) constituem linhagens diferentes e conseqüentemente apresentam maior divergência em relação aos neotropicais, considerados por estes autores um grupo monofilético. O maior valor de divergência entre as espécies de Meliponini foi de 19,38%, entre *Partamona auripennis* e *Geniotrigona incisa*, demonstrando que nenhuma das seqüências

introduzidas apresentou grande divergência entre si ou em relação às já presentes na matriz.

Um fato que chama a atenção nesta matriz ampliada é a redução do conteúdo médio de AT em 0,8%, o que demonstra haver uma maior concentração de GC nas seqüências adicionadas à matriz. Rasmussen e Cameron (2007) encontraram uma proporção média de AT = 75,9% para o 16S; 4,4% menor que a encontrada nesta matriz e 5,2% menor que a da matriz contendo os dados obtidos no presente trabalho associados aos produzidos por Costa et al. (2003). Analisando-se a composição de bases nessa região do genoma de Meliponini, de acordo com a região de ocorrência, nota-se que os neotropicais apresentam um valor médio de AT= 81,7%; os africanos uma média de 79,9%; os indo-malaios de 76,4% e para *Austroplebeia* o único gênero exclusivamente australiano esse valor foi de 81,9%. A diferença no conteúdo de AT entre os neotropicais e indo-malaios chega a 5,3%, diferença visualmente perceptível observando-se algumas regiões do alinhamento presente no Apêndice A. Essa diferença explica a discrepância entre o conteúdo de AT médio encontrado neste trabalho, onde 57% das espécies são neotropicais, região com maior diversidade e 21% de origem indo-malaia, em relação ao trabalho de Rasmussen e Cameron (2007) onde 62% das amostras são de origem indo-malaia, e apenas 19% com origem neotropical. Essa divergência no conteúdo de AT tem implicações evolutivas. De acordo com Downton e Austin (1997b) e Whitfield e Cameron (1998) o conteúdo de AT no DNAr 16S tende a aumentar da base para as extremidades das árvores filogenéticas, sugerindo que o acúmulo de AT continua ocorrendo dentro das linhagens de Hymenoptera. Se essa premissa estiver correta, duas suposições tornar-se-iam possíveis: (i) os neotropicais constituiriam o grupo mais derivado entre os Meliponini, o que seria corroborado com a posição do clado neotropical na proposta filogenética de Costa et al. (2003) e contrariaria a proposta biogeográfica defendida por Michener (2000), que propõe uma origem Gondwânica para o grupo; ou (ii) teria ocorrido uma reversão na tendência ao aumento de AT entre os táxons indo-malaios, contrariando as evidências encontradas por Downton e Austin (1997b) e corroboradas por Whitfield e Cameron (1998). A análise de mais regiões do genoma mitocondrial poderá fornecer um maior entendimento com relação a essa tendência encontrada nos

táxons indo-malaios, esclarecendo se o mesmo ocorre em todo o genoma ou se restringe ao DNAr 16S.

### 5.1.2. Alinhamento do Citocromo b

A utilização do citocromo b para estudos filogenéticos em insetos é relativamente recente (Simmons e Weller, 2001). Em Hymenoptera um dos primeiros trabalhos utilizando este gene foi realizado por Belshaw e Quicke (1997) avaliando a filogenia das vespas parasitas da subfamília Aphidiinae. Nos últimos dez anos uma série de estudos têm utilizado este gene para a reconstrução filogenética em diferentes níveis taxonômicos (Gimeno et al., 1997; Lowe e Crozier, 1997; Koulianos et al., 1999; Koulianos e Schmid-Hempel, 2000; Leys et al., 2000; Cameron e Mardulin, 2001; Simmons e Weller, 2001, Bull et al., 2003).

A matriz resultante do alinhamento construído a partir do material seqüenciado (Tabela 2) e das seqüências obtidas do GenBank (Tabela 5) apresentou 64% dos sítios variáveis, um valor duas vezes superior ao encontrado por Simmons e Weller (2001) entre as tribos de Lepidoptera Ctenuchini e Euchromiini, porém próximo do valor encontrado por Leys et al. (2000), 54,2%, entre abelhas representantes do gênero *Xylocopa*. Segundo Simmons e Weller (2001) os representantes da família Apidae tendem a apresentar uma maior taxa de evolução para o citocromo b que os demais insetos, relacionando este fenômeno à elevada taxa metabólica apresentada pelos membros desta família de Hymenoptera. Este fato explicaria a alta taxa de variação entre os Meliponini, Apini, Bombini e Euglossini. Excluindo-se o grupo externo da matriz, a proporção de sítios variáveis cai para 59,6%, isso significa que 4,4% da variação é introduzida pela presença do grupo externo.

O maior nível de divergência nessa região do genoma entre as espécies de Meliponini foi de 29,55% entre *Tetragonula carbonaria* e *Austroplebeia symei*. *T. carbonaria* apresentou nível de divergência superior a 25% em relação aos demais Meliponini, tendo o menor valor, 25,33%, ocorrido em relação à *Heterotrigona itama*. Esse alto nível de divergência encontrado para *T. carbonaria*, pode ser um reflexo do tempo de história evolutiva independente em relação aos Meliponini neotropicais, que parecem realmente compor um grupo

monofilético, como afirmado por Costa et al. (2003). Comparando-se o nível de divergência do citocromo b com o encontrado para o 16S, que apresenta uma matriz mais representativa dos gêneros de Meliponini, é claramente perceptível a ocorrência de uma taxa de evolução mais alta para o citocromo b, como prevêem Simmons e Weller (2001). Quando os táxons indo-malaios são excluídos, o nível de divergência máximo entre as seqüências cai para 19,53%, um valor ainda superior ao encontrado na matriz completa do 16S contendo representantes africanos, indo-malaios e australianos, comprovando a maior variabilidade da região do citocromo b aqui utilizada. Quando se leva em consideração o grupo externo, estes valores de divergência ultrapassam os 30% em relação às seqüências das espécies de Apini e Euglossini utilizadas, o que gerou alguns problemas para a inferência filogenética, que será discutida posteriormente.

O fragmento analisado apresentou uma taxa média de AT = 80,8%, valor este muito semelhante ao encontrado por Bull et al. (2003), de 80,2% para as abelhas da tribo Allodapini que ocorrem na Austrália. Esse desvio composicional em direção ao acúmulo de AT é uma característica do DNA mitocondrial dos Arthropoda (Simon, et al., 1994) e particularmente dos insetos, aparecendo de forma mais acentuada em Hymenoptera (Simmons e Weller, 2001).

A composição nucleotídica por posição do códon (Apêndice E) mostrou um pronunciado desvio composicional na terceira base, chegando a 97,4% de AT. Valores de AT acima de 93% têm sido encontrados na terceira posição do códon em estudos anteriores com abelhas (Leys et al., 2000; Cameron e Mardulyn, 2001; Bull et al., 2003), o que sugere uma alta taxa de mudança para esta posição podendo haver saturação da mesma (Belshaw e Quicke, 1997, Leys et al., 2000). O fato de o código genético ser degenerado favorece a mudança na terceira base, permitindo o acúmulo de A e T nesta posição, chegando o desvio em alguns casos como em *Austroplebeia australis*, *Frieseomelitta sp*, *Mourella caerulea*, *Plebeia phrynostoma* e *Plebeia saiqui*, a atingir 100%. Apesar da degeneração do código genético, este desvio composicional tende a afetar o uso do códon, tornando os códons ATT (isoleucina), TTA (leucina) e TTT (fenilalanina), os de maior ocorrência entre os Hymenoptera (Simmons e Weller, 2001).

Um fato destacável é a composição nucleotídica da seqüência obtida para *Tetragonula carbonaria*, uma espécie australiana pertencente a um gênero de ocorrência indo-malaia, que se apresentou muito distinta em relação aos demais Meliponini. A proporção de AT encontrada para esta espécie foi de 68,3%; 11,9 pontos percentuais menor que a média de toda a matriz, sendo este aumento de GC também encontrado, de forma bem menos pronunciada, em *Heterotrigona itama* que apresenta valores de AT=76,4%. Nesta matriz, estes são os únicos representantes de táxons ocorrentes na região Indo-Malaia, e a presença de um maior conteúdo GC que nos demais Meliponini parece seguir a mesma tendência encontrada para o DNAr 16S, o que corroboraria as suposições elaboradas na seção sobre o 16S. Contudo, a confirmação disso só será possível com a obtenção de mais seqüências de táxons indo-malaios para o citocromo b e outras regiões do genoma mitocondrial. Os resultados apresentados pela análise da composição nucleotídica da terceira posição dos códons de *T. carbonaria* mostrou um valor que chega a ser 23,7 pontos percentuais menor que a média, todavia parece tratar-se de uma característica da seqüência desta espécie, pois os eletroferogramas produzidos no seqüenciamento não deixam dúvidas quanto à seqüência nucleotídica.

As duas espécies utilizadas do gênero *Partamona*, pertencente à fauna neotropical (*P. cupira* e *P. helleri*), apresentaram a composição de nucleotídeos muito semelhante à dos demais Meliponini, todavia, a organização da sua seqüência mostrou-se divergente. Estas abelhas apresentaram uma inserção/deleção de três nucleotídeos entre o nucleotídeo 27 e 28 do alinhamento presente no Apêndice E, que, quando traduzidos para a seqüência protéica correspondem a uma asparagina extra para o citocromo b destas abelhas. Além deste fato, que parece ser resultado de uma mudança ocorrida na linhagem ancestral destas duas espécies, as suas seqüências são ricas em caracteres autapomórficos que em análises filogenéticas preliminares contribuíram para o seu posicionamento como grupo irmão de todos os demais Meliponini, o que levou à sua exclusão do trabalho.

## 5.2. Análises Filogenéticas

### 5.2.1. Filogenia com base na seqüência parcial do 16S

#### 5.2.1.1. Matriz 16S A

Os resultados encontrados através da análise de Máxima Parcimônia para o conjunto de dados da matriz 16S A são, em sua maior parte, concordantes com os encontrados por Costa et al. (2003). Entre as semelhanças nos resultados dos dois estudos, merece destaque a recuperação do monofiletismo para os Meliponini neotropicais. Fato que contraria as propostas morfológicas de Michener (1990) e Camargo e Pedro (1992a), que mostram entre outras diferenças, disjunções intercontinentais envolvendo gêneros neotropicais.

A árvore de consenso estrito (Figura 6), gerada a partir das duas árvores mais parcimoniosas encontradas na análise, mostra o gênero *Hypotrigona* como grupo irmão dos demais Meliponini (Figura 6 - grupo I), resultado consistente com o encontrado por Costa et al. (2003) com o gene 16S e por Rasmussen e Cameron (2007) com quatro genes, na análise por parcimônia. Michener (1990) afirma que este gênero poderia ser o grupo irmão dos demais Meliponini, apesar disso não ocorrer na sua árvore filogenética, baseado em características morfológicas dos machos, que poderiam ser plesiomórficas. De acordo com Michener (2000), este gênero é distinto e isolado em relação aos demais Meliponini africanos e apresenta estados de caracteres únicos entre os Meliponini. Outra evidência morfológica que pode vir a corroborar a posição basal de *Hypotrigona* no cladograma é a presença do sulco associado à carena supra-alar, ausente em todos os demais Meliponini, mas presente em outros grupos de abelhas (Costa et al., 2003).

O segundo clado (Figura 6 - grupo II) agrupa o gênero australiano *Austroplebeia* aos gêneros africanos e indo-malaios. O posicionamento de *Austroplebeia* neste cladograma reflete relações com táxons africanos, o que é concordante com o que foi proposto por Michener (1990, 2000). Segundo este autor a ocorrência de pêlos abundantes e diminutos, a presença de pequenas cerdas no gonostilo das operárias e a presença de pêlos delgados e pontiagudos

no rastelo, aproximam este gênero dos gêneros africanos. Em contrapartida, Camargo e Pedro (1992a) consideram *Austroplebeia* como um grupo relacionado às formas neotropicais, em particular *Mourella* (Camargo e Wittmann, 1989; Camargo e Pedro 1992b), todavia os resultados obtidos por Rasmussen e Cameron (2007) corroboram a relação de *Austroplebeia* com táxons africanos.

As espécies indo-malaias presentes nesta análise formaram um grupo monofilético, estando inserida neste clado a espécie australiana *Tetragonula carbonaria*, sugerindo a sua origem do estoque indo-malaio do gênero *Tetragonula*, o que é corroborado por Michener (2000), que relaciona *Tetragonula* a outras formas indo-malaias. Diante da pequena representação na presente análise, uma discussão mais aprofundada sobre as relações entre os gêneros indo-malaios será realizada na análise da matriz 16S B. Os gêneros africanos, exceto *Hypotrigona*, surgem como um grupo parafilético, esta configuração parece ser resultado do pequeno número de táxons africanos e indo-malaios utilizados, pois a adição de mais espécies na matriz 16S B resultou em topologias distintas.

O terceiro clado (Figura 6 - grupo III) reúne todas as 24 espécies neotropicais analisadas, reforçando os resultados obtidos por (Costa et al., 2003). A adição de novas espécies mudou sensivelmente a organização dentro deste grupo em relação ao trabalho de Costa et al. (2003), mas alguns dos grupos com valores elevados de suporte por *bootstrap* e *jackknife* foram recuperados na presente análise.

A presença de um clado com suporte elevado de *bootstrap* e *jackknife*, agrupando os gêneros *Schwarziana* e *Mourella*, sugere fortemente o compartilhamento de um ancestral comum para estes dois gêneros. Estes sempre foram considerados como proximamente relacionados à *Plebeia*, Moure (1951) incluiu *Schwarziana* e *Mourella* na sua “linha *Plebeia*”, juntamente com *Austroplebeia* e táxons africanos e indo-malaios, fato que é contrariado pelo monofiletismo dos táxons neotropicais aqui encontrados. Michener (2000) trata *Schwarziana* como subgênero de *Plebeia* e não reconhece o gênero *Mourella*, alocando a única espécie, *M. caerulea*, no gênero *Plebeia* s. str. Como é perceptível Michener (2000) considera *Mourella* diretamente relacionado a *Plebeia* e indiretamente relacionado com *Schwarziana*. Camargo e Wittmann

(1989) propuseram relação direta entre *Mourella* e *Schwarziana*, baseados em caracteres morfológicos apresentados por Moure (1951), porém, a este grupo estes autores associam os gêneros africanos *Meliplebeia*, *Plebeiella* e *Plebeina*. Camargo e Roubik (2005) também encontraram relação direta entre *Mourella* e *Schwarziana* na análise filogenética realizada no seu trabalho, apresentando *Melipona* como grupo irmão. Os resultados obtidos aqui corroboram a hipótese de relação direta entre *Mourella* e *Schwarziana* proposta por Camargo e Wittmann (1989) e Camargo e Roubik (2005), todavia a relação deste par de gêneros com os gêneros africanos, como proposto pelos primeiros, e com *Melipona*, como proposto por Camargo e Roubik (2005), não tem suporte nos resultados obtidos aqui. Outra relação não recuperada aqui é a de *Mourella* + *Schwarziana* com *Plebeia*, apesar de ser praticamente consensual entre os estudiosos do grupo, o que será discutido na parte final da seção Discussão.

A posição divergente de *Melipona marginata* no cladograma é aberrante, por tratar-se de um gênero com diversas sinapomorfias bem definidas e um dos mais distintos morfológicamente entre os Meliponini (Michener 2000). Este deslocamento de *M. marginata* pode ser atribuído ao pequeno número de espécies e caracteres variáveis para o grupo. Apenas um dos trinta sítios informativos para parcimônia presentes entre os membros do clado **A** é sinapomórfico para as *Melipona*. É provável que o aumento qualitativo e quantitativo dos dados possa trazer *M. marginata* para o grupo formado pelas outras três espécies deste gênero aqui incluídas. Apesar da posição anômala de *M. marginata*, o clado composto pelo gênero *Melipona* encontra-se inserido entre os Meliponini neotropicais, o que corrobora os resultados de Costa et al (2003), contrariando a proposta de Michener (1990), que coloca *Melipona* como grupo irmão dos demais Meliponini, baseado em caracteres cuja codificação é questionada por Camargo e Pedro (1992b).

A presença de *Leurotrigona muelleri*, *Trigonisca sp* e *Celetrigona longicornis*, constituindo o clado das abelhas diminutas neotropicais e a posição basal de *Hypotrigona*, é um indicativo do polifiletismo do grupo proposto por Michener (1990). Uma discussão mais aprofundada sobre este grupo será desenvolvida na seção sobre a análise de parcimônia da matriz 16S B.

O agrupamento formado por *Meliwillea* e *Scaptotrigona* constituindo um grupo monofilético, confirmado aqui por valores elevados de *bootstrap* e *jackknife*, também foi encontrado por Costa et al. (2003) em sua filogenia molecular e por Roubik et al. (1997) e Camargo e Roubik (2005), em análises baseadas em caracteres morfológicos. Roubik et al. (1997) afirmam que a relação entre estes gêneros é clara e lista entre outros caracteres morfológicos: (i) a presença de dois pequenos e bem separados dentes mandibulares e (ii) um espaço malar muito longo como sinapomorfias entre *Meliwillea* e *Scaptotrigona*. Michener (2000) aponta como semelhanças entre os dois gêneros a presença de pêlos longos e sinuosos na parte posterior da coxa. A presença de *Tetragonisca* como grupo irmão de *Meliwillea* + *Scaptotrigona* não tem suporte em dados morfológicos, todavia a presente análise apresenta valores elevados de *bootstrap* e *jackknife*, sugerindo uma possível relação evolutiva entre estes gêneros.

Num outro agrupamento, *Lestrimelitta* surge como grupo irmão de *Plebeia*, constituindo um clado monofilético, como obtido por Costa et al. (2003). Camargo e Pedro (1992a) consideram a proximidade entre estes gêneros, apesar de não inferirem relação direta em sua proposta filogenética. Costa et al. (2003) apresentam um caractere morfológico que corroboraria esta relação: a presença de uma estreita e leve depressão na margem posterior da superfície interna da tíbia de *Lestrimelitta*, que se assemelha à apresentada por *Plebeia*, o que segundo Michener (1990) pode ser fruto da derivação a partir de um ancestral comum.

*Ptilotrigona* aparece no cladograma como grupo irmão de *Scaura*, tendo *Scaura longula* se apresentado fora deste clado. A presença de *Ptilotrigona* nesta posição pode estar relacionada à grande similaridade entre a sua seqüência e as de *Scaura*. Quando comparadas entre si, as seqüências destes quatro táxons apresentam apenas cinco sítios informativos para parcimônia, e nenhum deles fornece sinapomorfias que sustentem o monofiletismo de *Scaura*. É provável que o uso de um fragmento maior venha a recuperar o monofiletismo de *Scaura*, pois se trata de um gênero pouco diversificado (Silveira et al., 2002), apresentando apenas quatro espécies, das quais três encontram-se representadas aqui, uma delas *Scaura atlantica* recentemente descrita por Melo e Costa (2004). O agrupamento de *S. latitarsis* com *S. atlantica* corrobora a análise morfológica de

Melo e Costa (2004), que mostra grande semelhança entre estas duas espécies. Embora apenas quatro espécies tenham sido descritas para o gênero *Scaura*, a espécie *S. latitarsis* parece constituir um complexo de espécies com ampla distribuição no Brasil (Melo e Costa, 2004).

*Cephalotrigona* aparece inserida no clado contendo os representantes do gênero *Trigona*, todavia esta configuração não se repete quando mais táxons são incluídos na análise, como será discutido na seção que trata da análise da matriz 16S B. Contudo, fica claro o polifiletismo de *Trigona sensu* Michener. Apesar da pequena representatividade dos gêneros indo-malaios incluídos por Michener (1990, 2000) no gênero *Trigona*, os táxons aqui representados - *Lepidotrigona*, *Tetragonula* e *Heterotrigona* - constituem um clado monofilético distinto do clado Neotropical, como proposto por Costa et al. (2003) e corroborado por Rasmussen e Cameron (2007).

#### **5.2.1.2. Matriz 16S B**

Nesta análise foram incluídos os táxons listados na Tabela 4. A árvore de consenso estrito gerada (Figura 7) apresentou-se politômica para a maior parte dos grupos, porém agrupamentos intergenéricos menores puderam ser recuperados, alguns deles apresentando suporte elevado. Entre os cladogramas recuperados merece destaque o maior de todos (Figura 7 - grupo III), que agrupa diversos gêneros de Meliponini neotropicais, embora *Melipona*, *Leurotrigona* e um clado formado pelas abelhas diminutas neotropicais semelhantes a *Hypotrigona*, apareçam na grande politomia. Esse clado neotropical obtido nesta análise é um indício do monofiletismo do grupo, como proposto por Costa et al (2003).

A posição basal de *Hypotrigona* como grupo irmão dos demais Meliponini (Figura 7 - grupo I e figura 8), se repete neste cladograma, confirmando a análise anterior e o resultado obtido por Costa et al (2003). Mesmo com a inclusão de todos os gêneros africanos (exceto *Cleptotrigona*) e das abelhas diminutas neotropicais *Trigonisca*, *Leurotrigona*, *Dolichotrigona* e *Celetrigona*, supostamente relacionadas com *Hypotrigona* (Michener, 1990), este gênero se mantém isolado dos demais Meliponini, o que pode ser corroborado com base na morfologia, discutida na seção anterior.

A baixa resolução obtida no cladograma de consenso (Figura 7) reunindo todos os táxons africanos, indo-malaios, australianos e os neotropicais, pode ter ocorrido devido à perda de informação desta região, principalmente pelo pequeno comprimento do fragmento em relação ao número de táxons e pela intensificação do “ruído” filogenético (Costa, 1998; Whitfield e Cameron, 1998). Isso pode ter ocorrido pela inclusão de seqüências com composições nucleotídicas divergentes, como discutido anteriormente, intensificando a ocorrência de homoplasias em regiões muito variáveis do gene. Todavia, um dos grupos recuperados (grupo III - Figura 7), mantém agrupados os Meliponini Neotropicais, com exceção dos gêneros citados acima, demonstrando que, para este grupo, o gene mantém o sinal filogenético.

Diante da baixa resolução encontrada no consenso estrito, uma das árvores mais parcimoniosas é representada na figura 8 e a discussão prosseguirá baseada na organização desta árvore.

A adição de mais táxons do “Velho Mundo” resultou no posicionamento de *Austroplebeia* e *Plebeiella* formando um clado, como grupo irmão de *Liotrigona*, resultado semelhante ao encontrado por Rasmussen e Cameron (2007) na análise de parcimônia, com exceção de *Plebeiella*.

Na presente análise a maioria dos táxons africanos formam um grupo monofilético, exceto por *Plebeiella*, *Liotrigona* e *Dactylurina*. De acordo com Camargo e Pedro (1992a, b) os Meliponini africanos apresentam como sinapomorfia o gonóstilo das operárias alargado, apicalmente divergente e coberto por micropilosidade, o que os reuniria num grupo monofilético, com exceção de *Hypotrigona*, que não apresenta este caráter, o que corrobora em parte os resultados aqui obtidos.

O não-agrupamento de todos os gêneros africanos é um indicativo de que a região gênica e o tamanho do fragmento utilizado foi limitante para resolução das relações entre os táxons do “Velho Mundo”. Apesar da utilização de um único fragmento gênico algumas das relações encontradas por Rasmussen e Cameron (2007) com quatro genes são recuperadas em grande parte na presente análise.

O clado que agrupa os táxons indo-malaios, com exceção de *Lisotrigona*, constituiu um grupo monofilético, como encontrado por Rasmussen e Cameron (2007), apresentando aqui algumas modificações de posição.

Dentro do clado neotropical (Figura 8) a maior parte dos grupos encontrados na árvore da figura 6 são recuperados. *Melipona* aparece novamente relacionado ao clado das abelhas diminutas neotropicais aqui adicionado de *Dolichotrigona*, ausente na análise anterior, apresentando uma configuração muito similar à encontrada na figura 6. A recuperação do monofiletismo do grupo das abelhas diminutas neotropicais contraria a proposta de Michener (1990), que relaciona este grupo ao gênero africano *Hypotrigona* baseando-se em caracteres morfológicos. Moure (1951,1961), além destes táxons, reuniu os gêneros indomalaio *Lisotrigona* e *Pariotrigona* na linha *Hypotrigona*, todavia este autor alerta que este agrupamento pode ser fruto de convergência associada à redução de tamanho destas abelhas, o que seria plausível, considerando-se os resultados aqui obtidos.

O clado que agrupa *Celetrigona*, *Trigonisca* e *Dolichotrigona* aparece com valor máximo de suporte de *bootstrap* e *jackknife*, o que sugere fortemente a existência de relações evolutivas dentro deste grupo, o que é reforçado pelo fato de alguns autores reunirem estes táxons no gênero *Trigonisca* (Michener, 1990, 2000; Silveira et al., 2002). Apesar de não apresentar suporte de *bootstrap* e *jackknife* significativos, a presença de *Leurotrigona* como grupo irmão deste clado vem confirmar as suspeitas de Silveira et al. (2002), que levanta a possibilidade deste gênero formar um grupo monofilético como encontrado aqui, corroborando também o monofiletismo proposto por Michener (2000) que reúne as espécies do gênero *Leurotrigona* como espécies do gênero *Trigonisca* citando como sinapomorfia deste grupo o ângulo basal fracamente obtuso da célula marginal associado com a base alargada dessa célula e a venação reduzida das asas.

O clado que na Figura 6 reúne *Paratrigona*, *Partamona* e *Oxytrigona*, aqui aparece acrescido de *Parapartamona* e *Nogueirapis*. *Paratrigona* é considerado por Michener (1990) e Camargo e Pedro (1992a) grupo irmão de *Scaptotrigona* + *Nannotrigona*, ao passo que Roubik et al. (1997) sugere *Paratrigona* + *Nannotrigona* como grupo irmão de *Meliwillea* + *Scaptotrigona*. Nenhum desses agrupamentos, exceto *Meliwillea* + *Scaptotrigona*, é recuperado aqui. Apesar disso a presença de *Paratrigona* no mesmo clado que *Nogueirapis* e *Partamona* está de acordo com a proposta de Camargo e Pedro (1992a) e é parcialmente concordante com os resultados obtidos por Camargo e Roubik (2005), onde

*Partamona* + *Parapartamona* constituem um grupo monofilético tendo *Nogueirapis* como grupo irmão, configuração semelhante à obtida aqui. Todavia, a inserção de *Oxytrigona* neste clado não é corroborada por estudos filogenéticos baseados na morfologia, que colocam este gênero como proximamente relacionado a *Trigona* (Michener 1990, 2000; Camargo e Pedro, 1992a). *Parapartamona* e *Partamona*, formam um clado com suporte elevado de *bootstrap* e *jackknife*, refletindo a estreita relação entre estes dois gêneros proposta por Michener (2000) ao tratar *Parapartamona* como subgênero de *Partamona*.

O clado agrupando *Scaura* e *Ptilotrigona* também aparece no cladograma da figura 8, com uma pequena mudança na posição de *Scaura longula*. A presença de *Ptilotrigona* no clado das *Scaura* pode ter se dado, além da explicação anterior, pela ausência na análise de *Camargoia* e *Tetragona*, que de acordo com Camargo e Pedro (2004) constituem um grupo monofilético, ao qual Michener (2000) trata como o subgênero *Tetragona*, do gênero *Trigona*.

Como na Figura 6, o clado que congrega *Tetragonisca*, *Meliwillea* e *Scaptotrigona* ressurge aqui (Figura 8) com a mesma configuração, exceto por uma pequena modificação na posição de *Scaptotrigona depilis*. Da mesma forma, o clado que agrupa *Schwarziana* e *Mourella* se repete, porém a sua posição no cladograma da figura 8 é distinta da apresentada na Figura 6, o que pode estar associado à limitação desta região em resolver os agrupamentos basais.

Outro clado que se repete nesta análise é o que agrupa *Cephalotrigona* com *Trigona*, aqui, diferentemente do agrupamento da Figura 6, *Trigona* aparece como um grupo monofilético tendo *Cephalotrigona* como seu grupo irmão. Moure (1951) considera *Cephalotrigona* como proximamente relacionado a *Trigona*. Na árvore filogenética obtida por Michener (1990) estes gêneros aparecem no mesmo clado. Camargo e Pedro (1992a) colocam *Cephalotrigona* num clado que tem *Trigona* como grupo irmão e Michener (2000) chega a considerar a possibilidade da inclusão de *Cephalotrigona* como subgênero de *Trigona*. Esta relação estreita entre estes gêneros com base em caracteres morfológicos corrobora a relação aqui recuperada pelo DNAr 16S.

Um dos cladogramas presentes na figura 8 agrupa os gêneros *Geotrigona*, *Friesella* e *Nannotrigona*, a reunião destes táxons não tem suporte na morfologia. É provável que o pequeno número de caracteres informativos para a análise por

parcimônia e o pequeno comprimento do fragmento utilizado tenham levado a este resultado.

A reunião de *Plebeia* e *Lestrimelitta* se repete com a mesma configuração encontrada na Figura 6, exceto pela adição de *Plebeia frontalis*, o que reforça o resultado previamente obtido.

Apesar dos índices de consistência encontrados para as árvores resultantes da análise do 16S apresentaram valores baixos, esta região gênica foi útil na recuperação das relações entre os gêneros de Meliponini, principalmente dentro do grupo neotropical e indo-malaio, porém não possui sinal filogenético suficiente para a recuperação das relações mais basais.

### **5.2.2. Filogenia com base na seqüência parcial do citocromo b**

Os resultados obtidos a partir da matriz completa do citocromo b (Apêndice B) através da análise de Máxima Parcimônia, não foram conclusivos. A árvore de consenso estrito (Figura 9), gerada a partir das seis árvores mais parcimoniosas encontradas na análise, mostra-se politômica, recuperando apenas as relações em nível intragenérico. Um problema adicional desta árvore é a inserção do clado formado pelo gênero *Bombus*, que foi incluído na análise como parte do grupo externo, entre os integrantes da tribo Meliponini. Assim, diante deste resultado e dos resultados obtidos na análise de divergência entre as seqüências decidiu-se pela exclusão de Apini e Euglossini do grupo externo, pois os representantes destas duas tribos de abelhas corbiculadas apresentaram valores de divergência superiores a 30% o que, segundo alguns autores (Russo et al., 1996), pode resultar em árvores filogenéticas que não refletem a história evolutiva do grupo, devido à saturação por substituições. Além disso, *Bombus* é considerado grupo irmão de Meliponini por uma série de estudos baseados em dados moleculares (Cameron, 1993; Koulilianus, 1999; Cameron e Mardulyn, 2001), o que justifica sua manutenção como grupo externo.

A árvore de consenso estrito resultante das sete árvores mais parcimoniosas obtidas a partir da análise (Figura 10), tendo apenas Bombini como grupo externo, mostra *Heterotrigona* e *Tetragonula* como o grupo irmão dos demais Meliponini (Figura 10 - grupo I) adicionados a esta análise. Todavia, é

importante ressaltar que não há representantes africanos nesta análise devido à baixa qualidade das seqüências de *Hypotrigona* sp., *Plebeina denoiti* e *Axestotrigona junodi* únicos espécimes africanos disponíveis na coleção. Michener (1990, 2000) sinonimiza *Tetragonula* ao subgênero de *Trigona* *Heterotrigona*, alegando a não existência de diferenças morfológicas suficientes que justifiquem a elevação destes táxons ao nível de subgênero, o que corrobora a estreita relação entre estes dois táxons na presente análise e nas análises anteriores com as matrizes do 16S. Assim, mais uma vez, os representantes de *Trigona sensu* Michener aparecem como um grupo polifilético, como encontrado para o 16S no presente trabalho e previamente relatado por Costa et al. (2003) e recentemente corroborado por Rasmussen e Cameron (2007).

*Austroplebeia* aparece num clado com *Nannotrigona* (Figura 10 - grupo II), o único gênero neotropical que surge fora do clado que reúne os demais táxons neotropicais. Esta posição de *Nannotrigona* parece ser fruto do alto nível de variação deste gene, principalmente na terceira posição do códon, pois não há nenhum caráter morfológico que corrobore este agrupamento. Um outro fator que pode estar favorecendo este agrupamento é a ausência de táxons africanos e o pequeno número de táxons indo-malaios na análise.

De maneira semelhante ao que ocorreu com as análises com o 16S, aqui um grande clado contendo os gêneros neotropicais é recuperado (Figura 10 - grupo III). Apesar da baixa representatividade dos táxons indo-malaios e ausência de representantes africanos, a recuperação deste clado corrobora o monofiletismo dos gêneros neotropicais, pois uma das principais disjunções entre os Meliponini é a encontrada em *Trigona sensu* Michener que está representado nesta análise pelos táxons indo-malaios *Heterotrigona* e *Tetragonula* e pelos táxons neotropicais *Frieseomelitta*, *Geotrigona*, *Tetragona*, *Tetragonisca* e *Trigona s. str.* Na presente análise, nem mesmo os representantes neotropicais de *Trigona sensu* Michener, se apresentam monofiléticos.

O gênero *Melipona* surge constituindo um clado monofilético e, diferentemente do que ocorre com o 16S, *M. marginata* aparece dentro deste clado. Novamente, contrariando a proposta de Michener (1990) *Melipona* surge inserida no clado neotropical, como encontrado com as análises do 16S no presente trabalho e por Costa et al. (2003). O gênero *Melipona* é subdividido por

Moure (1992) em quatro subgêneros: *Eomelipona*, *Michemelia*, *Melipona s. str.* e *Melikerria*, na análise utilizando o citocromo b, apenas o subgênero *Michemelia* não está representado. Os resultados das relações entre as espécies de *Melipona* apontam para o polifiletismo do subgênero *Eomelipona*, representado aqui por *M. asilvai*, *M. bicolor* e *M. marginata*. Na árvore representada na figura 10 *M. asilvai* aparece como grupo irmão do clado formado por *M. subnitida* e *M. quadrifasciata*, ambas pertencentes ao subgênero *Melipona s. str.*, com valores elevados de suporte por *bootstrap* e *jackknife*, o que sugere uma relação evolutiva entre as três espécies. *M. bicolor* e *M. marginata*, também pertencentes ao subgênero *Eomelipona*, formam um clado com alto suporte de *bootstrap* e *jackknife*, que tem como grupo irmão *M. compressipes*, pertencente ao subgênero *Melikerria*, o que resulta no polifiletismo de *Eomelipona*. Este resultado corrobora a suspeita levantada por Silveira et al. (2002), que afirmam que *Eomelipona* não parece constituir um grupo monofilético, pois os caracteres morfológicos levantados por Moure (1992) parecem tratar-se de simplesiomorfias. Fernandes-Salomão (2005) realizaram um estudo filogenético com *Melipona* baseado nas seqüências do ITS-1, neste trabalho os autores corroboram a hipótese de Moure (1992), todavia apenas oito espécies foram incluídas e *M. asilvai* não se encontrava entre elas. Apesar do pequeno número de espécies de *Melipona* aqui utilizadas, apenas seis, as relações com valores altos de suporte por *bootstrap* e *jackknife* entre espécies de *Melipona s. str.* e *Eomelipona* parece ser um forte indício do polifiletismo deste último subgênero. Entretanto um estudo mais aprofundado utilizando mais representantes dos subgêneros poderá obter um resultado definitivo a respeito destas relações. O citocromo b parece apresentar um nível de variação adequado para estudos dentro deste grupo.

Como nas análises baseadas no DNAr 16S, um clado contendo os representantes das abelhas diminutas neotropicais também é recuperado aqui. Apesar de uma mudança na relação entre os táxons, a recuperação destes grupos em análises independentes utilizando regiões gênicas distintas pode ser mais um indício de que se trata realmente de um grupo monofilético.

Um dos cladogramas traz reunidos como um grupo monofilético os gêneros *Geotrigona*, *Frieseomelitta* e *Trigona*. A aproximação de *Frieseomelitta* e *Trigona* encontrada aqui, também é observada na análise com o 16S (figura 8). Michener

(2000) trata *Frieseomelitta* e *Geotrigona* como subgêneros de *Trigona*. Na presente análise estes constituem o grupo irmão de *Trigona s. str.*

O gênero *Plebeia* aparece na análise como um grupo monofilético distinto, pois esta região gênica não teve a capacidade de recuperar as relações deste clado com os demais, fato que ocorre também com outros agrupamentos genéricos.

O último clado presente na árvore (Figura 10) traz *Cephalotrigona* como o grupo irmão dos demais táxons constituintes deste agrupamento. Nesta análise este gênero não se aproxima de *Trigona* do qual é considerado proximamente relacionado (Moure, 1951, 1961; Michener, 1990, 2000; Camargo e Pedro 1992a). *Mourella* e *Schwarziana* novamente surgem associados num mesmo clado monofilético com valores de suporte elevado, o que reforça a existência de uma relação evolutiva entre estes táxons, já discutida na seção sobre as análise do 16S. *Tetragonisca* e *Scaptotrigona* cuja proximidade, como discutido anteriormente, não apresenta suporte morfológico surge em análises com base em genes diferentes, o que levanta questionamento sobre a existência de relações estreitas entre estes táxons. O aparecimento de *Scaura* associado a *Schwarzula* é relatado nos estudos baseados em caracteres morfológicos (Moure, 1951; Michener 1990, 2000; Camargo e Pedro, 1992a; Silveira et al., 2002), o que corrobora o agrupamento aqui encontrado, apesar de *Scaura* não aparecer como um grupo monofilético. Este grupo será discutido na seção que trata da análise combinada.

Uma análise adicional foi realizada, excluindo-se a terceira posição do códon, a fim de obter-se uma melhor resolução das relações entre os agrupamentos genéricos, todavia este tratamento resultou em uma árvore abundante em politomias, semelhante à da figura 9, apesar da recuperação de alguns agrupamentos genéricos. Isto, provavelmente, foi gerado pelo pequeno tamanho dos fragmentos resultantes da exclusão da terceira base do códon, o que fez a matriz perder 157 caracteres, restando apenas 316. Apesar do acentuado desvio composicional na terceira base do códon, a exclusão dos nucleotídeos desta posição levou à perda de informação filogenética importante para a resolução da árvore, como constatado por Källersjö et al. (1996).

A região do citocromo b utilizada neste trabalho apresentou um alto nível de variação, maior que a encontrada para o 16S, apesar disso este gene mostrou-se útil, principalmente na resolução de alguns agrupamentos intragenéricos, como para *Melipona*. Este fragmento mostrou-se inadequado para resolver os agrupamentos mais basais, sendo mais indicado para estudos filogenéticos em nível intragenérico ou intergenérico, quando os gêneros envolvidos forem proximamente relacionados. Apesar disso, este gene pode ser útil nas resoluções dos clados mais derivados em análises combinadas de diferentes fragmentos gênicos.

### 5.2.3. Análise combinada DNAr 16S + citocromo b

A análise combinada de diferentes fragmentos gênicos tem sido usada com sucesso em estudos dentro da ordem Hymenoptera, melhorando a resolução dos cladogramas resultantes das análises moleculares quando comparadas com as obtidas por uma região gênica isoladamente (Leys et al., 2000; Koulianus e Schmid-Hempel; Cameron e Mardulyn, 2001; Bull et al., 2003; Chen et al., 2004; Rasmussen e Cameron, 2007).

Uma única árvore mais parcimoniosa foi obtida através da análise da matriz que reúne as seqüências parciais do 16S e do citocromo b (Figura 11).

Nesta árvore *Austroplebeia* surge como o grupo irmão dos demais táxons de Meliponini aqui incluídos o que se assemelha ao obtido por Costa et al. (2003). Devido ao fato descrito na seção que trata da análise do citocromo b, espécies africanas não puderam ser incluídas nesta análise. Como encontrado nas análises do 16S (Figura 6) e do citocromo b (Figura 10), *Heterotrigona* e *Tetragonula* aparecem agrupadas no mesmo clado. Contudo, devido à pequena amostragem de material do "Velho Mundo" nesta análise, a discussão desta árvore será enfocada nos táxons neotropicais.

O clado que agrupa *Nannotrigona*, *Geotrigona* e *Trigona* surge como grupo irmão dos demais Meliponini neotropicais. A posição do gênero *Nannotrigona* foi variável nas análises anteriores, o que parece indicar que as regiões gênicas utilizadas não foram informativas para a resolução das relações com este gênero. Propostas filogenéticas baseadas em dados morfológicos colocam *Nannotrigona*

como grupo irmão de *Scaptotrigona* (Michener, 1990; Camargo e Pedro, 1992a). Roubik et al. (1997) colocam *Nannotrigona* como grupo irmão de *Meliwillea* + *Scaptotrigona* com base em sinapomorfias consideradas fortes, resultado semelhante ao encontrado por Camargo e Roubik (2005). Michener (2000) afirma não ter dúvidas quanto à relação deste gênero com *Scaptotrigona*. Uma análise com mais regiões gênicas ou fragmentos maiores dos genes aqui utilizados podem vir a estabelecer melhor as relações com este gênero.

O aparecimento de *Geotrigona* num clado que constitui o grupo irmão de *Trigona* está de acordo com estudos baseados na morfologia. Moure (1951) trata *Geotrigona* como subgênero de *Trigona* e faz menção à forma do abdome como um caráter que aproxima estes gêneros, posição semelhante é adotada por Michener (1990, 2000), que cita a semelhança superficial deste gênero com *Trigona*. O gênero *Trigona* surge como um grupo monofilético com valores elevados de suporte por *bootstrap* e *jackknife*. Michener (2000) cita alguns caracteres que distinguem este gênero, um deles é o labro, que apresenta o ápice projetado num ângulo diferente dos demais Meliponini; além da presença de uma área sedosa na face interna do basitarso posterior de machos e operárias, reforçando o resultado aqui obtido.

Em nenhuma das análises realizadas aqui, *Trigona sensu* Michener foi recuperado como um grupo monofilético, o que corrobora os resultados encontrados por Costa et al. (2003) e Rasmussen e Cameron (2007).

Como nas análises do 16S, *Melipona* surge como grupo irmão das abelhas diminutas neotropicais. Não há caracteres morfológicos que sustentem essa reunião, podendo a mesma ser fruto de uma maior contribuição das seqüências do 16S para o posicionamento destes táxons nesta análise conjunta. Como pôde ser visto, este gene parece não ser adequado para a recuperação das relações interespecíficas, vide a posição de *M. marginata* (Figuras 5 e 7), nem as relações de *Melipona* com os demais gêneros de Meliponini. Todavia a adição de mais espécies deste gênero na análise far-se-ia necessária para uma conclusão definitiva quanto à utilidade desta região gênica. Apesar de sua relação com os demais gêneros neotropicais não estar bem definida nas análises realizadas aqui, o clado formado por *Leurotrigona*, *Trigonisca* e *Celetrigona* repete-se na análise conjunta, como em todas as análises anteriores, o que torna pertinente a

afirmação de que se trata de um grupo monofilético como discutido anteriormente. Porém, aqui foi a primeira vez em que o agrupamento de *Leurotrigona*, com *Trigonisca sensu* Silveira et al. (2002) apresentou valores elevados de *bootstrap* e *jackknife*, o que parece estar relacionado com o aumento de resolução resultante da união de dois fragmentos gênicos e o conseqüente aumento da quantidade de dados para a análise.

Como ocorreu com o agrupamento de *Leurotrigona*, *Trigonisca* e *Celetrigona*, o clado formado por *Mourella* e *Schwarziana* aparece, como em todas as análises anteriores, com valores elevados de *bootstrap* e *jackknife* o que permite a afirmação de que estes táxons realmente compartilham um ancestral comum, como discutido na seção sobre a análise da matriz do 16S B. Em nenhuma das análises realizadas *Mourella* + *Schwarziana* apresentaram relação direta com *Plebeia* como proposto por Moure (1951, 1961), Camargo e Wittmann (1989), Michener (1990, 2000) e Camargo e Pedro (1992a,b). Isso pode ser reflexo da limitação destas regiões gênicas em recuperar agrupamentos mais basais, ou das sinapomorfias morfológicas levantadas serem fruto de convergência. Esta última afirmativa torna-se plausível, pois Camargo e Roubik (2005) não encontraram relação direta entre estes gêneros e *Plebeia* na sua proposta filogenética baseada em dados morfológicos.

Fato semelhante ocorre com a única espécie de *Friesella*, que é considerado por Michener (2000) como pertencente ao gênero *Plebeia*, mas que não é recuperada em nenhuma das análises realizadas aqui.

A posição de *Cephalotrigona* como grupo irmão do clado que agrupa *Tetragonisca* e *Scaptotrigona* não tem suporte nos estudos morfológicos. Talvez a introdução de gêneros como *Meliwillea* na análise possa modificar a posição de *Cephalotrigona*, que nas análises com o 16S surge como grupo proximalmente relacionado com *Trigona*, como é corroborado pelos estudos com base nos caracteres morfológicos (Moure, 1951; Michener, 1990, 2000; Camargo e Pedro, 1992a). O clado que reúne *Tetragonisca* e *Scaptotrigona* é mais um dos clados que se repetem em todas as análises, tendo este agrupamento já sido discutido anteriormente.

O último clado da árvore agrupa os gêneros *Schwarzula*, *Scaura*, *Lestrimelitta* e *Plebeia*. Nesta análise *Scaura* surge como um grupo monofilético, como era esperado por tratar-se de um gênero pouco diversificado (Silveira et al., 2002). A recuperação do monofiletismo do grupo nesta análise parece estar associado ao aumento do tamanho do fragmento analisado, o que pode ter permitido o surgimento de mais sítios informativos para a análise de parcimônia. O agrupamento de *Schwarzula* com *Scaura* corrobora a suposição de Silveira et al. (2002) sobre a estreita relação entre estes táxons. Michener (2000) agrupa a única espécie de *Schwarzula* como pertencente ao subgênero *Scaura*, subordinado ao gênero *Plebeia*, o que reforça o agrupamento aqui encontrado. Apesar de agrupar estes táxons no subgênero *Scaura* este autor destaca que *Schwarzula* apresenta plesiomorfias, como a presença de dois dentículos na parte superior da margem apical mandibular e o basitarso posterior menos expandido, o que justifica o surgimento deste táxon como grupo irmão de *Scaura* na árvore representada na figura 11. O agrupamento de *Lestrimelitta* e *Plebeia*, assim como outros encontrados na figura 11, surge em todas as análises realizadas no presente trabalho e já foi discutido.

Um fato que merece destaque neste agrupamento é a reunião de táxons considerados proximamente relacionados como *Scaura*, *Schwarzula* e *Plebeia*. Moure (1951) agrupava estes táxons, além de outros, na linha *Plebeia*, Michener (1990, 2000) agrupa *Scaura* e *Plebeia s. str.* como subgêneros de *Plebeia*, sinonimizando *Schwarzula* a *Scaura*, o que confirma o agrupamento encontrado aqui. Contudo outros táxons incluídos no gênero *Plebeia* por este autor, como *Friesella* e *Mourella* tratados como *Plebeia s. str.* e *Schwarziana* colocado como subgênero de *Plebeia*, não se agruparam aqui o que pode ser um indício do polifiletismo de *Plebeia sensu* Michener. A presença de *Lestrimelitta* estreitamente relacionada com *Plebeia s. str.* não é cogitada por Michener (2000), mas parece evidente a existência de relações evolutivas dentro deste grupo.

A análise combinada dos fragmentos gênicos permitiu, apesar do menor número de táxons incluídos, a recuperação de diversos agrupamentos que apresentam suporte nos estudos morfológicos, o que demonstra o aumento do poder de resolução na análise combinada de diferentes regiões do genoma. Este aumento de resolução torna-se evidente ao observar-se a recuperação destes

mesmos grupos com suporte elevado de *bootstrap* e *jackknife*, que reforçam a assunção destes agrupamentos como reflexo da história evolutiva dos táxons. Apesar disso, os agrupamentos mais basais não puderam ser recuperados, o que parece ser reflexo da influência do ruído causado pela saturação destas regiões por homoplasias, como descreveram Whitfield e Cameron (1998) para o 16S e Bull et al (2003) para o citocromo b.

Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam que as linhas filéticas propostas por Moure (1951) não constituem agrupamentos naturais, pois se tratam de grupos polifiléticos, não tendo sido recuperadas nenhuma das disjunções intercontinentais propostas por este autor o que é concordante com os resultados obtidos por Costa et al. (2003) e Rasmussen e Cameron (2007). O mesmo ocorrendo com as disjunções propostas por Michener (1990) e Camargo e Pedro (1992a). Todas estas propostas são contrastadas com o monofiletismo dos táxons neotropicais recuperado no presente trabalho, como proposto por Costa et al. (2003).

Até o momento, todas as propostas biogeográficas foram elaboradas baseando-se na premissa de que as disjunções intercontinentais encontradas entre os Meliponini refletissem a história evolutiva do grupo, todavia os resultados aqui encontrados, que concordam com os obtidos por Costa et al. (2003) e Rasmussen e Cameron (2007), geram uma profunda modificação das relações entre os gêneros desta tribo, o que faz necessária a elaboração de uma nova proposta biogeográfica.

## 6. CONCLUSÕES

Os dados moleculares utilizados apresentaram informação filogenética para a recuperação das relações dos principais grupos dentro de Meliponini.

Com base nos resultados obtidos nas análises com o DNAr 16S e na análise combinada, foi confirmado o monofiletismo dos Meliponini neotropicais.

A região do citocromo b aqui utilizada mostrou-se inadequada para resolver os agrupamentos mais basais, sendo mais indicado para estudos filogenéticos em nível intragenérico ou intergenérico quando, os gêneros envolvidos forem proximamente relacionados.

Apesar do pequeno número de espécies de *Melipona* aqui utilizadas, a análise do citocromo b permite sugerir o polifiletismo de *Eomelipona*, levantando a questão sobre a validade de determinados grupos propostos com base em dados morfológicos.

Os resultados das diferentes análises realizadas no presente trabalho não corroboram hipóteses anteriores que postulam a existência de disjunções intercontinentais como *Trigona sensu* Michener e das abelhas diminutas neotropicais semelhantes a *Hypotrigona*, que constituem um grupo monofilético neste trabalho.

A análise combinada dos genes permitiu um aumento da resolução da árvore filogenética e do suporte de parte dos ramos.

*Scaura* e *Schwarzula* constituem um grupo monofilético. Foi também confirmada a relação de grupo irmão entre *Scaura latitarsis* e *Scaura atlantica* como mostram os dados morfológicos.

A aproximação de *Scaura* e *Plebeia* foi confirmada conforme sugerido por análises morfológicas, porém *Schwarziana* e *Mourella* constituem um grupo monofilético não diretamente relacionado a *Plebeia* contrariando as propostas morfológicas anteriores.

Os resultados aqui obtidos não corroboram as propostas biogeográficas vigentes, nem a classificação adotada por alguns taxonomistas. Investigações mais aprofundadas sobre as relações recuperadas na presente análise se fazem necessárias principalmente no que se refere a estudos moleculares intragenéricos, muito escassos para os Meliponini.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular Biology of the Cell**. 4<sup>th</sup> Ed. New York and London: Garland Science Publishing. 2002.

ARIAS, M. C.; BRITO, R. M.; FRANCISCO, F. O.; MORETTO G.; DE OLIVEIRA, F. F.; SILVESTRE, D.; SHEPPARD, W. S. Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. **Apidologie**. v.37, n.2, p. 259-274. 2006.

ARIAS, M. C.; SHEPPARD, W. S. Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.40, n.1, p. 315-315. 2006.

BELSHAW, R.; QUICKE, D. L. J. A molecular phylogeny of the aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.7, n.3, p. 281-293. 1997.

BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**. v.27, n.8, p. 1767-1780. 1999.

BRITO, R. M.; ARIAS, M. C.. Mitochondrial DNA characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by PCR+RFLP and sequencing. **Apidologie**. v.36, n.3, p. 431-437. 2005.

BROWN, J. H.; LOMOLINO, M. V. **Biogeography**. 2<sup>th</sup> Ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1998.

BULL, N. J.; SCHWARZ, M. P.; COOPER, S. J. B.. Phylogenetic divergence of the Australian allodapine bees (Hymenoptera : Apidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.27, n.2, p. 212-222. 2003.

CAMARGO J. M. F.; WITTMANN, E. D. Nest architecture and distribution of the primitive stingless bee, *Mourella caerulea* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) Evidence of origin of *Plebeia* (s. lat.) on the Gondwana Continent. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**. v.24, p. 213-229. 1989.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Sistemática de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): sobre a polaridade e significado de alguns caracteres morfológicos. In: Cruz-Landim C., Chaud-Netto J. (Eds.), **Anais do Encontro Brasileiro de Biologia de Abelhas e outros Insetos Sociais**. São Paulo: Ed. UNESP, 1992a. p. 45–49.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini review. **Apidologie**. v.23 p.293–314. 1992b.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini neotropicais: o gênero *Ptilotrigona* Moure (Hymenoptera, Apidae, Apinae). **Revista Brasileira de Entomologia**. v.48, n.3, p.353-377. 2004.

CAMARGO, J. M. F.; ROUBIK, D. W. Neotropical Meliponini: *Paratrigonoides mayri*, new genus and species from western Colombia (Hymenoptera, Apidae, Apinae) and phylogeny of related genera. **Zootaxa**. v.1081, p.33-45. 2005.

CAMERON, S. A. Multiple Origins of Advanced Eusociality in Bees Inferred from Mitochondrial-DNA Sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.90, n.18, p. 8687-8691. 1993.

CAMERON, S. A.; MARDULYN. P. Multiple molecular data sets suggest independent origins of highly eusocial behavior in bees (Hymenoptera : Apinae). **Systematic Biology**. v.50, n.2, p. 194-214. 2001.

CAMERON, S. A.; WILLIAMS. P. H. Phylogeny of bumble bees in the New World subgenus *Fervidobombus* (Hymenoptera : Apidae): congruence of molecular and morphological data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.28, n.3, p. 552-563. 2003.

CHEN, Y.; HU, X. A. I; FU, J. Z.; HUANG, D. W. A molecular phylogeny of eurytomid wasps inferred from DNA sequence data of 28S, 18S, 16S, and COI genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.31, n.1, p. 300-307. 2004.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I.; VENTURIERI, G. C.; EARDLEY, C.; NOGUEIRA-NETO, P.. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**. v.37, n.2, p. 275-292. 2006.

COSTA, M. A. **Sistemática molecular de Meliponini S. L. (Hymenoptera, Apidae, Apinae) inferida com base em seqüências do gene ribossomal 16S e estudo das relações filogenéticas entre espécies do gênero *Plebeia* por meio da análise de caracteres isoenzimáticos e citogenéticos.** 1998. 90f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 1998.

COSTA, M. A.; DEL LAMA, M. A.; MELO, G. A. R. e W. S. SHEPPARD. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. **Apidologie**. v.34, n.1, p. 73-84. 2003.

CROZIER, R. H. & Y. C. CROZIER. The Cytochrome-B and Atpase Genes of Honeybee Mitochondrial-DNA. **Molecular Biology and Evolution**, v.9, n.3, p. 474-482. 1992.

DANFORTH, B. N.; SAUQUET, H.; PACKER. L. Phylogeny of the bee genus *Halictus* (Hymenoptera : Halictidae) based on parsimony and likelihood analyses of nuclear EF-1 alpha sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.13, n.3, p. 605-618. 1999.

DEANS, A. R.; GILLESPIE, J. J; YODER, M. J. An evaluation of ensign wasp classification (Hymenoptera : Evaniidae) based on molecular data and insights from ribosomal RNA secondary structure. **Systematic Entomology**. v.31, n.3, p. 517-528. 2006.

DICK, C. W. Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**. v.268, n.1483, p. 2391-2396. 2001.

DOWTON, M; AUSTIN A. D. Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships. **Proceedings of the National academy os Sciences of the United States of America**. v.91, p. 9911-9915. 1994.

DOWTON, M.; AUSTIN, A. D. The evolution of strand-specific compositional bias. A case study in the hymenopteran mitochondrial 16S rRNA gene. **Molecular Biology and Evolution**. v.14, n.1, p. 109-112. 1997a.

DOWTON, M; AUSTIN, A. D. Evidence for AT-transversion bias in wasp (Hymenoptera: Symphyta) mitochondrial genes and its implication for the origin of parasitism. **Journal of Nucleular Evolution**. v. 44, p.398-405. 1997b.

EARDLEY, C. D. Taxonomic revision of the African stingless bees (Apoidea: Apidae: Apinae: Meliponini). **Plant Protection Research**. v.10, p. 63-96. 2004.

ENGEL, M. S. A New Interpretation of the Oldest Fossil Bee (Hymenoptera: Apidae). **American Museum Novitates**.. n. 3296: p. 1-11. 2000.

ENGEL, M. S. A monograph of the Baltic amber bees and evolution of the Apoidea (Hymenoptera). **Bulletin of the American Museum of Natural History**. n.259, p.5-192. 2001.

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

FRANCISCO, F. O.; SILVESTRE, D; ARIAS, M. C. Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae : Meliponini): RFLP and restriction maps. **Apidologie**. v.32, n.4, p. 323-332. 2001.

FUTUYMA, D. J. **Evolutionary Biology**. 3<sup>rd</sup> Ed. Massachusetts: Sinauer Associates. 1998.

GIMENO, C.; BELSHAW, R.; D. L. J. QUICKE. Phylogenetic relationships of the Alysiinae/Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) and the utility of cytochrome b, 16S and 28S D2 rRNA. **Insect Molecular Biology**. v.6, n.3, p. 273-284. 1997.

HAN, H.Y.; MCPHERON, B.A. Molecular Phylogenetic Study of Tephritidae (Insecta: Diptera) Using Partial Sequences of the Mitochondrial 16S Ribosomal DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.7, n.1, p.17-32.1997.

HEARD, T. A. The role of stingless bees in crop pollination. **Annual review of entomology**. v.44, p. 183-206. 1999.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**. v.270, p. 96-99. 2003.

HURST, G. D. D.; JIGGINS, F. M. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**. v.272, n.1572, p. 1525-1534. 2005.

KÄLLERSJÖ, M.; FARRIS, J. S.; CHASE, M. W.; BREMER, B.; FAY, M. F.; HUMPHRIES, C. J.; PETERSEN, G.; SEBERG, O.; BREMER, K. Simultaneous parsimony jackknife analysis of 2538 *rbcL* DNA sequences reveals support for major clades of green plants, land plants, seed plants and flowering plants. **Plant Systematics and Evolution**. v.213, n.3-4, p. 259-287. 1996.

KOULIANOS, S.; SCHMID-HEMPEL, P. Phylogenetic relationships among bumble bees (*Bombus*, latreille) inferred from mitochondrial cytochrome b and cytochrome oxidase I sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.14, n.3, p. 335-341. 2000.

KOULIANOS, S.; SCHMID-HEMPEL, R.; ROUBIK, D. W. e SCHMID-HEMPEL, P. Phylogenetic relationships within the corbiculate Apinae (Hymenoptera) and the evolution of eusociality. **Journal of Evolutionary Biology**. v.12, n.2, p. 380-384. 1999.

LEYS, R.; COOPER, S. J. B.; SCHWARZ, M. P. Molecular phylogeny of the large carpenter bees, genus *Xylocopa* (Hymenoptera : Apidae), based on mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.17, n.3, p.407-418. 2000.

LOWE, R. M.; CROZIER, R. H. The phylogeny of bees of the socially parasitic Australian genus *Inquilina* and their *Exoneura* hosts (Hymenoptera, Anthophoridae). **Insectes Sociaux**. v.44, n.4, p. 409-414. 1997.

MARDULYN, P.; CAMERON, S. A.. The major opsin in bees (Insecta: Hymenoptera): a promising nuclear gene for higher level phylogenetics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.12, p.168–176. 1999.

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

MICHENER C.D. Comparative external morphology, phylogeny and classification of the bees, **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v.82, p.151–326. 1944.

MICHENER C.D. Biogeography of the bees. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 66, p.66-277. 1979.

MICHENER, C.D. Classification of the Apidae (Hymenoptera). **University of Kansas Science Bulletin**. v.54, p. 75-164.1990.

MICHENER, C.D. **The Bees of the World**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2000. p.799-805.

MICHENER, C.D.; GRIMALDI, D. A. A *Trigona* from Late Cretaceous amber of New Jersey (Hymenoptera: Apidae:Meliponinae). **American Museum Novitates**. N.2917, p.1-10. 1988.

MOURE, J.S. Notas sobre Meliponinae (Hymenoptera, Apoidea). **Dusenía**. v. 2, p. 25–50. 1951.

MOURE, J.S. A preliminary supra-specific classification of the old world Meliponinae bees (Hymenoptera, Apidae). **Studia Entomology**. v.4, p.181–242. 1961.

MOURE, J.S., *Melikerria* e *Eomelipona*, dois subgêneros novos em *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera, Apidae). **Anais do Encontro Brasileiro de Biologia de Abelhas e outros Insetos Sociais**. São Paulo: Ed. UNESP, 1992: p.62–66.

RASMUSSEN, C.; CAMERON, S. A. A molecular phylogeny of the Old World stingless bees (Hymenoptera : Apidae : Meliponini) and the non-monophyly of the large genus *Trigona*. **Systematic Entomology**. v.32, n.1, p. 26-39. 2007.

RICKETTS, T. H. Tropical forest fragments enhance pollinator activity in nearby coffee crops. **Conservation Biology**. v.18, n.5, p. 1262-1271. 2004.

ROIG-ALSINA, A.; MICHENER, C. D. Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera, Apoidea). **University of Kansas Science Bulletin**. v.55, n.4 e 5, p. 123-173. 1993.

ROUBIK, D. W.; SEGURA, J. A. L.; e CAMARGO, J. M. F. New stingless bee genus endemic to Central American cloudforests: Phylogenetic and biogeographic implications (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Systematic Entomology**. v.22, n.1, p.67-80. 1997.

RUSSO, C. A. M.; TAKEZAKI, N.; NEI, M. Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a know vertebrate phylogeny. **Molecular Biology and Evolution**. v13, p. 525-536. 1996.

SCHWARZ, H. F. Stingless bees (Meliponidae) of the Western Hemisphere. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v. 90, p. 1–546. 1948.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas do Brasil: Sistemática e Identificação**. 1ª.Ed. Belo Horizonte: edição dos Autores, 2002.

SILVESTRE, D.; FRANCISCO, F. O.; WEINLICH, R.; ARIAS, M. C. A scientific note on mtDNA gene order rearrangements among highly eusocial bees (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie**. v.33, p.355-356. 2002.

SILVESTRE, D; ARIAS,. M. C. Mitochondrial tRNA gene translocations in highly eusocial bees. **Genetics and Molecular Biology**. v.29, n.3, p. 572-575. 2006.

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

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene-Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain-Reaction Primers. **Annals of the Entomological Society of America**. v.87, n.6, p. 651-701. 1994.

SLAA, E. J.; SANCHEZ CHAVES, L. A.; MALAGODI-BRAGA, K. S.; HOFSTEDE, F. E. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, v.37, n.2, p. 293-315. 2006.

TANAKA, H.; ROUBIK, D. W.; KATO, M.; LIEW, F; GUNSALAM, G. Phylogenetic position of *Apis nuluensis* of northern Borneo and phylogeography of *A. cerana* as inferred from mitochondrial DNA sequences. **Insectes Sociaux**. v.48, n.1, p. 44-51. 2001.

WEINLICH, R.; FRANCISCO, F. O; ARIAS, M. C.. Mitochondrial DNA restriction and genomic maps of seven species of *Melipona* (Apidae: Meliponini). **Apidologie**. v.35, n.4, p. 365-370. 2004.

WEINSTOCK, G. M., et al. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. **Nature**, v.443, n.7114, p. 931-949. 2006.

WHITFIELD, J. B.; CAMERON, S. A.. Hierarchical analysis of variation in the mitochondrial 16S rRNA gene among hymenoptera. **Molecular Biology and Evolution**, v.15, n.12, p. 1728-1743. 1998.

## APÊNDICES

**Apêndice A** - Sequências nucleotídicas do fragmento do DNAr 16S utilizado no presente trabalho. Os pontos correspondem a identidade nucleotídica com a primeira seqüência, os hífens correspondem a regiões de gaps. Quando os hífens surgem iniciando ou terminando a seqüência é um indicativo de dados não amostrados.

<i>Apotrigona infuscata</i>	TTAAATGGCT	GCAGTATAAC	TGACTGTACA	AAGGTAGCAT	AATCAATTGG	TTTTTAAATG	AAATCTGGAA	TGAAAGGATT	AATGAAATGT	ACACTGTCTC	AAATATATTT	T--GTGAACT
<i>Austroplebeia australis</i>	-----	.....	.A.....	.....	.....A	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T.....A	.T-AC...T.
<i>Austroplebeia symei</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....A	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T.....A	.T-A...T.
<i>Axestotrigona ferruginea</i>	.T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.....	..-A...T.
<i>Axestotrigona junodi</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.....	..-A...T.
<i>Axestotrigona togoensis</i>	-----	-----	.....T	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.....	..-A...T.
<i>Celetrigona longicornis</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.....AA	..-A.A...T.
<i>Cephalotrigona capitata</i>	-----	-----	.....C	.....G	.....	.....A	.....	.....	.....A	.T.....	.T...T...A	..-A.T...T.
<i>Dactylurina staudingeri</i>	.....	.....	.T.A.....	.....	.....A	.....	.....A	.....	.....A	.T.....	.....	A--A...T.
<i>Dolichotrigona browni</i>	.....	.....	.T.A.....	.....	.....A	.....	.....A	.....	.....A	.T.....	.....AA	..-A.A...T.
<i>Friesella schrottkyi</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....A	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...T...A	A--A...T.
<i>Frieseomelitta doederleini</i>	.....	.....	.....	.....	.....A	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...T...A	..-A...T.
<i>Geotrigona fulvohirta</i>	.T.....	.....G	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...T...A	..-A...T.
<i>Geniotrigona incisa</i>	.G.....	.....	.....	.....	.....AG	.....	.....	.....	.....A	GA.....	TT.....	..-A...A.
<i>Geniotrigona thoracica</i>	.....	.....	.....	.....	.....A	.....	.....	.....	.....A	GT.....	.T.....	A--A...A.
<i>Geotrigona sp</i>	-----	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...T...A	..-A...T.
<i>Heterotrigona itama</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.T.....	TG....AA	A--...T.
<i>Homotrigona fimbriata</i>	.G.....	.....	.....	.....	.....A	.....	.....	.....	.....A	.A.....	.C.....	..-A...T.
<i>Hypotrigona gribodoi</i>	.....	.....	.....T	.....	.....A	.....	.....A	.....	.....A	.T.....	.T...T...AA	A--A...T.
<i>Hypotrigona ruspilii</i>	.....	.....	.....T	.....	.....	.....	.....A	.....	.....A	.T.....	.T...T...AA	A--A...T.
<i>Hypotrigona sp</i>	-----	-----	.....T	.....	.....A	.....	.....A	.....	.....A	.T.....	.T...T...AA	A--A...T.
<i>Lestrimelitta limao</i>	.G.....	.....	.....T	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...T...A	A--A...T.
<i>Lestrimelitta sp</i>	.....	.....	.....T	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...T...A	A--A...T.
<i>Lepidotrigona terminata</i>	.T.....	.....	.....	.....	.....A	.....	.....	.....	.....A	GT.....	.G.....A	A--A...T.
<i>Lepidotrigona ventralis</i>	.T.....	.....	.....	.....	.....A	.....	.....	.....	.....A	GT.....	.T...A	..-A...T.
<i>Leurotrigona muelleri</i>	-----	-----	.....	.....	.....-A	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...A	.T-A...T.
<i>Liotrigona madecassa</i>	.....	.....	.A...T	.A.....	.....	.....A	.....	.....	.....A	.T.....	.T...AA	A--A...T.
<i>Liotrigona mahafalya</i>	.....	.....	.A...T	.A.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...A	A--A...T.
<i>Lisotrigona furva</i>	.....	.....	.....T	.A.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...C	..-A...T.
<i>Lophotrigona canifrons</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....T	.....	.....	.....	.....A	GA.....	TGC....	AC-ACA...
<i>Meliplebeia becarii</i>	.....	.....	.C.A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.....C	A--A...T.
<i>Meliplebeia ogouensis</i>	.....	.....	.C.A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.....C	A--A...T.
<i>Melipona asilvai</i>	.....	.....	.....T	.A...G	.....	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...A	..-A...T.
<i>Melipona compressipes</i>	.T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	TT.....	.T.....	..-A...T.
<i>Melipona marginata</i>	.....	.....	.....T	.....	.....A	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...A	..-A...T.
<i>Melipona quadrifasciata</i>	.T.....	.....	.....T	.....	.....A	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...G	..-A...T.
<i>Meliponula bocandei</i>	.....	.....	.....T	.....	.....A	.....	.....	.....	.....A	.....AC	.T.....	..-A...T.
<i>Meliwillea bivea</i>	.T.....	.....	.A.....	.....	.....A	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...A	..-A.A...T.
<i>Mourella caerulea</i>	.T.....	.....	.....	.....	.....A	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...T...A	..-A...T.
<i>Nannotrigona melanocera</i>	.....	.....	.....-	.....	.....A	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...T...A	..-A.A...T.
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	.....	.....	.....-	.....	.....A	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...T...A	..-A...T.
<i>Nogueirapis butteli</i>	-----	.....	.C.....	.....G	.....	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...T...A	A--A...T.
<i>Odontotrigona haematoptera</i>	.G.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.A.....	.CG.....	..-A...T.
<i>Oxytrigona sp</i>	.....	.....	.A...C	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...T...A	..-A...T.
<i>Oxytrigona tataira</i>	.....	.....	.A...C	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.T.....	.T...T...A	..-A...T.

<i>Parapartamona tungurahua</i>	.....C.	.....	.....	A	.....	.....	.....	.....	A	.T	.....	T..T	....	A--A	....	T.															
<i>Paratrigona onorei</i>	.....T	.....	.....	G	.....	.....	.....	.....	A	.T	.....	T..T	....	--A	....	T.															
<i>Paratrigona subnuda</i>	-----	-----	-----	.....	.....	.....	.....	.....	A	.T	.....	T..AT	....	--A	....	T.															
<i>Partamona auripennis</i>	.....T	.....	.....	A	.....	.....	.....	.....	A	.T	.....	T..T	....	A	--A	....	T.														
<i>Partamona helleri</i>	.....T	.....	.....	A	.....	.....	.....	.....	A	.T	.....	T..T	....	A	--A	....	T.														
<i>Platytrigona hobbyi</i>	.....	.....	.....	A	.....	.....	.....	.....	A	GT	.....	.T	....	AA	A--	....	A.														
<i>Plebeia droryana</i>	.T	.....	.A	.....	.....	.....	.....	.....	A	.T	.....	T..T	....	--A	....	T.															
<i>Plebeia frontalis</i>	.....	.....	.A	.....	.....	.....	.....	.....	A	.T	.....	T..T	....	--A	....	T.															
<i>Plebeia julianii</i>	.....T	.....T	.A	.....G	.....	.....	.....	.....	A	.T	.....	T..T	....	--A	....	T.															
<i>Plebeia nigriceps</i>	.....	.....	.A	.....G	.....	.....	.....	.....	A	.T	.....	T..T	....	--A	....	T.															
<i>Plebeia remota</i>	.....	.....	.T	.A	.....	.....	.....	.....	A	.T	.....	T..T	....	--A	....	T.															
<i>Plebeia saiqui</i>	-----	-----	.T	.A	.....	.....	.....	.....	A	.T	.....	T..T	....	--A	....	T.															
<i>Plebeia wittmanni</i>	.....T	.....	.A	.....	.....	.....	.....	.....	A	.T	.....	T..T	....	--A	....	T.															
<i>Plebeilla lendliana</i>	.....	.....	.A	.....	.....	.....	.....	.....	A	.T	.....	T..T	....	A--	....	T.															
<i>Plebeina denoiti</i>	-----	-----	.A	.T	.....	.....	.....	.....	A	.T	.....	T..T	....	--A	....	T.															
<i>Plebeina hildebrandti</i>	.C	.....	.A	.....	.....	.....	.....	.....	A	.T	.....	T..T	....	--A	....	T.															
<i>Ptilotrigona lurida</i>	.....	.....	.T	.....	.....	.A	.....	.....	A	.T	.....	TG	....	--A	....	T.															
<i>Scaptotrigona depilis</i>	.....A	.A	.....	.....	A	.....	.....	.A	.A	.....	A	.T	....	AA	--A	....	T.														
<i>Scaptotrigona luteipennis</i>	.....	.A	.A	.....	A	.....	.....	.A	.A	.....	A	.T	....	AA	--A	....	T.														
<i>Scaptotrigona postica</i>	.....	.A	.A	.....	A	.....	.....	.A	.A	.....	A	.T	....	AA	--A	....	T.														
<i>Scaptotrigona sp</i>	.....	.A	.A	.....	A	.....	.....	.A	.A	.....	A	.T	....	AA	--A	....	T.														
<i>Scaptotrigona subobscuripennis</i>	-----	.AG	.....	.....	A	.....	.....	.A	.A	.....	A	.T	....	AA	--A	....	T.														
<i>Scaura latitarsis</i>	.T	.....	.T	.....	A	.....	.....	.A	.A	.....	A	.T	....	--A	....	T.															
<i>Scaura atlantica</i>	.T	.....	.T	.....	A	.....	.....	.A	.A	.....	A	.T	....	--A	....	T.															
<i>Scaura longula</i>	.T	.....	.....	.....	A	.....	.....	.....	A	.T	.....	T..T	....	A	--A	....	T.														
<i>Schwarzula timida</i>	.T	.....	.A	.....G	.....	A	.....	.....	.A	.....	.C	.A	.A	.....	T..T	....	--A	....	T.												
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	.T	.....	.....	.....	A	.....	.....	.....	.A	.....	A	.T	....	--A	....	T.															
<i>Sundatrigona moorei</i>	.T	.....	.....	.....	A	.....	.....	.....	.G	.....	A	GT	....	AA	--A	....	A.														
<i>Tetragonisca angustula</i>	-----	.....	.T	.....	A	.....	.....	.....	A	.T	.....	T..T	....	A	--A	....	T.														
<i>Tetragonilla atripes</i>	.....	.....	.....	.....	A	.....	.....	.....	A	.T	.....	T..T	....	G	A--	....	T.														
<i>Tetragonilla rufibasalis</i>	.....	.....	.....	.....	A	.....	.....	.....	A	.T	.....	TG	....	AA	A--	....	T.														
<i>Tetragonula carbonaria</i>	.G	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.A	.....	A	.T	....	....	A	C--	....	....														
<i>Tetragonula hockingsi</i>	.G	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	A	.T	....	T..G	AA	C--	....	T.														
<i>Tetragonula mellipes</i>	.G	.....	.....	.....	G	.....	.....	.....	A	.T	.....	.C	....	CAA	C--	....	T.														
<i>Tetrigona apicalis</i>	.G	.....	.....	.....	A	.....	.....	G	.....	.....	A	.C	....	....	--	....	A.														
<i>Tetrigona binghami</i>	.G	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	A	.A	.....	.C	....	....	--	....	A.														
<i>Tetrigona melanolleuca</i>	.G	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	A	.A	.....	.C	....	....	--	....	A.														
<i>Trigona amazonensis</i>	.T	.A	.....	.T	.....	G	.....	.A	.....	.A	.....	.A	.....	.A	.T	TT	.T	....	C	A--	....	T.									
<i>Trigona amalthea</i>	.T	.A	.....	.....	G	.....	.A	.T	.A	.....	.....	T	.T	....	.A	.....	A	.T	.....	T	....	....	A--	....	T.						
<i>Trigona cilipes</i>	-----	.....	.C	.....	G	.....	.A	.T	.....	.....	T	.....	.T	....	.A	.T	.....	T	....	A--	....	T.	T.								
<i>Trigona fuscipennis</i>	.T	.....	.C	.....	G	.....	.A	.T	.A	.....	G	.....	C	....	.A	.....	A	.T	TT	.T	....	A	A--	....	T.						
<i>Trigona hypogea</i>	.T	.....	.C	.....	G	.....	.A	.T	.....	.....	.....	.....	.....	.A	.....	A	.T	.....	T	....	A--	....	T.								
<i>Trigonisca sp</i>	.....	.....	.T	.A	.....	.....	.....	.....	A	.....	.....	.....	.....	.A	.....	A	.T	.....	.....	.....	A	--	....	A	....	T.					
<i>Apis cerana</i>	.....	.A	.....	.....	.T	.....	.A	.T	C	.....	T	.GAA	.T	....	.T	.A	.....	G	.....	AA	CA	.....	T	.T	.T	....	A	A--	....	T.	
<i>Apis dorsata</i>	.T	.A	.....	.....	.T	.....	.A	.T	C	.....	T	.GAA	.T	....	.C	.A	.....	G	.....	AA	TA	.....	TG	.AT	....	A	A--	....	T.		
<i>Apis florea</i>	.....	.A	.....	.....	.T	.....	.A	.T	C	.....	T	.GAA	.T	....	.T	.A	.....	AA	TT	.....	T	.AT	....	A	A--	....	T.				
<i>Apis mellifera</i>	.....	.A	.....	G	.T	.....	.A	.T	C	.....	T	.GAA	.T	....	.T	.....	AA	TA	.....	T	.AT	....	A	A--	....	T.					
<i>Bombus avinoviellus</i>	.G	.....	.....	.....	G	.....	.A	.T	.....	T	.....	.A	.A	.....	.A	.....	A	.T	GT	.....	A	ATTA	....	T	....	....	....	....	....	....	
<i>Bombus pennsylvanicus</i>	.T	.....	.A	.....	.....	.....	.....	.....	T	.....	TTT	.A	.....	.A	.....	G	.A	.....	T	.....	.....	A	--	....	T	....	A	A--	....	T.	
<i>Bombus terrestris</i>	.....	.G	.....	.T	.....	.....	.....	.....	T	.....	T	.A	.....	.....	.AG	.....	G	.A	.....	T	.....	A	--	....	T	....	A	A--	....	T.	
<i>Eufriesea caerulescens</i>	.....	.A	.....	.....	.T	.....	.T	.T	C	.....	T	.GAA	.....	.A	.....	.A	.....	A	.A	TT	....	A	A--	....	A	....	....	....	....	....	
<i>Eufriesea imperialis</i>	.....	.A	.....	.....	.T	.....	.T	.T	C	.....	T	.A	.....	.GAA	.....	.A	.....	A	.T	.....	T	....	AAA	A--	....	T	....	....	....	....	
<i>Eulaema polychroma</i>	.....	.A	.....	.....	.T	.....	.A	.T	C	.....	T	.GAA	.....	.A	.....	.A	.....	A	.A	.....	T	....	A	--	....	A	A--	....	A	....	....

<i>Apotrigona infuscata</i>	TAAAATTTTA	ATAAAAAATGT	TGAAATTTTT	TTATGGGACG	ATAAGACCCT	ATAGAATTTT	ATATTAG-AT	CATTCTATT	-----C	TTAAGGTGGA	ATTTGATTTA	ATATTTAGTT
<i>Austroplebeia australis</i>	.....	.....	.A.....A	.....	.....	.....	.....A-T	T...A.T.A	-----A	...TAAAT	...A.A...	.....A..
<i>Austroplebeia symei</i>	.....	.....	.A.....A	.....	.....	.....	.....A-T	T.A.A.T.A	-----A	...TAAAT	...A.A...	.....A..
<i>Axestotrigona ferruginea</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....A-C	T...T...A	-----A	...TA.AA	...A.A.T	.....GA..
<i>Axestotrigona junodi</i>	.....	.....	.A.....A	.....	.....	.....	.....A-T	T...T.G.A	-----T	...TA.AA	...A.A...	.....GA..
<i>Axestotrigona togoensis</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....A-A-T	T...T...A	-----A	...TA.AA	...A.A.T	.....GA..
<i>Celetrigona longicornis</i>	...T.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....A-A-T	T...T...A	-----A	...TA.AAT	TA..A.A.T	.....A..
<i>Cephalotrigona capitata</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A-T	T...T...A	-----G	A.G..A.AA	T...AT...	.....A..
<i>Dactylurina staudingeri</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....A-T	AT...T..A	-----	...AA.AA	...T.A...	.....A..
<i>Dolichotrigona browni</i>	...T.....	.....	.A.A.A-T	T...AT...A	.....	.....	.....A-A-T	T...AT...A	-----A	...TA.AAT	A..A.A.T	.....A..
<i>Friesella schrottkyi</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....C-T	T...T.G.A	A-----T	.A..TA.AA	...A.A...	.....GA..
<i>Frieseomelitta doederleini</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....A-T-T	A...TGTA	TA-----T	AA..TA.AA	...A...	.....A..
<i>Geotrigona fulvohirta</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....TA-T	TT...TA..A	-----A	...TA.TA	...AA.A.A	.....A..
<i>Geniotrigona incisa</i>	.....	.....	.A.....	.....	A.....	.....	.....GA-TA	ATAC.TAG.A	-----G	...TA.T...	...CATT.A	CG.....
<i>Geniotrigona thoracica</i>	.....	.....	.A.....A	.....	.....	.....	.....A-T	T...TAT.A	-----G	...TA.T...	...A.A...	.....A..
<i>Geotrigona sp</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....A-T	TT...TATA	TA-----T	.A.TAT.TA	...AAA.A...	.....A..
<i>Heterotrigona itama</i>	.....	...T.....	.A.....	.....	.....	.....	.....GC-TA	...TA..A	-----	...TA..A	..CA..TAG	.....G..
<i>Homotrigona fimbriata</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....C.A-T	T...TA..A	-----	...TA.AA	...A.A...	G.....GA..
<i>Hypotrigona gribodoi</i>	.....	...T.....	.A.....A	.....	.....	.....	.....A-T	T...A...	-----G	...TT.AA	...A.A...	.....A..
<i>Hypotrigona ruspolii</i>	.....	...T.....	.A.....AA	.....	.....	.....	.....A-T	T...T...	-----G	...TT.AA	...A.A...	.....A..
<i>Hypotrigona sp</i>	.....	.....	.A.....AA	.....	.....	.....	.....A-T	T...T.G...	-----G	...TT.AA	...A.A...	.....A..
<i>Lestrimelitta limao</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....AAT	T.A.T...A	TA-----A	.A.TTA.AA	...A...	.....A..
<i>Lestrimelitta sp</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....A-T	T.A.T...A	TA-----A	.A.TTA.AA	...A...	.....A..
<i>Lepidotrigona terminata</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....AGA-A	AGAC.TAG.A	-----	...TA.TA	G.ACTT..C	.....G..
<i>Lepidotrigona ventralis</i>	...C.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....G.-A	AG...TAG.A	-----G	...TA.T...	...CTT.CC	.....G..
<i>Leurotrigona muelleri</i>	...T.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....A-A-T	T...T...A	-----A	...TA.AA	...A.A.A.T	.....A..
<i>Liotrigona madecassa</i>	.....	.....	.A.....A	.....	.....	.....	.....A-A-T	T...T...A	-----A	...TA.AA	...A.A.T	T.....A..
<i>Liotrigona mahafalya</i>	.....	.....	.A.....A	.....	.....	.....	.....AA-A-T	T...T...A	-----T	...TA.AA	...A.A.A.T	T.....A..
<i>Lisotrigona furva</i>	.....	.....	.A.....A	.....	.....	.....	.....A-T	T...A...	-----A	...AA..T	...A.A...	.....A..
<i>Lophotrigona canifrons</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....C.A-	T...TA..A	-----	...TA.AA	.....G...	G.....G..
<i>Meliplebeia becarii</i>	.....	.....	.A.....A	.....	.....	.....	.....TA-T	...T...A	-----	...TA.AA	.....AC...	.....G..
<i>Meliplebeia ogouensis</i>	.....	.....	.A.....A	.....	.....	.....	.....TA-T	...T...A	-----	...TA.AA	.....AC...	.....G..
<i>Melipona asilvai</i>	...C.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....A-A-	T...T...A	-----T	...TA.AA	...A...T	.....A..
<i>Melipona compressipes</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....A-A-	TT.A.T.G.A	A-----T	...TA.AA	T.AAAG...T	.....A..
<i>Melipona marginata</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....A-A-T	T...T.G.A	T-----T	...TA.AA	...A...T	.....A..
<i>Melipona quadrifasciata</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....A-A-	T.A.T...A	-----T	...AA.AA	...A...T	.....A..
<i>Meliponula bocandei</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....A-TG	T...T...C	-----T	...AA.AA	...ATG...	.....GA..
<i>Meliwillea bivea</i>	...T.....	...T.....	.A.....A	.....	.....	.....	.....A-T	T...T...A	A-----T	.A..TA.AA	...A.ATA	.....A..
<i>Mourella caerulea</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....A-	T...T.G.A	-----A	...TA.AA	...A...	.....A..
<i>Nannotrigona melanocera</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....A-T	T.A.T.G.A	T-----T	.A.CTA.AA	...A...	.....A..
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....A-T	T.A.T.G.A	T-----T	.A.CTA.AA	...A...	.....A..
<i>Nogueirapis butteli</i>	.....	...T.....	.A.....A	.....	.....	.....	.....A-	T.A.T...A	-----T	...AA.AA	...A...	.....A..
<i>Odontotrigona haematoptera</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....C.A-	T...TA..A	-----	...TA.AA	...A...	G.....GA..
<i>Oxytrigona sp</i>	...T.....	.....	.A.....A	.....	.....	.....	.....T-	T...T...	-----T	...AA.AA	...A...	.....A..
<i>Oxytrigona taira</i>	...T.....	.....	.A.....A	.....	.....	.....	.....T-	T...T...	-----T	...AA.AA	...A...	.....GA..
<i>Parapartamona tungurahua</i>	.....	.....	.A.....A	.....	.....	.....	.....TA-	T.A..TATA	ATACAAATAT	AA..AAATA	...A...A	.....A..
<i>Paratrigona onorei</i>	.....	...T.....C	.A..C.A	.....	.....	.....	.....A-	T...T.G.A	-----T	.A..TA..A	T...A...	.....A..
<i>Paratrigona subnuda</i>	...T.....	...T.....	.T...A	.....	.....	.....	.....A-	T...T...A	-----T	.A..TT.AA	...A...	.....A..
<i>Partamona auripennis</i>	...T.....	.....	.A..AAAA	.....	.....	.....	.....TT-	T...TAT..	TAT-----G	AA..AT.TA	...A..AA	.....A..
<i>Partamona helleri</i>	...T.....	.....	.A..AAA	.....	.....	.....	.....TT-	T...TAT..	TAT-----G	AA..TT.TA	...A..AA	.....A..
<i>Platytrigona hobbyi</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....G.-GA	TG...TAG.A	-----G	..G.TA.TA	...CA...C	.....GA..
<i>Plebeia droryana</i>	.....	.....	.A.....A	.....	.....	.....	.....A-	T.A.T...A	A-----T	.A..TA.AA	...A...	.....A..
<i>Plebeia frontalis</i>	.....	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....A-	T.A.T...A	A-----T	.A..TA.AA	...A...	.....GA..



<i>Apotrigona infuscata</i>	GGGAGGACTA	TTAAATTTAA	CGAACTTTAA	TTTTTG----	-----AGAAC	TTTGATTAAA	GAAAATA--T	TTTGATCTTG	AATTT-TAAA	TTGTTAGAGT	AAATTACCTT	AGGGATAACA
<i>Austroplebeia australis</i>	.....T.	AA.....	..A.A----	-----TA..	..A.....	.....	.....	..A.....	.....	..A.....	.....	.....
<i>Austroplebeia symei</i>	.....T.	AA.....	..A.A----	-----A..	..A.....	.....	.....	..A.....	.....	..A.....	.....	.....
<i>Axestotrigona ferruginea</i>	..G...T.	AT.....	.....	-----TT..	..CAA...G.	.....	.....	.....	.....	..A.....	.....	.....
<i>Axestotrigona junodi</i>	.....T.	T.....	..A.....	-----TA..	..A.....	.....	..G.--	.....	.....	..AA...A.	.....	.....
<i>Axestotrigona togoensis</i>	..G...T.	A.....	.....	-----CT..	..CA...G.	.....	.....	.....	.....	..A.....	.....	.....
<i>Celestrigona longicornis</i>	.....T.	TA.....	..AAAA----	-----TA..	..A.....	.....	..AT--A	.....T	.....	..A.....	.....	.....
<i>Cephalotrigona capitata</i>	..A.T.G	AT..T...	..AATA--	-----TA..	..A..T..	..T.A.--	AA.....T	.....	..-A...	..A...T.	.....	.....
<i>Dactylurina staudingeri</i>	.....T.	TA.....	..A.....	-----TA..	..A.....	.....	..T....	AA.....A	..A.....	..A.C...A.	.....	.....
<i>Dolichotrigona browni</i>	.....T.	TA.....G	..A.....	-----TA..	..AA.....	.....	..AT--	..A.....T	.....	..AA...A.	.....	.....
<i>Friesella schrottkyi</i>	..A.TC.	.....G.	TA..T...	..AAA.A----	-----A..	..A.....	.....	.....	.....	..A.....	.....	.....
<i>Frieseomelitta doederleini</i>	..A.T.	TA..T...	..AATA--	-----TA..	..A..T..	.....	.....	.....	..AT	..-AT..	..A...T.	.....
<i>Geotrigona fulvohirta</i>	..A.T.	TA..T...	..AAAA----	-----A..	..A..T..	..T.A.A-	.....	.....	.....	..-A...	..A...A.	.....
<i>Geniotrigona incisa</i>	.....G.	..A...C.TT	A..ATG--	-----TA..	..A...T..	.....	.....	AG...C.C	.....	..-G...	..CAG...A.	.....
<i>Geniotrigona thoracica</i>	.....T.	..G.....	TT...C..	..AC.A----	-----TA..	..A..T..	..T.AT--	AA.....T	.....	..-A...	..CA...A.	.....
<i>Geotrigona sp</i>	..A.T.	TT..T...	..AA.T----	-----A..	..A.....	.....	..T...A-A	.....T.T	.....	..-A.T.	..A...A.	.....
<i>Heterotrigona itama</i>	.....T.	..T.....	.....	-----TT..	.....T..	.....	.....	AA.....T	..A...-A	..ATC...T.	.....	.....
<i>Homotrigona fimbriata</i>	.....T.	AA.....TT	AAA.ATA--	-----TA..	..A..T..	..C....	AA.....T	.....	.....	..-A...	..AT...A.	.....
<i>Hypotrigona gribodoi</i>	.....T.	AA.....	..A.ATA--	-----TA..	..AA.....	..TT.T--	.....T	..A.-G.	.....	..A...A.	.....	.....
<i>Hypotrigona ruspolii</i>	.....T.	AA.....	..A.AATA--	-----	..AA.....	..TT.TT-	.....T	..G.-A.	.....	..AA...A.	.....	.....
<i>Hypotrigona sp</i>	.....T.	AA.....	..A.A.AA----	-----	..AA.....	..TATA-	.....T	..A.-G.	.....	..A...A.	.....	.....
<i>Lestrimelitta limao</i>	..A.T.	TA..T...	..AA.----	-----TA..	..A.....	.....	..T--	.....T.T	.....	..-A...	..A...T.	.....
<i>Lestrimelitta sp</i>	..A.T.	TA..T...	..AA.A----	-----TA..	..A.....	..G...T--	.....T.T	.....	.....	..-A...	..A...T.	.....
<i>Lepidotrigona terminata</i>	.....G	TA.....T	A.C.ATG--	-----TA..	.....	.....	AA.....A	AA.....C	.....	..-G...	..CAC...A.	.....
<i>Lepidotrigona ventralis</i>	.....G.	GA.....T	A.AATA--	-----T...	..A..T..	..GT.A.--	AA.....C	.....	..-G...	..A...A.	.....	.....
<i>Leurotrigona muelleri</i>	.....T.	TA.....	..A.....	-----G.	..A..T..	..TAT.	.....T	.....	..AA..T	..AA...A.	.....	.....
<i>Liotrigona madecassa</i>	.....T.	AA.....	..A.....	-----TA..	..A.....	..AT--	.....A	.....	.....	..T.....	.....	.....
<i>Liotrigona mahafalya</i>	.....T.	AA.....	..A.A----	-----TA..	..A.....	.....	..AT--	.....A	.....	..T...A.	.....	.....
<i>Lisotrigona furva</i>	.....T.	AA.....	..CA----	-----TA..	..AA.....	..TT-	.....	..A.-	.....	..A...A.	.....	.....
<i>Lophotrigona canifrons</i>	.....T.	AG.AA.....	.....	-----A..	..A..T..	..G.ATA-	..A.....	..A.-	.....	..A...T.	.....	.....
<i>Meliplebeia becarii</i>	.....C.	TA.....	.....	-----T..	.....T..	.....	AA.....	.....	.....	..A.....	.....	.....
<i>Meliplebeia ogouensis</i>	.....C.	TA.....	.....	-----T..	.....T..	.....	AA.....	.....	.....	..A.....	.....	.....
<i>Melipona asilvai</i>	..A.T.	TA..T...	..AAAA----	-----T..	..A..T..	..TAAA	A.....T	.....	..-A...	..TA...A.	.....	.....
<i>Melipona compressipes</i>	..A.T.	TA..T...	..A.....	-----TA..	.....T..	..T-GA	A.....T	.....	..-A...	..A...A.	.....	.....
<i>Melipona marginata</i>	..A.T.	TA..T...	..G.----	-----TTT..	..AA.....	..A.AT-	.....T	.....	..-A...	..AAG...A.	.....	.....
<i>Melipona quadrifasciata</i>	..A.T.	T..T.C...	..A.....	-----T..	..A..T..	..TAGA	A.....T	.....	..-A...	..TA...A.	.....	.....
<i>Meliponula bocandei</i>	.....T.	TT.....	.....	-----TA..	..AA...G.	.....	..C....	.....	.....	..AA...A.	.....	.....
<i>Meliwillea bivea</i>	..A.T.	AA..T...	A...TA--	-----A..	..AA.....	.....	..C....T	..A.-A.	.....	..AAC...T.	.....	.....
<i>Mourella caerulea</i>	..A.T.	AA..T...	..AAA----	-----TA..	..AA.....	..A.A-	.....T	.....	..-A...	..AA...T.	.....	.....
<i>Nannotrigona melanocera</i>	..A.T.	TA..T...	..AAGA----	-----A..	..A.....	..A.-	..C....T	.....	..-A...	..AA...A.	.....	.....
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	..A.T.	AA..T...	..AAAA----	-----A..G	..A.....	..A.A-	.....T	.....	..-A...	..AA...A.	.....	.....
<i>Nogueirapis butteli</i>	..A.T.	TA..T...	..A.A----	-----TA..	..A..T..	..T.A.--	..A.....T	.....	..-A...	..A...T.	.....	.....
<i>Odontotrigona haematoptera</i>	.....T.	..G.AA.....	..C.A----	-----A..	..A..T..	..T--	AA.....T	.....	..-G...	..A...A.	.....	.....
<i>Oxytrigona sp</i>	..A.T.	TA..T...	..AA.A----	-----	..AA.....	..A.-A	AA.....T	.....	..-A...	..TAA...A.	.....	.....
<i>Oxytrigona taira</i>	..A.T.	TA..T...	..AA.A----	-----	..AA.....	..A.-A	AA.....T	.....	..-A...	..T.A...A.	.....	.....
<i>Parapartamona tungurahua</i>	..A.T.	AA..T...	..AA.A----	-----A..	..A..T..	..T....	AA...T.T	.....	..-A...	..A.A...A.	.....	.....
<i>Paratrigona onorei</i>	..A.T.	TA..T...	..A.A----	-----A..	..AA.....	..A.-	AA.....	.....	.....	..A...A.	.....	.....
<i>Paratrigona subnuda</i>	..A.T.	TA..T...	..A.....	-----TA..	..A..T..	..G.T.G.--	AA...T..	.....	..T	..A...A.	.....	.....
<i>Partamona auripennis</i>	..A.T.	..G.AA..T...	..AA.A----	-----T..	..AA.....	..A.-	AA...T.T	.....	..-G...	..A...A.	.....	.....
<i>Partamona helleri</i>	..A.T.	AA..T...	..AA.A----	-----T..	..AA.....	..A.-	AA...T.T	.....	..-A...	..A.A...A.	.....	.....
<i>Platytrigona hobbyi</i>	.....T.	..C...TT.....	..A.....	-----TT..	..A..T..	..A.-	AA...CT	.....	..-AG...	..A...A.	.....	.....
<i>Plebeia droryana</i>	..A.T.	TT..T...	..AA.A----	-----A..	..A..T..	..TT-	A.....T.T	.....	..-A...	..AA...T.	.....	.....
<i>Plebeia frontalis</i>	..A.T.	TA..T...	..AA.A----	-----TA..	..A.....	.....	..T--	..A.....T	.....	..-A...	..AA...T.	.....



<i>Apotrigona infuscata</i>	GCGTAATATT	TTTTTATAGG	TCGTATAGAA	AAAAATGGTT	GCGACCTC-G	ATGTTGAATT	AAGATAAATT	TTAAATGCAG	GAGTTTAA-T	AA
<i>Austroplebeia australis</i>	.....A	.T.....A	.....A	.....A	.....-	.....	.....T	-----	-----	--
<i>Austroplebeia symei</i>	.....A	.T.....A	.....A	.....A	.....-	.....	.....A	A.....-	.....	..
<i>Axestotrigona ferruginea</i>	.....	.....T	.....T	.....T	.....-	.....	.....	.....	.....	..
<i>Axestotrigona junodi</i>	.....A	.T.....G	.A.....A	.....A	.....-	.....	.....	.....	.....	--
<i>Axestotrigona togoensis</i>	.....	.....T	.....T	.....T	.....-	.....	.....A	-----	-----	--
<i>Celestrigona longicornis</i>	...T....	.A .T.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...T...A..	A-----	-----	--
<i>Cephalotrigona capitata</i>	.....	.A.....G	.A.....A	.....A	.....-	.....	.....	.....T	-----	--
<i>Dactylurina staudingeri</i>	.....	.A .A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	.....	.....	.....	..
<i>Dolichotrigona browni</i>	...T....	.A .A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...T...T..	A...A..-	.....	..
<i>Friesella schrottkyi</i>	.....	.A.....	.....	.....	.....-	.....	.....	-----	-----	--
<i>Frieseomelitta doederleini</i>	.....	.A .AC.....A	.....A	.....A	.....-	.....	.....T..	TT-----	-----	--
<i>Geotrigona fulvohirta</i>	.....	.A .T.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...C.T..	AG.....-	G.	
<i>Geniotrigona incisa</i>	.....C.	.....A C.T.....G	.....A	.....A	.....-	.....	.....	.....	.....	..
<i>Geniotrigona thoracica</i>	.....	.A C.A.....G	.A.....A	.....A	.....-	.....	.....	.....	.....	..
<i>Geotrigona sp</i>	...T....	.A .T.....A	.....A	.....A	.....-	.....	.....T..	A.....-	.....	--
<i>Heterotrigona itama</i>	.....	.A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...A..G-	-----	-----	--
<i>Homotrigona fimbriata</i>	.....C.	.A C.AC.....G	.A.....A	.....A	.....-	.....	...C....	.....-	.....	..
<i>Hypotrigona gribodoi</i>	.....	.A .T.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...T...A..	A.....-	.....	..
<i>Hypotrigona ruspolii</i>	.....	.A .T.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...T...A..	A.....-	.....	..
<i>Hypotrigona sp</i>	.....	.A .A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	.....	-----	-----	--
<i>Lestrimelitta limao</i>	.....	.A .T.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...C.T..	A.....-	.....	..
<i>Lestrimelitta sp</i>	.....	.A .T.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...C....	A.....-	.....	--
<i>Lepidotrigona terminata</i>	.....	.A C.T.....G	.A.....A	.....A	.....-	.....	.....	.....	.....	..
<i>Lepidotrigona ventralis</i>	.....C.	.A C.T.....G	.A.....A	.....A	.....-	.....	.....	.....	.....	..
<i>Leurotrigona muelleri</i>	...T....	.A .T.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...T...-	-----	-----	--
<i>Liotrigona madecassa</i>	...T....	.A .A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	.....	A.....-	.....	..
<i>Liotrigona mahafalya</i>	...T....	.A .A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	.....	A.....-	.....	..
<i>Lisotrigona furva</i>	...T....	.A .T.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...T...A..	A.....-	G.	
<i>Lophotrigona canifrons</i>	...T....	.A C.T.....G	.A.....A	.....A	.....-	.....	...G..C..	.....-	.....	..
<i>Meliplebeia becarii</i>	.....	.A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	.....	-----	-----	--
<i>Meliplebeia ogouensis</i>	.....	.A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	.....	.....	.....	G.
<i>Melipona asilvai</i>	...T....	.A .T.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...T...A..	A...A----	-----	--
<i>Melipona compressipes</i>	...T....	.A .T.....A	.....A	.....A	.....-	.....	.....	.....	.....	..
<i>Melipona marginata</i>	.....	.A .T.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...T...-	-----	-----	--
<i>Melipona quadrifasciata</i>	...T....	.A .A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...TGA	CT-----	-----	--
<i>Meliponula bocandei</i>	.....	.A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	.....	.....	.....	..
<i>Meliwillea bivea</i>	...T....	.A .T.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...-A..A..	A.....-	.....	--
<i>Mourella caerulea</i>	.....	.A .T.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...T...-	-----	-----	--
<i>Nannotrigona melanocera</i>	...T....	.A .A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...T...A..	A.A.....-	.....	..
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	...T....	.A .A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...T...A..	A.A-----	-----	--
<i>Nogueirapis butteli</i>	...T....	.A .A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	.....	A.....-	.....	--
<i>Odontotrigona haematoptera</i>	.....	.A C.A.....G	.A.....A	.....A	.....-	.....	.....	.....	.....	..
<i>Oxytrigona sp</i>	...T....	.A .AC.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...C.A..	A.....-	.....	--
<i>Oxytrigona taira</i>	...T....	.A .A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...C.A..	A.....-	.....	--
<i>Parapartamona tungurahua</i>	...T....	.A .A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	.....	.....	.....	..
<i>Paratrigona onorei</i>	...T....	.A .A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	.....	A.....-	G.	
<i>Paratrigona subnuda</i>	.....	.A .A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	.....	-----	-----	--
<i>Partamona auripennis</i>	...T....	.A .A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	.....	.....	.....	..
<i>Partamona helleri</i>	...T....	.A .A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	.....	-----	-----	--
<i>Platytrigona hobbyi</i>	.....C.	.....AC.....G	.....A	.....A	.....-	.....	...G...C..	.....-	.....	..
<i>Plebeia droryana</i>	.....	.A .T.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...T...ACT	-----	-----	--
<i>Plebeia frontalis</i>	.....	.A.....A	.....A	.....A	.....-	.....	...T...A..	A.....-	G.	

<i>Plebeia julianii</i>	.....	A	.A	.....	A	.....	-	.....	.....	A	A	-----	--				
<i>Plebeia nigriceps</i>	.....	A	.....	.....	A	.....	-	.....	.....	AT	A	-----	--				
<i>Plebeia remota</i>	.....	A	.A	.....	A	.....	-	.....	.....	T	A	-----	--				
<i>Plebeia saiqui</i>	.....	A	.T	.....	CA	.....	-	.....	.....	A	.....	-----	--				
<i>Plebeia wittmanni</i>	.....	A	.T	.....	A	.....	-	.....	.....	.....	.....	-----	--				
<i>Plebeielia lendliana</i>	.....	.....	A	.....	T	.....	-	.....	.....	.....	A	.....	--				
<i>Plebeina denoiti</i>	.....	A	.T	.....	G.A	.....	T.A	.....	T	.....	C	T-----	--				
<i>Plebeina hildebrandti</i>	.....	A	.T	.....	G.A	.....	-	.....	.....	.....	.....	-----	--				
<i>Ptilotrigona lurida</i>	.....	T	.....	A	.T	.....	-	.....	.....	.....	.....	-----	--				
<i>Scaptotrigona depilis</i>	.....	T	.....	A	AC	.....	-	.....	.....	T	A.A	.....	--				
<i>Scaptotrigona luteipennis</i>	.....	T	.....	A	AC	.....	-	.....	.....	T	A.A	.....	--				
<i>Scaptotrigona postica</i>	.....	T	.....	A	AC	.....	-	.....	.....	.....	.....	-----	--				
<i>Scaptotrigona sp</i>	.....	T	.....	A	AC	.....	-	.....	.....	T	A.A	.....	--				
<i>Scaptotrigona subobscuripennis</i>	.....	T	.....	A	AC	.....	-	.....	.....	.....	.....	-----	--				
<i>Scaura latitarsis</i>	.....	T	.....	A	.T	.....	-	.....	.....	T	A	-----	--				
<i>Scaura atlantica</i>	.....	T	.....	A	.T	.....	-	.....	.....	T	A	.G	-----				
<i>Scaura longula</i>	.....	T	.....	A	.T	.....	-	.....	.....	.....	A	.....	--				
<i>Schwarzula timida</i>	.....	T	.....	A	.T	.....	-	.....	.....	.....	.....	-----	--				
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	.....	.....	A	.T	.....	A	.....	-	.....	.....	.....	-----	--				
<i>Sundatrigona moorei</i>	.....	.....	A	AC	.....	G.A	.....	-	.....	G	.....	.....	-C				
<i>Tetragonisca angustula</i>	.....	T	.....	A	.....	.....	C	.....	-	.....	T	-----	--				
<i>Tetragonilla atripes</i>	.....	T	.....	A	.....	A	.....	-	.....	.....	C	.....	G				
<i>Tetragonilla rufibasalis</i>	.....	T	.....	A	.....	A	.....	-	.....	.....	C	.....	G				
<i>Tetragonula carbonaria</i>	.....	T	.C	.....	C.AC	.....	G.A	.....	-	.....	G	-----	--				
<i>Tetragonula hockingsi</i>	.....	T	.C	.....	C.AC	.....	G.A	.....	-	.....	G	C	.....				
<i>Tetragonula mellipes</i>	.....	.C	.....	.....	C.AC	.....	G.A	.....	-	.....	G	C	.....				
<i>Tetrigona apicalis</i>	.....	.....	A	.AC	.....	A	.....	-	.....	.....	C	.....	--				
<i>Tetrigona binghami</i>	.....	.....	A	C.A	.....	A	.....	-	.....	.....	C	.....	--				
<i>Tetrigona melanoleuca</i>	.....	.....	A	.A	.....	A	.....	-	.....	.....	C	.....	--				
<i>Trigona amazonensis</i>	.....	.....	T	.A	.....	G.A	.....	-	.....	.....	.....	.....	G				
<i>Trigona amalthea</i>	.....	.....	A	.AC	.....	A	.....	-	.....	.....	.....	.....	--				
<i>Trigona cilipes</i>	.....	.....	A	.A	.....	A	.....	-	.....	.....	.....	.....	G				
<i>Trigona fuscipennis</i>	.....	.....	A	.....	.....	A	.....	-	.....	.....	T	C-----	--				
<i>Trigona hypogea</i>	.....	.....	.....	A	.....	A	.....	-	.....	.....	G	.....	--				
<i>Trigonisca sp</i>	.....	T	.....	A	.....	A	.....	-	.....	.....	.....	-----	--				
<i>Apis cerana</i>	.....	C	.G	.A	C.AC	.T	.T	.G	.T	.....	G	AG	.C	.....	AA	TT	
<i>Apis dorsata</i>	.....	C	.G	.A	C.A	.....	T	.G	.A	.....	T	AA	.C	.....	A	TT	
<i>Apis florea</i>	.....	C	.G	.....	.A	.T	.T	.G	.A	.....	.....	AA	.....	T	.T		
<i>Apis mellifera</i>	.....	C	.G	.A	C.A	.....	T	.G	.T	.....	G	AA	.GGC	.....	T	.G	TT
<i>Bombus avinoviellus</i>	.....	C	.....	TA	.A	.AA	.TA	.T	.G	.T	.....	.....	T	.A	.....	--	
<i>Bombus pennsylvanicus</i>	.....	C	.....	A	.A	.....	TT	.T	.G	.T	.....	.....	C	G	.A	.....	--
<i>Bombus terrestris</i>	.....	C	.....	A	.A	.T	.T	.G	.A	.....	.....	.....	A	.A	.....	--	
<i>Eufriesea caeruleascens</i>	.....	C	.....	A	.T	.A	.TA	.T	.G	.T	.....	.....	G	.A	.A	.....	-A
<i>Eufriesea imperialis</i>	.....	C	.....	A	.T	A	.AA	.TA	.T	.G	.A	.....	.....	T	.A	.....	-A
<i>Eulaema polychroma</i>	.....	C	.....	ATG	.A	.A	.TA	.T	.G	.T	.....	.....	.....	A	.A	.....	--







*Schwarzula sp* . . . . . A . T . . . . . A . T . . . . . T.A . A . T . . . . . A . . . . . A . . . . . G . . . . . AT . . . . . T . . . . . A . . . . . A . . . . .  
*Schwarzula timida* . . . . . A . T . . . . . A . T . . . . . T.A . A . T . . . . . C . . . . . A . . . . . A . . . . . G . . . . . AT . . . . . T . . . . . A . . . . . A . . . . .  
*Scaptotrigona postica* . . . . . T . . . . . A . T . . . . . T.A . . . . . T . . . . . A . . . . . A . . . . . G . . . . . T . . . . . A . . . . . GT . . . . . A.T . . . . . AGA . . . . . T . . . . .  
*Scaptotrigona sp* . . . . . T . . . . . A . T . . . . . T.A . . . . . T . . . . . A . . . . . A . . . . . G . . . . . T . . . . . A . . . . . GTA . . . . . A.T . . . . . AGA . . . . . T . . . . .  
*Scaura atlantica* . . . . . A . T . . . . . A . T . . . . . T.A . . . . . T . . . . . A . . . . . A . . . . . G . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . . A . T . . . . . T . . . . . A . A . . . . .  
*Scaura latitarsis* . . . . . A . T . . . . . A . T . . . . . C . . . . . T.A . . . . . T . . . . . A . . . . . A . . . . . G . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . . A . T . . . . . T . . . . . A . A . . . . .  
*Scaura longula* . . . . . A . C . . . . . A . . . . . T.A . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T . . . . . T . . . . . A . A . . . . .  
*Tetragona dorsalis* . . . . . A . T . . . . . A . A . A . T . . . . . T.A . . . . . A . T . . . . . T . . . . . A . . . . . A . . . . . G . . . . . A . T . . . . . A . . . . . GTA . . . . . A . T . . . . . A . . . . . A . . . . .  
*Tetragonisca sp* . . . . . T . . . . . A . T . . . . . T.A . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . G . . . . . T . . . . . A . . . . . GT . . . . . G . . . . . A . T . . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
*Tetragonula carbonaria* . . . . . C . . . . . T . . . . . G . . . . . C . . . . . G . C . C . A . . . . . T . . . . . T . C . . . . . C . C . A . T . T . C . T . G . . . . . A . T . . . . . GC . . . . . C . . . . . T . . . . . GT . . . . . C . C . . . . . A . T . . . . . A . . . . . A . . . . . G . . . . .  
*Trigona cilipes* . . . . . A . T . . . . . A . T . . . . . T.A . . . . . T . . . . . A . A . . . . . A . . . . . G . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . . A . . . . . A . A . . . . . A . . . . . A . . . . .  
*Trigona fuscipennis* . . . . . C . . . . . A . C . . . . . A . T . . . . . T.A . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . . G . . . . . T . . . . . A . A . . . . . T . . . . . T . . . . . A . T . . . . . A . . . . . A . . . . .  
*Trigona hyalinata* . . . . . A . T . . . . . T . . . . . T.A . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . . G . . . . . AT . . . . . A . . . . . T . . . . . A . T . . . . . A . A . . . . . A . . . . . A . . . . .  
*Trigona hypogea* . . . . . A . . . . . A . . . . . C . . . . . T . . . . . A . . . . . C . . . . . A . . . . . G . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . . C . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . .  
*Trigona necrophaga* . . . . . A . C . . . . . T . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . . C . T . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . .  
*Trigonisca sp* . . . . . A . T . . . . . T . . . . . T.A . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . G . . . . . T . . . . . A . A . . . . . GT . . . . . A . T . . . . . A . . . . . A . . . . . T . . . . . A . . . . .  
*Apis mellifera ligustica* . . . . . G . . . . . T . . . . . T.A . . . . . A . . . . . T . A . . . . . A . T . T . A . . . . . G . T . A . T . C . . . . . T . T . . . . . G . C . C . . . . . A . . . . . A . . . . .  
*Apis nigrocincta* . . . . . G . A . . . . . G . . . . . A . C . T . . . . . C . . . . . G . A . . . . . A . T . T . A . . . . . G . . . . . A . T . C . . . . . T . T . . . . . G . C . C . T . . . . . A . . . . . A . . . . .  
*Bombus lucorum* . . . . . G . A . . . . . A . . . . . T . . . . . T . A . . . . . A . T . . . . . A . . . . . G . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . . A . T . . . . . A . . . . . T . . . . . A . . . . .  
*Bombus pennsylvanicus* . . . . . G . A . . . . . A . . . . . T . . . . . T . A . . . . . A . T . . . . . C . . . . . T . . . . . G . T . . . . . T . . . . . A . . . . . GT . . . . . A . T . . . . . A . A . . . . . T . . . . . A . . . . .  
*Bombus ruderarius* . . . . . G . A . . . . . A . . . . . T . . . . . T . A . . . . . A . T . . . . . C . . . . . T . . . . . G . T . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . . A . T . . . . . A . A . . . . . C . . . . . T . . . . . A . . . . .  
*Bombus terrestris* . . . . . G . A . . . . . A . . . . . T . . . . . T . A . . . . . A . T . . . . . A . . . . . G . . . . . T . . . . . A . A . . . . . T . . . . . C . . . . . A . T . . . . . A . A . . . . . T . . . . . A . . . . .  
*Exaerete frontalis* . . . . . G . . . . . T . . . . . T . A . . . . . A . . . . . A . T . . . . . G . . . . . A . . . . . T . . . . . GT . . . . . G . . . . . A . . . . . A . . . . .  
*Eufriesea caerulea* . . . . . G . A . . . . . T . . . . . A . . . . . T . A . . . . . A . . . . . A . . . . . G . T . . . . . A . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . A . . . . . A . . . . .  
*Euglossa imperialis* . . . . . A . . . . . T . . . . . T . A . . . . . A . . . . . A . A . . . . . G . . . . . A . T . . . . . A . A . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . A . . . . . A . . . . . A . A . . . . .  
*Eulaema bombiformis* . . . . . G . A . . . . . T . . . . . C . . . . . A . . . . . T . A . . . . . A . . . . . A . A . . . . . G . T . . . . . A . C . A . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . A . . . . . A . C . T . . . . . A . . . . .  
*Eulaema meriana* . . . . . G . A . . . . . T . . . . . A . A . . . . . T . A . . . . . A . T . . . . . A . . . . . T . . . . . G . . . . . A . T . . . . . A . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . .

*Austroplebeia symei* AAT CCA ATC CAT TCA AAA TTA AAT ATT TAT AAA GTT ATT TTT TAT CCT TAT TTT ATT ATT AAA GAT TTA ATT ACA ATT ATT ATT TTA TTA TTA ATT TTT ATA TTA ATT  
*Austroplebeia australis* . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . . G . . . . .  
*Celetrigona longicornis* . . . . . T . . . . . T . . . . . AAT . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . T . T . . . . . T . A . A . T . . . . . T . A . . . . . T . A . . . . . AT . . . . .  
*Cephalotrigona capitata* . . . . . T . . . . . T . . . . . AAT . . . . . A . . . . . C . . . . . A . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . A . T . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . .  
*Friesella schrottkyi* . . . . . T . . . . . T . . . . . C . . . . . A . . . . . C . . . . . A . . . . . CA . . . . . T . A . A . T . A . . . . . T . A . . . . . T . . . . .  
*Frieseomelitta dispar* . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . AT . . . . . G . . . . . A . . . . . CC . . . . . A . . . . . T . A . . . . . T . A . A . T . . . . . T . A . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . .  
*Frieseomelitta sp* . . . . . T . . . . . T . . . . . A . . . . . A . . . . . TCA . . . . . C . . . . . C . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . A . . . . . T . A . A . T . . . . . T . A . A . T . . . . . A . . . . . T . A . . . . .  
*Frieseomelitta varia* . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . AT . . . . . G . . . . . A . . . . . CC . . . . . A . . . . . T . A . . . . . T . A . A . T . . . . . T . A . A . T . . . . . T . A . A . T . . . . . T . A . A . T . . . . .  
*Geotrigona sp* . . . . . T . . . . . T . A . . . . . T . . . . . C . . . . . C . . . . . A . . . . . CC . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . .  
*Heterotrigona itama* . . . . . T . . . . . T . . . . . A . . . . . A . . . . . C . . . . . G . A . . . . . TCA . . . . . A . . . . . A . . . . . G . . . . . A . . . . . G . A . . . . . T . . . . . G . A . T . . . . . ACT . A . T . . . . . T . A . . . . . C . T . A . . . . .  
*Lestrimelitta sp* . . . . . T . . . . . T . A . . . . . AAT . . . . . G . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . T . . . . . T . . . . . A . T . . . . . T . . . . . A . . . . . C . . . . .  
*Lestrimelitta limao* . . . . . T . . . . . T . A . . . . . T . A . G . T . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . C . . . . . T . . . . . T . . . . . A . T . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . .  
*Leurotrigona muelleri* . . . . . T . . . . . T . . . . . AAT . . . . . G . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . TC . . . . . C . . . . . T . . . . . T . . . . . A . A . T . . . . . T . A . . . . . T . . . . .  
*Melipona asilvai* . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . A . T . . . . . A . . . . . A . . . . . C . . . . . AA . . . . . TCA . . . . . A . . . . . C . . . . . A . . . . . A . A . T . . . . . T . . . . .  
*Melipona bicolor* . . . . . T . . . . . T . . . . . CT . . . . . A . . . . . A . . . . . C . . . . . AA . . . . . TCA . . . . . A . . . . . A . . . . . A . A . T . . . . . A . . . . . T . . . . .  
*Melipona compressipes* . . . . . T . . . . . T . . . . . C . . . . . A . . . . . A . . . . . C . . . . . AA . . . . . C . . . . . GA . . . . . A . . . . . A . A . T . . . . . A . . . . . A . . . . .  
*Melipona marginata* . . . . . T . . . . . T . . . . . CCT . . . . . A . . . . . A . . . . . C . . . . . AA . . . . . TCA . . . . . C . . . . . A . . . . . A . A . T . . . . . A . . . . . A . . . . .  
*Melipona quadrifasciata* . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . A . . . . . A . . . . . C . . . . . AA . . . . . TCA . . . . . C . . . . . T . . . . . A . . . . . A . A . T . . . . . T . A . . . . . T . . . . .  
*Melipona subnitida* . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . A . . . . . A . . . . . C . . . . . AA . . . . . A . . . . . TCA . . . . . A . . . . . A . . . . . A . A . T . . . . . T . . . . . T . T . . . . .  
*Mourella caerulea* . . . . . T . . . . . T . . . . . G . . . . . G . . . . . AAT . . . . . G . . . . . A . . . . . G . . . . . A . . . . . G . A . . . . . T . . . . . T . . . . . G . A . A . T . . . . . T . . . . . T . . . . .  
*Nannotrigona testaceicornis* . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . AT . . . . . A . . . . . CC . . . . . A . . . . . TA . . . . . G . . . . . T . . . . . T . . . . . G . A . T . . . . . T . . . . . T . . . . . G . . . . . T . . . . .  
*Oxytrigona sp* . . . . . T . . . . . T . . . . . AAT . . . . . A . . . . . A . . . . . C . . . . . A . . . . . A . . . . . T . A . A . T . . . . . A . . . . . T . . . . .  
*Plebeia phrynostoma* . . . . . T . . . . . T . . . . . AAT . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . T . . . . . T . . . . . AT . . . . .  
*Plebeia droryana* . . . . . T . . . . . T . . . . . AAT . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . T . . . . . T . . . . . G . . . . . A . . . . . AT . . . . .  
*Plebeia julianii* . . . . . T . . . . . T . . . . . AAT . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . T . A . . . . . A . . . . . T . A . . . . . T . . . . . A . . . . . AT . . . . .  
*Plebeia wittmanni* . . . . . T . . . . . T . . . . . AAT . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . T . A . . . . . A . . . . . T . A . . . . . T . . . . . A . . . . . AT . . . . .

*Plebeia pugnax* . . . . .T . . . . . AAT G. . . . . A. . . . . A . . . . . A . . . . . C . . . . .T . . . . . AT . . .  
*Plebeia remota* . . . . .G.T . . . . . AAT . . . . . A. . . . . A . . . . . A . . . . . T.A . . . . . A . . . . . AT . . .  
*Plebeia saiqui* . . . . .T . . . . . AAT . . . . . A. . . . . A . . . . . A . . . . . T . . . . . A . . . . . AT . . .  
*Plebeia sp* . . . . .T . . . . . AAT . . . . . A. . . . . A . . . . . A . . . . . T.A . . . . . A . . . . . AT . . .  
*Plebeia sp1* . . . . .T . . . . . AAT . . . . . A. . . . . A . . . . . A . . . . . T . . . . . T.A . . . . . AT . . .  
*Schwarziana quadripunctata* . . . . .T . . . . .G. A. . G. . . . . A. . GG. . . . . A . . . . . T. . . . . A . . A.A.T . . . . . T . . .  
*Schwarziana sp* . . . . .T . . . . .G. A. . G. . . . . A. . GG. . . . . A . . . . . T. . . . . A . . A.A.T . . . . . T . . .  
*Schwarzula sp* . . . . .T A. . . . . A. . . . . A. . . . . A . . . . . A . . . . . T. . A.T . . . . .G . . . . . AT . . .  
*Schwarzula timida* . . . . .C . . . . .T A. . . . . A. . . . . A. . . . . C . . A . . . . . A . . . . . T. . A.T . . . . . AT . . .  
*Scaptotrigona postica* . . . . .T . . . . . AAT .GA . . . . . A. . A. . . . . A . . . . . T.A T.A . . . . . A. . . . . T . . T. . A.T . . . . .T G. . . . . T . . .  
*Scaptotrigona sp* . . . . .T . . . . . AAT .GA . . . . . A. . A. . . . . A . . . . . A T.A . . . . . A. . . . . T . . T.A T. . A.T . . . . .T . . . . . T . . .  
*Scaura atlantica* . . . . .T . . . . . AAT . . . . . A. . G. . . . . A . . . . . T. . . . . TA. T.A G.T . . . . .C . . . . . T . . .  
*Scaura latitarsis* . . . . .T . . . . . AAT . . . . . A. . G. . . . . A . . . . . T. . . . . TA. T.A G.T . . . . .C.T . . . . . C.T . . .  
*Scaura longula* . . . . .T . . . . . AAT . . . . . A. . G. . . . . A . . . . . A . . . . . T.A A.T . . . . .C . . . . . AT . . .  
*Tetragona dorsalis* . . . . .T . . . . .A. . . . .C . . . . .A. . TCA . . . . .C . . . . .CA .A . . . . .T . . TA. T.C . . T . . . . . AT T.A  
*Tetragonisca sp* . . . . .T . . A . . . . . AAT .G. . . . . A. . . . . G.A . . . . . T.A A.T . . . . . T. . . . . T . . . . .G .AT . . .  
*Tetragonula carbonaria* . . . . .T . . . . .G .G .G. G. . . . .G A. . G. . . . .C . . . . .C .A . . . . .G . . . . . T. . G. . A.T . . . . .C.G .C. . . . .G.T C. .  
*Trigona cilipes* . . . . .T . . . . . . . . . . . A. . CC. . . . .C.C .A . . . . .CA T.A . . . . .C . . . . .T T. . . . .T.A .CT . . . . .CA . . . . . T . . .  
*Trigona fuscipennis* . . . . .T . . . . . . . . . . . A. . A. . . . .G . . . . .A T.A . . . . .T . . . . .A T.A A.T . . . . .T . . . . . T . . .  
*Trigona hyalinata* . . . . .T . . . . . AAC . . . . . A. . .AC . . . . . A . . . . . T. . . . . T . . . . .A A.T . . . . .T . . . . . T . . .  
*Trigona hypogea* . . . . .T . . . . . AAC . . . . . A. . .CA . . . . . T. . T.A . . . . .C . . . . .T . . . . .T. . A.T . . . . .T . . . . . T . . .  
*Trigona necrophaga* . . . . .T . . T . . . . . AAT . . . . . A. . .CA . . . . . T.A T.A . . . . .C . . .C . . . . .C.A A.T . . . . .T . . . . . T . . .  
*Trigonisca sp* . . . . .T . . T . . . . . AAT . . . . .C . . . . . A. . . . .A.C . . . . .C . . . . .C . . . . .T.A A.T . . . . .T.A . . . . . T . . .  
*Apis mellifera ligustica* . . . . .T C.T GGA . . . . .T . . T . . . . .A. . . . .TCA . . . . .C . . . . .A . . . . .TCA . . . . .C.T T.A GG. T. . TA. . . . .C A.C . . . . .T .C . . . . .C . . .  
*Apis nigrocincta* . . . . .C . . T .A GGA . . . . .C .AC . . . . .A. . . . .A.C TCA . . . . .C . . . . .TCA . . . . .T.A GG. T. . TA. . . . .A.T . . . . .T .C . . . . .A. . . . .  
*Bombus lucorum* . . . . .T . . . . .A. . . . .A. . A. . . . .C . . A . . . . .C .C . . . . .T . . . . .T. . AC. . . T A. . . . . . . . . . .  
*Bombus pennsylvanicus* . . . . .T C.T . . . . .T .A.T . . . . .A. . A. . . . .C . . A . . . . .TCA . . . . . . . . . . .A A. . . . .T .A . . . . .A.T . . .  
*Bombus ruderarius* . . . . .T . . T . . . . .A. . . . .A. . A. . . . .C . . . . . . . . . . .CA . . . . .T. . AC. . . T .C . . . . .A.T . . . . .A.T . . .  
*Bombus terrestris* . . . . .C . . T . . . . .A. . . . .A.C .A. . .C .C . . . . .A . . . . .C .C . . . . .T . . . . .T. . AC. . . T .C . . . . .A . . . . .  
*Exaerete frontalis* . . . . .T . . T GGA A. . . T AG. G. . . . .A. . .CCA . . . . .C . . . . .CA . . . . .T.A GG. T. . . . .T.A A.T . . . . .A. . . . .G. T. .  
*Eufriesea caeruleascens* . . . . .T . . T GG. A. . . T AG. . . . .A . . . . .A. . .CCA . . . . .C . . . . .TC. . . . .T.A GG. T. . . . .T.A A.T . . . . .A. . . . .T .A . . .  
*Euglossa imperialis* . . . . .T . . A GGA A. . . T AG. . .C . . . . .A. . .CCA . . . . . . . . . . .A . . . . .C . . . . .T.A GG. T. . . . .A A.T . . . . .A. . . . .T . . .  
*Eulaema bombiformis* . . . . . . . A GGA AT. . . T AAG .G . . . . .A. . .TC. . . . .C . . . . .TCA . . . . .T.A GG. T. . . . .C T.A A.T . . . . .T .A . . .  
*Eulaema meriana* . . . . .C . . . . .T GGA AT. . . T AG. G. . . . .C . . . . .A. . .CCA . . . . .C . . . . .A . . . . .TCA . . . . .C . . T.A GG. T. . . . .G.A A.T . . . . .T .A . . .

*Austroplebeia symei* AAT TTT CAA AAT CCA TAT ATA TTA AGA GAT CCT GAT AAT TT  
*Austroplebeia australis* . . . . .  
*Celetrigona longicornis* . . . . .  
*Cephalotrigona capitata* . . . . .  
*Friesella schrottkyi* . . . . .T.T . . . . .A . . . . .T. . . . .  
*Frieseomelitta dispar* . . . . .  
*Frieseomelitta sp* . . . . .A . . . . .T. . . . .T . . . . .  
*Frieseomelitta varia* . . . . .  
*Geotrigona sp* . . . . .A . . . . .T. . . . .A . . . . .  
*Heterotrigona itama* . . . . .G .TA . .C . . . . .C.T . . . . .A . . . . .T. . . . .  
*Lestrimelitta sp* . . . . . . . . . .T . . . . .A . . . . .  
*Lestrimelitta limao* . . . . . . . . . .T . . . . .A . . . . .  
*Leurotrigona muelleri* . . . . .  
*Melipona asilvai* . . . . . . . . . .T . . . . .T. . . . . . . . . .C . . . . .  
*Melipona bicolor* . . . . .C . . . . .T . . . . .A . . . . .  
*Melipona compressipes* . . . . . . . . . .T . . . . .T.T . . . . .A . . . . .  
*Melipona marginata* . . . . .C . . . . .T . . . . .A . . . . .  
*Melipona quadrifasciata* . . . . .C . . . . .  
*Melipona subnitida* . . . . .AA- . . . . .

*Mourella caerulea* ... .-- --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
*Nannotrigona testaceicornis* ... ..A ..G T.. ..T ... T.. ... ..  
*Oxytrigona sp* ... C.. ... ..T ... ..  
*Plebeia phrynostoma* --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
*Plebeia droryana* --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
*Plebeia julianii* ... ..A ... ..T ... T-- --- --- --- --- ---  
*Plebeia wittmanni* ... --- --- --- --- --- --- --- --- ---  
*Plebeia pugnax* ... ..A ... ..T ... T.. ... G.. ... ..A ... ..  
*Plebeia remota* ... ..A ... ..T ... T.. A.. G.. ... ..G ATA .T. ..  
*Plebeia saiqui* ... ..A ... ..T ... T.T ... G.. ... ..- --- ---  
*Plebeia sp* ... ..A ... ..T ... T.. ... G.. ... ..A --- ---  
*Plebeia sp1* ... ..A ... ..T ... T.. ... G.. ... ..A ... ..  
*Schwarziana quadripunctata* ... ..A ... T.. ..T ... ..T ... G.. ... ..  
*Schwarziana sp* ... ..A ... T.. ..T ... ..T ... G.. ... ..  
*Schwarzula sp* ... ..A ... ..T ... ..T ... ..A- --- --- --- ---  
*Schwarzula timida* ... ..A ... ..T ... ..T ... ..C. ... ..G ATA TT. ..  
*Scaptotrigona postica* ... ..A ... T.. ..T ... ..T ... ..A --- ---  
*Scaptotrigona sp* ... ..A ... T.. ..T ... ..T ... ..A --- ---  
*Scaura atlantica* ... ..A ... ..T ... ..T ... ..A ... ..  
*Scaura latitarsis* ... ..A ... ..T ... ..T ... ..A ... ..  
*Scaura longula* ... ..A ... C.. ..T ... ..T ... --- --- --- ---  
*Tetragona dorsalis* ... ..A ... T.. ..T ... ..T C.T ... ..C ..A ... ..C ..  
*Tetragonisca sp* ... ..A ... T.. ..T ... ..T ... ..C ..C .TG AT- --- ---  
*Tetragonula carbonaria* ... ..G ... G.A ..T ..C T.. ..T ..C ..C .TG AT- --- ---  
*Trigona cilipes* ... ..A ... T.. ..T ... ..T ... ..A ... ..  
*Trigona fuscipennis* ... ..A ... T.. ..T ... ..T ... ..A --- --- --- ---  
*Trigona hyalinata* ... ..A ... T.. ..T ... ..T ... ..A --- --- --- ---  
*Trigona hypogea* ..C ..A ... T.. ..T ... ..T ... ..A ... ..  
*Trigona necrophaga* ... ..A ... T.. ... ..T.. ... ..A ... ..  
*Trigonisca sp* ... ..A ... ..T ... ..T ... ..A ... ..  
*Apis mellifera ligustica* ... ..T.. ... ..T.. CAT ... G.. ... ..A ..C ... ..  
*Apis nigrocincta* ... ..C ... T.. ... ..T.. TAC ... G.T ... ..A ... ..C ..  
*Bombus lucorum* ... ..A ... TTA ..T .T. ..G ... ..A ... ..  
*Bombus pennsylvanicus* ... C.. ... TT. ... ..T.. G.. ... ..A ... ..  
*Bombus ruderarius* ... C.. ... TT. ... ..T.. G.G ... ..G ... ..  
*Bombus terrestris* ... ..A ... TTA ..T .T. ... ..G.. ... ..  
*Exaerete frontalis* ... ..T.. ... ..T.. TAT ..T ... ..A ... ..  
*Eufriesea caerulescens* ... ..T.. ... ..T.. TAT ..T ... ..A ..C ... ..  
*Euglossa imperialis* ... ..T.. ..T.. TAT ..T G.. ... ..  
*Eulaema bombiformis* ... ..A ... T.. ... ..TAT ..T ... ..A ... ..  
*Eulaema meriana* ... ..T.. ..T.. TAT ..T ... ..A ... ..

**Apêndice C** - Seqüências nucleotídicas resultantes da união dos fragmentos do DNAr 16S e do citocromo b. Os pontos correspondem a identidade nucleotídica com a primeira seqüência, os hífen correspondem a regiões de gaps. Quando os hífen surgem iniciando ou terminando a seqüência é um indicativo de dados não amostrados.

<i>Austroplebeia symei</i>	TTAAATGGCT	GCAGTATAAC	TAAGTGTACA	AAGGTAGCAT	AATCAATTGA	TTTTTAAATG	AAATCTGGAA	TGAAAGGATT	AATGAAATAT	ATACTGTCTC	ATATATATAT	TT-ATGAATT
<i>Austroplebeia australis</i>	-----	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...C....
<i>Celetrigona longicornis</i>	.....	.....	.....	.....	.....G	.....	.....	.....	.....	.....A	.....A	...A....
<i>Cephalotrigona capitata</i>	-----	...C.	.G....G.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T	...TA	...T....
<i>Friesella schrottkyi</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T	...TA	A-----
<i>Geotrigona sp</i>	--.....	.....G.	.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....	.....	.....T	...TA	...TA....
<i>Heterotrigona itama</i>	.....	.....G.	.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....	.....	.....G	.....A	A--G....
<i>Lestrimelitta limao</i>	..G.....	.....T.	.G.....G.	.....G.	.....G.	.....A.	.....A.	.....	.....	.....T	...T	A-----
<i>Lestrimelitta sp</i>	.....	.....T.	.G.....G.	.....G.	.....A.	.....G.	.....A.	.....	.....	.....T	...T	A-----
<i>Leurotrigona muelleri</i>	-----	-----	.G.....G.	.....G.	.....G.	.....A.	.....T.	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Oxytrigona sp</i>	.....A...	.....C.	.G.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....	.....	.....	.....T	...T....
<i>Melipona asilvai</i>	.....	.....T	.....G.	.....G.	.....G.	.....A.	.....G.	.....	.....	.....	.....	...T....
<i>Melipona compressipes</i>	..T.....	.....G.	.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....	.....	.....T	.....T	...T....
<i>Melipona marginata</i>	.....	.....T	.G.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...T....
<i>Melipona quadrifasciata</i>	..T.....	.....T	.G.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...G....
<i>Mourella caerulea</i>	..T.....	.....G.	.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....A.	.....	.....	.....T	...T....
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	.....	.....G.	.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....G.	.....	.....	.....	.....T	...T....
<i>Plebeia droryana</i>	..T.....	.....G.	.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....	.....	.....	.....T	...T....
<i>Plebeia julianii</i>	.....T.	.....T	.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....	.....	.....	.....T	...T....
<i>Plebeia remota</i>	.....	.....T	.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....	.....	.....	.....T	...T....
<i>Plebeia saiqui</i>	-----	-----	T.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....	.....	.....A	.....T	...T....
<i>Plebeia wittmanni</i>	.....T.	.....G.	.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....	.....	.....	.....T	...T....
<i>Scaptotrigona postica</i>	.....	.....A	.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....A.	.....A.	.....	.....	...A....
<i>Scaptotrigona sp</i>	.....	.....A	.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....A.	.....A.	.....	.....	...A....
<i>Scaura latitarsis</i>	..T.....	.....T	.G.....G.	.....G.	.....G.	.....A.	.....A.	.....	.....	.....	.....T	...T....
<i>Scaura atlantica</i>	..T.....	.....T	.G.....G.	.....G.	.....G.	.....A.	.....A.	.....	.....	.....	.....T	...T....
<i>Scaura longula</i>	..T.....	.....G.	.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....	.....	.....	.....T	...TA....
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	..T.....	.....G.	.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....	.....	.....	.....T	...T....
<i>Schwarzula timida</i>	..T.....	.....A	.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....	.....C.	.....A.	.....T	...T....
<i>Tetragonisca angustula</i>	-----	.....T.	.G.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....	.....	.....	.....T	...TA....
<i>Tetragonula carbonaria</i>	..G.....	.....G.	.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....A.	.....	.....	.....	.....TA	C-----C.
<i>Trigona cilipes</i>	-----	.....C.	.G.....G.	.....G.	.....G.	.....A.T..G	.....T.	.....T.	.....	.....	.....T	...T....
<i>Trigona fuscipennis</i>	..T.....	.....C.	.G.....G.	.....G.	.....G.	.....A.T..G	.....G.	.....C.	.....A.	.....	.....T	...TA....
<i>Trigona hypogea</i>	..T.....	.....C.	.G.....G.	.....G.	.....G.	.....A.T..G	.....G.	.....A.	.....	.....	.....A	...T....
<i>Trigonisca sp</i>	.....	.....T	.....G.	.....G.	.....G.	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	...TA....
<i>Apis mellifera ligustica</i>	.....A...	.....G-T	.G.....G.	.....G.	.....G.	.....A...T	C.....T.	.....GAA.T.T.	.....A.	.....A	TA.....	TA.AT...TA
<i>Bombus pennsylvanicus</i>	..T.....	.....T	.....G.	.....G.	.....G.	.....A.T..G	.....T.	TTT...A.	.....A.	.....G.	.....	...T....
<i>Bombus terrestris</i>	.....	.....G.	.....T	.....G.	.....G.	.....T	.....T.A	.....A.	.....AG.	.....G.	.....C.	...TA
<i>Eufriesea caerulescens</i>	.....A...	.....-T	.G.....G.	.....G.	.....G.	.....T	.....T	C.....T.	.....GAA.	.....A.	.....A.	...T....
<i>Euglossa imperialis</i>	.....A...	.....-T	.G.....G.	.....G.	.....G.	.....T	.....T	C.....T.A	.....GAA.	.....A.	.....	...AT...A.A

<i>Austroplebeia symei</i>	TAAAATTTTA	ATAAAAATGT	TAAAATTTAT	TTATGGGACG	ATAAGACCCT	ATAGAATTTT	ATATTAA-TT	TAATTATTTA	-----A	TTAATAAATA	ATTTAAATTA	ATATTTAATT	
<i>Austroplebeia australis</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..T.....	-----	.....	.....	.....	
<i>Celetrigona longicornis</i>	...T.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	...A...-	..T..T.A..	-----	.....T.AT	TA.....T	.....	
<i>Cephalotrigona capitata</i>	.....	..G.....	...T.....	.....	.....	.....	.....-	..T..T.A.T	-----G	A.G.G.T.A	T...TT..	.....	
<i>Friesella schrottkyi</i>	.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	...C-..	..T..T.G..	A-----T	..A...T.A.	.....G...	.....	
<i>Geotrigona sp</i>	.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	.....	..TT..TA.AT	TA-----T	..A.TATTTA.	..AA.....	.....G..	
<i>Heterotrigona itama</i>	.....	..T.....	...T.....	.....	.....	.....	...GC-A	C.T..TAA..	-----C	.....TGA.	..CA.GT.G..	.....GG..	
<i>Lestrimelitta limao</i>	.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	.....	...A...-	.....T.A..	TA-----	..A.T..T.A.	.....T...G..	
<i>Lestrimelitta sp</i>	.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	TA-----	..A.T..T.A.	.....T...G..	
<i>Leurotrigona muelleri</i>	...T.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	...A...-	..T..T.A..	-----	.....T.A.	..A.....T	.....	
<i>Oxytrigona sp</i>	...T.....	.....	.....	.....	.....	.....	...T-A..	..T..T.A.T	-----T	...A.T.A.	.....T...	.....	
<i>Melipona asilvai</i>	...C.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	...A.-A.	..T..T.A..	-----	.....T.A.	.....T..T	.....	
<i>Melipona compressipes</i>	.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	...A.-A.	..TTA.T.G..	-----	.....T.A.	T.AA.GT..T	.....	
<i>Melipona marginata</i>	.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	...A.-.	..T..T.G..	-----T	.....T.A.	.....T..T	.....	
<i>Melipona quadrifasciata</i>	.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	...A.-A.	...T.A..	-----	...A.T.A.	.....T..T	.....	
<i>Mourella caerulea</i>	.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	...-A.	..T..T.G..	-----	.....T.A.	.....T...	.....	
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	.....	...T.G..	T-----T	..A.C..T.A.	.....T...G..	.....	
<i>Plebeia droryana</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...-A.	...T.A..	A-----T	..A...T.A.	.....T...	.....	
<i>Plebeia julianii</i>	.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	...-A.	...T.A..	A-----T	..A...T.A.	.....T...	.....	
<i>Plebeia remota</i>	.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	...-A.	...T.A..	A-----T	..A...T.A.	.....T...	.....	
<i>Plebeia saiqui</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...-A.	...T.G..	A-----T	..A...T.A.	.....T...G..	.....	
<i>Plebeia wittmanni</i>	.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	...-A.	...T.A..	A-----T	..A...T.A.	.....T...	.....	
<i>Scaptotrigona postica</i>	...T.....	.....	.....	.....	.....	.....	...-A.	..T..T.A..	AATA----T	..A...T.A.	.....T...	.....	
<i>Scaptotrigona sp</i>	...T.....	.....	.....	.....	.....	.....	...-A.	..T..T.A..	AATA----T	..A...T.A.	.....T...	.....	
<i>Scaura latitarsis</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...T-A..	...T.A..	A-----	.....T.A.	.....T...	.....	
<i>Scaura atlantica</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...-A.	...T...-	A-----	.....T.A.	.....T...	.....	
<i>Scaura longula</i>	.....	..T.....	.....	.....	.....	.....	...-A.	...T.A..	A-----	.....T.A.	.....T...	.....	
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	...-A.	..T..T.G..	G-----	.....T.A.	.....T..G	.....	
<i>Schwarzula timida</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...T.A..	A-----	.....TTGA.	..A...T...	.....G..	
<i>Tetragonisca angustula</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...G-..	..T..T.A..	-----T	.....T.A.	.....T...	.....	
<i>Tetragonula carbonaria</i>	.....	..C.....	...T.....	.....	.....	.....	...C-T-CA	..GT..TAA.G	-----G	.....T.A.	..CA.GTGA.G	.....GG..	
<i>Trigona cilipes</i>	...T.....	.....	...AT..	.....	.....	.....	.....	..TT..T.G..	-----C	AA...T.A.	..A.....	.....	
<i>Trigona fuscipennis</i>	...T.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	...-A.	..A.T.A..	-----T	AA...T.A.	.....T...	.....	
<i>Trigona hypogea</i>	...T.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	...-A.	..A.T.A.T	T-----T	..A...T.A.	..A...T...	.....	
<i>Trigonisca sp</i>	...T.....	.....	...T.....	.....	.....	.....	...A...-	..T..T.A..	-----	.....T.A.	..A.....T	.....	
<i>Apis mellifera ligustica</i>	...T.....	G.T.....	TC.....	.....	.....	.....	...A	..T.A.T-..	..T.AAT..AT	TTATAATT-T	..A.TA..TAT	.....G.A.T	..A...G...
<i>Bombus pennsylvanicus</i>	...T.....	G.....	C.T...AAT.	.....	.....	.....	...-A	..-T.AT.---	-----	..A.T..TT.AT	TAAAGT...	.....	
<i>Bombus terrestris</i>	...T.....	G.T.....	C.....	..A.....	.....	.....	...-A	..TT.A...A-	-----T	AATT.T.T..	T.GA.T...	.....TG..	
<i>Eufriesea caerulescens</i>	...T.....	G.T.....	C.....	..G.A.....	..A.....	.....	...A	..A.T-A	AT.A.T..A	AAAATA--T	..T.TT.A.	..ATT.A.T	.....
<i>Euglossa imperialis</i>	...T.....	G.....	C.....	..T.AA.A	.....	.....	...A...-	..T...AA.	AATAATTATT	A.TT..T...	..A.A...T	.....	

*Austroplebeia symei* GGGAGGATTA TTAATTTTAA AAAACTTTAA TTTATA---- ----AAAAC TTTAATTTAA GAAAATA--T TATGATCTTG AATTT-TAAA TTATTAGAAT AAATTACCTT AGGGATAACA  
*Austroplebeia australis* .....T.....  
*Celetterigona longicornis* .....T.....  
*Cephalotrigona capitata* .....A...G.....T.T.....TA.TA----T.....T.....T.A.--A.....T.....-A.....T.....  
*Friesella schrottkyi* .....A.C.....G.T.T.....AA.....T.....T.....-A.....G.....  
*Geotrigona sp* .....A.....TT.T.....A.T.....T.....A-A.....T.....T.....-A.T.....  
*Heterotrigona itama* .....C.....CT.....T.G----TT.....G.....T.....C.....A.....-A.....ATC.....T.....  
*Lestrimelitta limao* .....A.....T.T.....A.G----T.....AG.....T--.....T.....T.T.....-A.....T.....  
*Lestrimelitta sp* .....A.....T.T.....A.....T.....AG.....G.....T--.....T.....T.T.....-A.....T.....  
*Leurotrigona muelleri* .....T.....T.....T.....GG.....T.....TAT.....T.....AA.T.....A.....  
*Oxytrigona sp* .....A.....T.T.....A.....G.....A.....A.--A.....T.....-A.....TAA.....  
*Melipona asilvai* .....A.....T.T.....A.A.----T.....T.....TAAAT.....T.....-A.....TA.....  
*Melipona compressipes* .....A.....T.T.....T.T.----T.....G.....T.....T-GA.....T.....-A.....  
*Melipona marginata* .....A.....G.T.T.....TGG----TTT.....A.....A.AT.....T.....-A.....A.G.....  
*Melipona quadrifasciata* .....A.....TG.T.....T.....T.....TAGA.....AT.....T.....-A.....TA.....  
*Mourella caerulea* .....A.....T.....A.....T.....A.....A.A.....T.....-A.....A.....T.....  
*Nannotrigona testaceicornis* .....A.....T.....A.A.A----G.....A.A.....T.....-A.....A.....  
*Plebeia droryana* .....A.....TG.T.....A.....TT.....AT.....T.T.....-A.....A.....T.....  
*Plebeia julianii* .....A.....T.T.....A.....T.....AT.....T.T.....T.....A-A.....T.....  
*Plebeia remota* .....A.....T.T.....A.....T.....AT.....T.T.....-A.....A.....T.....  
*Plebeia saiqui* .....A.....T.T.....A.....T.....AT.....T.T.....-A.....A.....T.....  
*Plebeia wittmanni* .....A.....T.T.....A.....T.....AT.....T.T.....T.....A-A.....A.....T.....  
*Scaptotrigona postica* .....A.....T.....A.A.----T.....A.....T.....T.....A.....-A.....A.....  
*Scaptotrigona sp* .....A.....T.....A.A.----T.....A.....T.....T.....A.....-A.....A.....  
*Scaura latitarsis* .....A.....T.T.....AA.....T.....T.....T.....A.T.....-A.....  
*Scaura atlantica* .....A.....T.T.....AA.A.----T.....T.....T.....TA.T.....-A.....G.....  
*Scaura longula* .....A.....T.T.....T.....T.....T.....T.....-A.....  
*Schwarziana quadripunctata* .....A.....T.....A.A.----T.....A.....A.....T.....-A.....A.....T.....  
*Schwarzula timida* .....A.....T.T.....A.G----T.....AG.....T.....A.....-.....T.T.....  
*Tetragonisca angustula* .....A.....TG.T.....T.G----T.....AG.....T.....TA.--.....T.....T.AT.....T.....-AT.....T.....  
*Tetragonula carbonaria* .....C.....TG.....C.G----T.....G.....TT-G.....A.C.....T.....A.....-A.....AT.....T.....  
*Trigona cilipes* .....A.....T.T.....A.T.----TT.....G.....T.....T--.....T.....T.....-A.....C.....T.....  
*Trigona fuscipennis* .....A.....T.T.....AA.A.----T.....A.....T.....A.....T.....G.....-A.....A.....  
*Trigona hypogea* .....A.....T.T.....AA.G----TG.....A.A-A.....GT.....T.....-A.....A.....  
*Trigonisca sp* .....T.....T.....G.....AT--.....T.....-A.....A.....G.....  
*Apis mellifera ligustica* .....G.G.....T.....T.....A.G.T----TT.T.....G.....AT.....AG.T.ATT.....T.....AT.AT.....A.....-GT.....AA.....  
*Bombus pennsylvanicus* .....A.....T.....T.....A.AAT----G.....TT.....TT.....AT.....T.....T.....A.....C.AA.....  
*Bombus terrestris* .....AG.G.....T.T.....A.TA--TT.....T.....T.....T.....T.G.A-A.....G.AA.....G.....  
*Eufriesea caerulescens* .....A.A.....TT.....T.....TA.TT----T.....G.....T.....ATTAA.....T.....A.AA.....T.A.A.-T.....A.....A.A.....  
*Euglossa imperialis* .....T.A.....T.....T.A.....TAAT TAAATT.....G.....T.....TTAA.....T.....A.A.....T.A.A.-T.....AA.A.A.....

<i>Austroplebeia symei</i>	CGGTAATATT	TTTTTATAGA	TCATTATAGAA	AAAAATGATT	GCGACCTCG	ATGTTGAATT	AAGATAAATT	TTAAAT-TTA	CGAAATTTAT	TTTATTGTTC	ATATAAATTA	ACTTATACAT
<i>Austroplebeia australis</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..T...---	-----	-----	.....	.....
<i>Celetrigona longicornis</i>	...T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..T...---	-----	-----A..	..T.....	.....GTT.
<i>Cephalotrigona capitata</i>	.....	.....G	.....A	.....G	.....	.....	.....	.....-AG.	..T.....	.....A...	..T...C..	.....GT..
<i>Friesella schrottkyi</i>	.....	.....	.....G	.....G	.....	.....	.....	.....-A..	.....	.....A...	..T.....	TA...GT..
<i>Geotrigona sp</i>	...T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....-AG.	.....	A...A...	..T.....	.....GT..
<i>Heterotrigona itama</i>	.....	.....G	.....	.....	.....	.....A..G-	-----C.T	..GGAA...	AC...A...	..T...GA..	.....	.....A.GTT.
<i>Lestrimelitta limao</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C-A..	.....	.....A...	..T.....	TT.A..GT..
<i>Lestrimelitta sp</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C-A..	.....	.....A...	..T.....	TT.A..GT..
<i>Leurotrigona muelleri</i>	...T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....----	-----	-----	--T.....T	..AGG.GTT.
<i>Oxytrigona sp</i>	...T.....	.....AC	.....	.....	.....	.....	.....	.....C-AG.	.....	A...C.A...	..T.....	.....
<i>Melipona asilvai</i>	...T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....-AG.	.....	.....A...	..T.....	.....GT..
<i>Melipona compressipes</i>	...T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....-AG.	.....	.....A...	..T.....	..T...GT..
<i>Melipona marginata</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....-AG.	.....C...	.....	..T.....	.....C.GT..
<i>Melipona quadrifasciata</i>	...T.....	.....A	.....	.....	.....	.....	.....	.....-AGT	..T.....	.....A...	..T...C.T	..T...GT..
<i>Mourella caerulea</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.-GG	.....	.....A...	T.T.....	CA...GTT.
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	...T.....	.....G	.....	.....	.....	.....	.....	.....-AG.	..T.....	A...A...	..T...C.T	..T.AG.G...
<i>Plebeia droryana</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....-AG.	.....	.....A...	..T.....	.....GTT.
<i>Plebeia julianii</i>	.....	.....A	.....	.....	.....	.....	.....	.....-AG.	.....	A...C.A...	..T.....	.....GT..
<i>Plebeia remota</i>	.....	.....A	.....	.....	.....	.....	.....	.....---	.....	.....A...	..T.....	..T...GT..
<i>Plebeia saiqui</i>	.....	.....	.....C	.....	.....	.....A	.....	.....-	-----	-----	-----	.....GTT.
<i>Plebeia wittmanni</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....-	-----	.....A...	..T.....	.....GT..
<i>Scaptotrigona postica</i>	...T.....	.....AC	.....	.....	.....	.....	.....	.....-GG.	.....	A...A...	..T.....	.....GTT.
<i>Scaptotrigona sp</i>	...T.....	.....AC	.....	.....	.....	.....	.....	.....-	-----	-----	-----	.....GTT.
<i>Scaura latitarsis</i>	...T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....-GG.	.....	...C.A...	..T...C.T	..G...GTT.
<i>Scaura atlantica</i>	...T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....-GG.	.....	.....A...	..T...C.T	..A...GTT.
<i>Scaura longula</i>	...T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....-AG.	.....	.....A...	..T...C.T	..A...GTT.
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....-	-----	-----	-----	-AC...GT..
<i>Schwarzula timida</i>	...T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....-AG.	.....	.....A...	..T...C.T	..A.C...GTT.
<i>Tetragonisca angustula</i>	...T.....	.....G	.....	.....	.....C	.....	.....	.....-	-----	-----A.TACT	C.T.T..A.T	.....GTT.
<i>Tetragonula carbonaria</i>	...T..C.	.....G	C.AC	.....G	.....	.....	.....	..G.---	..GGGAA...	.....C...	..T...G...	.....AGAGTC.
<i>Trigona cilipes</i>	.....	.....G	A.A	.....	.....	.....	.....	.....-A..	.....	A...AC...	..T...C.T	..AA...GTT.
<i>Trigona fuscipennis</i>	.....	.....G	.....	.....	.....	.....	.....	.....-	-----	-----	--T.....	.....GT..
<i>Trigona hypogea</i>	.....	.....G	A	.....	.....	.....	.....	.....-AGT	.....	A...AC...	..T.....	.....GT..
<i>Trigonisca sp</i>	...T.....	.....G	.....	.....	.....	.....	.....	.....-	-----	-----	-----	---A..GTT.
<i>Apis mellifera ligustica</i>	.....C	.....G	.....A	.....T	.....G	.....T	.....G..AA	..GGC-AGT	.....	.....	.....	.....A.A..GT..
<i>Bombus pennsylvanicus</i>	.....C	.....A	.....G	TT.T	.....G	.....T	.....	.....C-GCT	.....A	.....A	.....T.....	TT.C.AGTT.
<i>Bombus terrestris</i>	.....C	.....A	.....T	.....G	.....	.....	.....	.....-GC	.....G	.....A	.....T.....	..T.C.AGTT.
<i>Eufriesea caerulescens</i>	.....C	.....A	T	.....A	TA.T	.....G	.....T	.....G	-GC	.....C.A	.....T.....	..T.ATAGT..
<i>Euglossa imperialis</i>	.....C	.....A	T	A.AA	TA.T	.....G	.....	.....-GCT	.....	.....A	.....T.....	..A.ATAGTT.

<i>Austroplebeia symei</i>	GATTTTTTGG	AAATTTAATT	TTTTTATTAT	CAATAATAAC	AGCATTTTTA	GGATATATTT	TACCATGAGG	TCAAATATCA	TTTTGAGGTG	CAATAGTTAT	TACAAATTTA	TTAAGAGCAA																			
<i>Austroplebeia australis</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....																			
<i>Celetterigona longicornis</i>	..AA.	.GAAC.	.A.T.	.T.GCT.	.....	.T.GA.	.....	.....	.A.	.A.	.T.	.A.	.T.	.....	.TC.	..T															
<i>Cephalotrigona capitata</i>	..A.G.A.	.GAA.	.A.T.	.T.GC.	T.	.....	.G.G.	.....	A.	.....	.A.	.T.	.A.	.T.	.....	.TC.	..TT														
<i>Friesella schrottkyi</i>	..A.AA.	.GAA.	.A.T.	.T.GC.	.....	.....	.G.	.....	A.	.....	.A.	.A.	.T.	.....	.T.	.....	.TC.	..T													
<i>Geotrigona sp</i>	..AA.	T.GAA.	.A.T.	.....	.GC.	T.	.....	.G.A.	.....	.T.	A.	.....	.A.	.....	.A.	.T.	.....	.TC.	..TT												
<i>Heterotrigona itama</i>	..A.AA.	.G.AC.C.	.A.TC.T.	.T.GCT.	T.	.....	C.T.	.....	G.C	T.	.....	A.	.....	G	.....	.A.	.....	.G.G	..TC.												
<i>Lestrimelitta limao</i>	..AAC.	.GAA.	.A.T.	.....	.....	T.T.A.	.....	.G.	.....	.G.G.	A.	.....	.A.	.....	.A.	.T.	.....	.TCT.	..T												
<i>Lestrimelitta sp</i>	..AAC.	.GAA.	.A.T.	.....	.....	T.T.A.	.....	.G.	.....	.T.	A.	.....	.A.	.....	.A.	.T.	.....	.TCT.	..T												
<i>Leurotrigona muelleri</i>	..AA.	.GAA.	.A.T.	.T.GCT.	T.	.....	G	.....	.G.A.	.....	.....	.....	.A.	.....	.T.	.....	.....	.TCT.	..T												
<i>Oxytrigona sp</i>	..A.AA.	.CAAC.	.A.T.	.....	.GCT.	.....	A.	.....	.G.A.	.....	A.	.....	.T	.....	.A.	.....	.A.	.....	.TC.	..T											
<i>Melipona asilvai</i>	..A.AA.	.GAA.	C.A.TA.	.....	.GC.	T.	.....	C.	.....	CG.	.....	.....	.T	.....	.A.	.....	.A.	.....	C.T.	..C	..TC.	..TT									
<i>Melipona compressipes</i>	..A.A.	.....	.A.	.....	.GC.	T.	.....	C.T	.....	.G.A.	.G.	.....	.....	.....	.A.	.....	.T.	.....	.TC.	..C											
<i>Melipona marginata</i>	..A.AA.	.GAA.	.A.T.	.....	.GC.	T.	.....	C.	.....	.G.A.	.....	.....	.....	.....	.A.	.....	.T.	.....	.TC.	..T											
<i>Melipona quadrifasciata</i>	..A.AA.	.GAA.	.A.T.	.....	.GC.	T.	.....	.T.	.....	.G.	.....	.T.	.....	.....	.T	.....	.A.	.....	.A.	.T.	..CC.	..TC.	..T								
<i>Mourella caerulea</i>	..ACAA.	.GAGC.	.....	.TC.	.T.GC.G.	T.	.....	.T.	.....	.G.	.....	.T.	.....	A.	.....	.A.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.TC.	..T							
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	..A.GA.	.TG.	.A.T.	.T.GC.	T.	.....	T.T.	.....	.G.A.	.....	.....	.G.	.....	.....	.G.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.TC.	..T						
<i>Plebeia droryana</i>	..AA.	.GAA.	.A.T.	.....	.T.GC.	T.	.....	.....	.T.	.....	.G.	.....	.T.	.....	A.	.....	.A.	.....	.T.	.....	.....	.....	.....	.TC.	..T						
<i>Plebeia julianii</i>	..AA.	.GAA.	.A.T.	.....	.GC.	T.	.....	A.	.....	.G.A.	.....	.T.	.....	A.	.....	.A.	.....	.T.	.....	.TC.	..T										
<i>Plebeia remota</i>	..AA.	.GAA.	.A.T.	.....	.GC.	T.	.....	T.	.....	.G.A.	.....	.T.	.....	A.	.....	.A.	.....	.T.	.....	.TC.	..T										
<i>Plebeia saiqui</i>	..AAC.	.GAA.	.A.T.	.....	.T.GC.	T.	.....	.....	.G.	.....	.T.	.....	A.	.....	.A.	.....	.A.	.....	.T.	.....	.....	.....	.....	.TC.	..T						
<i>Plebeia wittmanni</i>	..AA.	.GAA.	.A.T.	.....	.GC.	T.	.....	.....	.G.A.	.....	.T.	.....	.....	.....	.A.	.....	.A.	.....	.T.	.....	.....	.....	.....	.TC.	..T						
<i>Scaptotrigona postica</i>	..AA.	T.GG.	.....	.G.T.	.T.GCT.	T.	.....	.....	.G.	.....	.T.	.....	A.	.....	.G.	.....	.T.	.....	.A.	.....	.....	.....	.....	.TC.	..TT						
<i>Scaptotrigona sp</i>	..AA.	T.GA.	.....	.A.T.	.T.GGCT.	T.	.....	.....	.G.	.....	.T.	.....	A.G.	.....	.A.	.....	.T.	.....	.A.	.....	.....	.....	.....	.TC.	..TT						
<i>Scaura latitarsis</i>	..AA.	.GA.	.....	.A.T.	.T.GC.	T.	.....	.....	.G.	.....	.....	.G.	.....	.....	.A.	.....	.T.	.....	.A.	.....	.....	.....	.....	.TC.	..TT						
<i>Scaura atlantica</i>	..AA.	.GA.	.....	.A.T.	.T.GC.	T.	.....	.....	.G.	.....	.....	.....	.....	.....	.A.	.....	.T.	.....	.A.	.....	.....	.....	.....	.TC.	..TT						
<i>Scaura longula</i>	..AA.	T.GAA.	.....	.A.T.	.T.GC.	T.	.....	.....	.G.A.	.....	.A.	.....	.....	.....	.A.	.....	.A.	.....	.T.	.....	.....	.....	.....	C.TC.	..TT						
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	..A.AA.	.GAAC.	.....	.TC.G.	.T.GC.G.	T.	.....	.....	.T.G.	.....	.T.	.....	A.	.....	.A.	.....	.A.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.GTC.	..T						
<i>Schwarzula timida</i>	..AA.	.GAA.	.A.A.	.T.GC.	T.	.....	.....	.G.A.	.....	.A.	.....	.....	.....	.....	.A.	.....	.A.	.....	.T.	.....	.....	.....	.....	.TC.	..TT						
<i>Tetragonisca angustula</i>	..A.	TGTA.	.T.	.A.T.	.T.GCT.	T.	.....	.....	.G.	.....	.....	.....	.....	.....	.A.	.....	.T.	.....	.A.	.....	.....	.....	.G	.....	.TC.	..TT					
<i>Tetragonula carbonaria</i>	..A.G.	.GAACT.	A.A.C.	.T.GC.	T.	.....	.G.C.T	.G.CG.C	T.G.G.	.....	.G.	.....	G	.....	.A.	.....	.T.	.....	.G.	.....	.....	.....	C.T	.....	.TCT.	..T					
<i>Trigona cilipes</i>	..AAGA.	.GAG.T.	.A.T.	.....	.GCT.	.....	.....	.G	.....	.T.G.A.	.....	.T.	.....	A.	.....	.GCT.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.TC.	..T					
<i>Trigona fuscipennis</i>	..AAGA.	T.GAA.	.A.T.	.T.GC.	T.	.....	.....	CG.C	.....	A.	.....	.....	.....	.A.	.....	.A.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.TC.	..TT					
<i>Trigona hypogea</i>	..AACA.	.GAA.T.	.A.TA.	.T.GCT.	T.	.....	.....	.T.G.A.	.....	.G.	A.	.....	.....	.....	.....	.A.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.TCT.	..T					
<i>Trigonisca sp</i>	..A.AA.	.GAAC.	.A.T.	.....	.T.GCT.	.....	.....	.G.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.G.	.....	.A.	.....	.T.	.....	.....	.....	.....	.....	.TC.	..T					
<i>Apis mellifera ligustica</i>	..GGAA.	.T.A.	C.	.....	.A.	.....	.GC.G.	T.	.....	A.	.....	.G.AC	.....	A.	.....	.A.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.C.	.....	.T.	.....	.C.T	..TC.	..T
<i>Bombus pennsylvanicus</i>	..A.AA.	TGTAAC.	.A.T.	.....	.GC.	T.	.....	.....	.T.G.C	T.	.....	.....	.....	.....	.A.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	A.TTC.	.....					
<i>Bombus terrestris</i>	..CAA.	TGTA.C.	.A.T.	.....	.GC.	.....	.....	C.	.....	.T.G.	.....	A.	.....	.....	.....	.A.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C.	.....	A.TTC.	.....			
<i>Eufriesea caerulescens</i>	..A.	.T.	.....	.A.A.T.	.....	.G.	.....	T.A.	.....	.T.G.	.....	.T.	.....	A.	.....	.T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.TCT.	.....			
<i>Euglossa imperialis</i>	..AA.A.	T.T.AC.	.....	.....	.....	.....	.....	A.	.....	.T.G.	.....	.T.	.....	A.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	A.	.....	.TCT.	..T		

<i>Austroplebeia symei</i>	TTCCTTATAT	TGGAATATA	ATTGTAATAT	GAATTTGAGG	AGGATATTC	ATTAATAAAT	CTACATTA	TCGATTTTTT	TCTTTACATT	TTATTATTCC	TTTAATTATT	TTTATATTAA
<i>Austroplebeia australis</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Celestrigona longicornis</i>	.A.....	.....A...	.....GAG.	...A.....	.....T...	.....A.....	.....A.....	.....T.A...	.....T.A...	.....T.A...	.....A.G.	.....A.G
<i>Cephalotrigona capitata</i>	.A.A.....	.....AT..	.C...TGA.	..T.A.....	.....TC...	.....A.T.....	.....A.T.....	.....A.T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.A.G	.....A.A.G
<i>Friesella schrottkyi</i>	.A.....	.....A...	.....TGA.	..T.A.....	.....T...	.....A.T.....	.....C...	.....A.T.....	.....C...T.A...	.....C...T.A...	.....A.A...	.....A.TA.G
<i>Geotrigona sp</i>	.A.A.....	.....A...	.....TGA.	..T.A.....	.....T...	.....A.T.....	.....A.....	.....A.T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.A...	.....A.A.G
<i>Heterotrigona itama</i>	...A.....	A.....	.....GAG.	.GT.A.....	.....T...T	.....T.C.C.	.....A.....	.....A.....	.....T.A...	.....A.T.C...	.....C...T...G	.....C...T...G
<i>Lestrimelitta limao</i>	.A.....	...T.A...	.....TGA.	.....T.....	.....A.T.....	.....A.....	.....A.....	.....T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.A.G	.....A.A.G
<i>Lestrimelitta sp</i>	.A.....	...T.A...	.....TGA.	.....T.....	.....A.T.....	.....A.....	.....A.....	.....T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.A.G	.....A.A.G
<i>Leurotrigona muelleri</i>	.A.....G.	...TC.A.G	.....GA.	.....T...T	.....A.T.....	.....A.....	.....A.T.....	.....A.T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.A.G	.....A.A.G
<i>Oxytrigona sp</i>	.A.....	...T.A...	.....TGA.	.....T.....	.....A.T.....	.....AA.T...	.....C...	.....A.T.....	.....C...T.A...	.....C...T.A...	.....A.T...	.....AT.TA.G
<i>Melipona asilvai</i>	.A.C.....	...C.A...	G.A.TGA.	.....T.....	.....A.C.....	.....C...	.....A.T.....	.....C...T.A...	.....C...T.A...	.....A.....	.....T.TA.G	.....T.TA.G
<i>Melipona compressipes</i>	.A.....	...C.ATC.	.CA...GA.	.....T...T	.....A.T.....	.....C	.....A.T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.T...	.....A.A.G	.....A.A.G
<i>Melipona marginata</i>	.A.....	...TC.A...	.A...GA.	.....TC...	.....A.C.....	.....A.T.....	.....C...T.A...	.....C...T.A...	.....A.T...	.....A.T...	.....A.A.G	.....A.A.G
<i>Melipona quadrifasciata</i>	.A.....	...TC.A...	.CA.TGA.	.....T.....	.....A.T.....	.....A.T.....	.....A.T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....AA.....	.....T.A.G	.....T.A.G
<i>Mourella caerulea</i>	.A.....	.....A...	.....TGA.	..G.A.....	T...T...	.....A.T.....	.....A.T.....	.....C.T...	.....T.A...	.....T.A...	.....A.A.G	.....A.A.G
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	.....	...G.GA...	.....GAG.	.....T.....	.....A.T.....	.....T...A.	.....A.T.....	.....T.G...	.....T.G...	.....T.A...	.....A.A.G	.....A.A.G
<i>Plebeia droryana</i>	.A.....	...C.A...	.....TGA.	..G.A.....	T...T...	.....A.T.....	.....A.T.....	.....T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.A.G	.....A.A.G
<i>Plebeia julianii</i>	.A.A.....	...C.....	.....TGA.	..A.....	.....T...	.....A.....	.....A.....	.....T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....T...G.	.....A.A.G
<i>Plebeia remota</i>	.A.A.....	...C.A...	.....TGA.	..G.A.....	T...T...	.....A.....	.....A.....	.....T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.A.G	.....A.A.G
<i>Plebeia saiqui</i>	.A.....	.....A...	.....TGA.	..G.A.....	T...T...	.....A.....	.....A.....	.....T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.A.G	.....A.A.G
<i>Plebeia wittmanni</i>	.A.A.....	...C.G...	.....GA.	..A.....	T...T...	.....A.....	.....A.....	.....T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.A.G	.....A.A.G
<i>Scaptotrigona postica</i>	.A.....	...T...T	.A.TGA.	..T.A...G.	.....T...C.	.....T.....	.....A.T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....T.....	.....AT...G	.....AT...G
<i>Scaptotrigona sp</i>	.A.....	.....T	.A.TGA.	..T.A.....	G...T...	.....A.T.....	.....A.T.....	.....A.T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....AT...G	.....AT...G
<i>Scaura latitarsis</i>	.A.....	...TC.A...	.....TGA.	..T.A.....	.....T...	.....A.T.....	.....A.T.....	.....A.T.....	.....C...T.A...	.....C...T.A...	.....A.A.G	.....A.A.G
<i>Scaura atlantica</i>	.A.....	...TC.A...	.....TGA.	..T.A.....	.....T...	.....A.T.....	.....A.T.....	.....A.T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.A.G	.....A.A.G
<i>Scaura longula</i>	.A.....	...C.A...	.....TGA.	..T.A.....	.....T...	.....A.C.....	.....A.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.....	.....A.TA...	.....A.TA...
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	.A.....	.....A...	.....TGA.	..G.A.....	.....T...T	.....A.T.....	.....A.T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.....	.....A.A.G	.....A.A.G
<i>Schwarzula timida</i>	.....	...C.A.C.	.....TGA.	..A.....	.....T...	.....A.T.....	.....A.T.....	.....A.T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.T.C...	.....A.A.G
<i>Tetragonisca angustula</i>	.....	...C.A...	.....TGAG.	..T.A.....	.....T.T...	.....T.....	.....A.T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.....	.....A.A.A.GG	.....A.A.A.GG
<i>Tetragonula carbonaria</i>	.C.C..CG.	A..T.GATCT	.....GGAG.	..T.A.....	.....T...C.	.....T...G.	.....C...	.....G.CC.A.	.....A..TT.C..C	.....C.AT.TC.TG	.....C.AT.TC.TG	.....C.AT.TC.TG
<i>Trigona cilipes</i>	.A.A.....	...C.A.C.	.....TGA.	..T.A.....	.....T...	.....A.T.....	.....A.T.....	.....A.T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.A.A.G	.....A.A.A.G
<i>Trigona fuscipennis</i>	.A.....	...TC.A...	.....GA.	..T.A.....	.....T...C.	.....A.C.....	.....A.T.....	.....A.T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.T...G	.....A.T...G
<i>Trigona hypogea</i>	.A.....	...C.A...	.....TGA.	..T.A.....	.....T...	.....A.....	.....A.....	.....C.....	.....T.A...	.....T.A...	.....C...A.G	.....C...A.G
<i>Trigonisca sp</i>	.A.....	...T.A...	.....TGA.	..G.A.....	.....TC..T	.....A.T.....	.....A.T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.....	.....A.A.G	.....A.A.G
<i>Apis mellifera ligustica</i>	.....	...TG...C.	.....T...	.....T...T...	.....TG...G	.....T.....	.....T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A..T.A...	.....AT.TA.G	.....AT.TA.G
<i>Bombus pennsylvanicus</i>	.....	...C.AT.T	.CA.TGA.	.....T...T...	.....G A	.....A.....	.....A.....	.....A.T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....C...T...G	.....C...T...G
<i>Bombus terrestris</i>	.....A.....	...TC.AT.T	.C...TGA.	.....T...T...	.....C...G A	.....A.....	.....A.....	.....A.T.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.T...G	.....A.T...G
<i>Eufriesea caerulescens</i>	.....C--	...C.AT.T	T.A...GA.	.....T...T...	.....G	.....A.T.....	.....A.....	.....A.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.A.G	.....A.A.G
<i>Euglossa imperialis</i>	.....	...C.AT..	T.A...GA.	.....T...T...	.....T.....	.....A.....	.....A.....	.....T.A...	.....T.A...	.....A.....	.....A.A...	.....A.A...

<i>Austroplebeia symei</i>	TATTATTTC	TTTAATAAA	TTACATTTAT	CTGGTTCATC	TAATCCAATC	CATTCAAAA	TAAATATTTA	TAAAGTTATT	TTTTATCCTT	ATTTTATTAT	TAAAGATTTA	ATTACAATTA
<i>Austroplebeia australis</i>	ATA	T	A	A	T	A	AT	A	A	A	A	T
<i>Celestrigona longicornis</i>	ATA	T	CA	GA	A	T	A	AT	A	C	A	T
<i>Cephalotrigona capitata</i>	T	C	T	A	T	A	T	C	A	C	A	CA
<i>Friesella schrottkyi</i>	ATA	A	T	A	T	T	A	T	C	C	A	CC
<i>Geotrigona sp</i>	TA	A	T	TG	A	T	A	T	A	C	GA	TCA
<i>Heterotrigona itama</i>	TA	T	C	T	A	TA	A	T	A	T	A	TA
<i>Lestrimelitta limao</i>	TA	T	C	T	A	TA	A	T	A	T	A	TA
<i>Lestrimelitta sp</i>	TA	T	C	T	A	TA	A	T	A	ATG	A	A
<i>Leurotrigona muelleri</i>	T	A	GT	A	TA	A	T	T	A	ATG	A	A
<i>Oxytrigona sp</i>	T	AC	A	C	T	GT	A	A	T	A	AT	A
<i>Melipona asilvai</i>	T	A	C	C	T	A	A	T	T	A	T	A
<i>Melipona compressipes</i>	T	CA	T	C	A	T	A	T	T	C	A	A
<i>Melipona marginata</i>	TA	C	A	T	A	T	A	T	C	CT	A	A
<i>Melipona quadrifasciata</i>	T	A	C	C	T	G	A	A	T	T	T	A
<i>Mourella caerulea</i>	C	TA	A	A	T	GT	A	TA	A	AG	A	T
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	G	ATA	A	GT	A	A	T	T	T	AT	A	CC
<i>Plebeia droryana</i>	TA	T	A	T	A	TA	A	T	A	AT	A	A
<i>Plebeia julianii</i>	TA	GT	A	TA	A	TAT	A	T	A	AT	A	A
<i>Plebeia remota</i>	ATA	T	A	T	A	TA	A	GT	A	AT	A	A
<i>Plebeia saiqui</i>	TA	T	A	T	A	T	A	T	A	AT	A	A
<i>Plebeia wittmanni</i>	TA	C	T	G	A	TA	A	T	A	AT	A	A
<i>Scaptotrigona postica</i>	TA	GT	A	TA	GA	A	TA	T	A	AT	GA	A
<i>Scaptotrigona sp</i>	TA	GT	A	TA	GA	A	TA	T	A	AT	GA	A
<i>Scaura latitarsis</i>	T	A	T	A	T	A	A	T	A	AT	A	G
<i>Scaura atlantica</i>	T	A	T	A	T	A	A	T	A	AT	A	G
<i>Scaura longula</i>	T	A	T	CA	T	A	A	T	T	A	AT	A
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	T	A	A	T	G	A	A	AG	A	T	T	G
<i>Schwarzula timida</i>	AT	A	T	A	A	A	C	T	A	A	A	A
<i>Tetragonisca angustula</i>	TA	GT	G	A	T	TAG	T	A	A	AT	G	A
<i>Tetragonula carbonaria</i>	A	TGC	C	TGT	C	C	A	T	A	A	G	G
<i>Trigona cilipes</i>	T	A	T	A	A	A	A	T	A	A	CC	C
<i>Trigona fuscipennis</i>	TA	A	T	T	A	T	A	T	A	A	A	G
<i>Trigona hypogea</i>	TA	A	TC	A	A	T	A	T	A	AC	A	CA
<i>Trigonisca sp</i>	TA	A	GT	A	TA	A	A	T	A	AT	C	A
<i>Apis mellifera ligustica</i>	TA	TC	T	TGCC	A	A	T	C	T	GGA	T	T
<i>Bombus pennsylvanicus</i>	T	TA	GT	A	TA	A	A	T	A	TC	T	A
<i>Bombus terrestris</i>	TA	A	T	CA	TA	A	A	T	A	C	T	A
<i>Eufriesea caerulescens</i>	T	A	T	T	A	A	A	T	T	GG	A	TA
<i>Euglossa imperialis</i>	A	TA	A	T	T	TA	A	A	A	GGAA	TA	G

<i>Austroplebeia symei</i>	TTATTTTATT ATTAATTTTT ATATTAATTA ATTTTCAAAA TCCATATATA TTAAGAGATC CTGATAATTT
<i>Austroplebeia australis</i>	....G....
<i>Celetrigona longicornis</i>	..T.AA.T... ..T.A... ..AT...-
<i>Cephalotrigona capitata</i>	..T..A.T... ..A... ..
<i>Friesella schrottkyi</i>	..T.AA.TA. ....T... ..T.T .....
<i>Geotrigona sp</i>	....AA.T... ..T... ..A...T... ..
<i>Heterotrigona itama</i>	.AT..ACTA. T...T.A... ..C.TT.A. ....G.T A..C...C.T .....
<i>Lestrimelitta limao</i>	..T..A.T... ..A... ..T... ..T... ..A... ..
<i>Lestrimelitta sp</i>	..T..A.T... ..A... ..C... ..T... ..A... ..
<i>Leurotrigona muelleri</i>	....AA.T... ..T.A... ..
<i>Oxytrigona sp</i>	..T.AA.T... ..A... ..T... ..C... ..T... ..
<i>Melipona asilvai</i>	....AA.T... ..T... ..T... ..T... ..C... ..
<i>Melipona compressipes</i>	....AA.TA. A..... ..T... ..T... ..A... ..
<i>Melipona marginata</i>	A..AA.TA. .... ..C... ..T... ..A... ..
<i>Melipona quadrifasciata</i>	....AA.TC. ....T.A... ..T... ..CC... ..
<i>Mourella caerulea</i>	.AG.AA.T... ..TG... ..
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	....GA.T... ..T... ..G...TG... ..A..GT. ...T...T... ..
<i>Plebeia droryana</i>	....T... ..G... ..AT... ..
<i>Plebeia julianii</i>	..T.A..T... ..A... ..AT... ..A... ..T...T-- ..
<i>Plebeia remota</i>	..T.A..T... ..A... ..AT... ..A... ..T...T... A..G..... .GATA.T...
<i>Plebeia saiqui</i>	....T... ..A... ..AT... ..A... ..T...T.T ...G.....
<i>Plebeia wittmanni</i>	..T.A..T... ..A... ..AT... ..
<i>Scaptotrigona postica</i>	..T..A.T... ..TG... ..T... ..A...T... ..T... ..A-----
<i>Scaptotrigona sp</i>	.AT..A.T... ..T... ..T... ..A...T... ..T... ..A-----
<i>Scaura latitarsis</i>	A.T.AG.T... ..C.T... ..A... ..T... ..A... ..
<i>Scaura atlantica</i>	A.T.AG.T... ..C... ..T... ..A... ..T... ..A... ..
<i>Scaura longula</i>	..T.AA.T... ..C... ..AT... ..A...C... ..T... ..
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	A..AA.T... ..T... ..A...T... ..T... ..T... ..G... ..
<i>Schwarzula timida</i>	..T..A.T... ..AT... ..A... ..C... ..A...T...
<i>Tetragonisca angustula</i>	..T.AA.T... ..T... ..G.AT... ..A...T... ..T... ..
<i>Tetragonula carbonaria</i>	..G..A.T... ..C.G.C...C ..G.TC... ..G...G. A..T..CT... ..T..C... ..
<i>Trigona cilipes</i>	..T.A.CT... ..CA... ..T... ..A...T... ..
<i>Trigona fuscipennis</i>	.AT.AA.T... ..T... ..T... ..A...T... ..T... ..
<i>Trigona hypogea</i>	..T..A.T... ..T... ..C...A...T... ..T... ..A... ..
<i>Trigonisca sp</i>	..T.AA.T... ..T.A... ..T... ..A... ..T... ..A... ..
<i>Apis mellifera ligustica</i>	A...CA.C... ..T..C... ..C... ..TT... ..CAT... ..G... ..A..C... ..
<i>Bombus pennsylvanicus</i>	....AA... T...T.A... ..A.T... ..C... ..TT... ..G... ..A... ..
<i>Bombus terrestris</i>	..T..AC... T.C...A... ..A... ..A...TT A..T.T... ..G... ..
<i>Eufriesea caerulescens</i>	..T.AA.T... ..C... ..T..A... ..T... ..T... ..TAT... ..T... ..A..C... ..
<i>Euglossa imperialis</i>	....AA.T... ..A... ..T... ..T... ..T... ..TAT... ..TG... ..

**Apêndice D – Composição nucleotídica das seqüências parciais do DNAr 16S nos táxons estudados, as proporções de cada base são representadas em porcentagem (%).**

	T(U)	C	A	G	Total
<i>Celetrigona longicornis</i>	39.2	6.5	42.5	11.8	416
<i>Cephalotrigona capitata</i>	41.0	6.3	39.6	13.1	412
<i>Friesella schrottkyi</i>	39.1	6.8	41.3	12.9	412
<i>Frieseomelitta doederleini</i>	40.4	6.2	41.3	12.1	421
<i>Lestrimelitta limao</i>	40.3	6.1	41.0	12.6	429
<i>Lestrimelitta sp</i>	40.0	6.2	41.2	12.6	420
<i>Leurotrigona muelleri</i>	41.1	6.3	41.1	11.5	399
<i>Meliwillea bivea</i>	38.5	6.5	44.3	10.8	418
<i>Oxytrigona sp</i>	38.4	6.9	42.9	11.8	422
<i>Oxytrigona tataira</i>	38.5	6.7	42.1	12.7	418
<i>Paratrigona subnuda</i>	41.9	5.7	40.4	12.1	389
<i>Scaptotrigona depilis</i>	37.7	6.0	45.8	10.5	430
<i>Scaptotrigona subobscuripennis</i>	36.9	6.7	45.6	10.7	401
<i>Scaptotrigona luteipennis</i>	38.4	6.0	44.9	10.7	430
<i>Scaptotrigona postica</i>	37.6	6.6	45.3	10.5	391
<i>Scaptotrigona sp</i>	37.9	6.1	45.4	10.5	427
<i>Partamona helleri</i>	38.8	6.0	43.2	12.0	417
<i>Partamona auripennis</i>	38.2	5.8	42.9	13.1	429
<i>Parapartamona tungurahuaana</i>	37.9	6.4	43.7	12.0	435
<i>Paratrigona onorei</i>	39.2	6.6	40.6	13.6	426
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	38.8	6.2	42.1	12.9	420
<i>Nannotrigona melanocera</i>	39.2	6.6	41.8	12.4	426
<i>Plebeia droryana</i>	40.0	6.2	41.9	11.9	420
<i>Plebeia saiqui</i>	39.9	5.9	43.0	11.3	391
<i>Plebeia wittmanni</i>	40.6	5.6	42.3	11.5	409
<i>Plebeia julianii</i>	40.2	5.7	42.6	11.5	418
<i>Plebeia remota</i>	39.9	5.7	42.5	11.9	419
<i>Plebeia nigriceps</i>	39.7	6.0	42.8	11.5	418
<i>Nogueirapis butteli</i>	39.9	6.3	42.1	11.7	411
<i>Scaura latitarsis</i>	40.4	6.0	42.3	11.2	418
<i>Scaura atlantica</i>	40.1	5.7	42.7	11.6	424
<i>Scaura longula</i>	40.4	6.3	41.8	11.5	426
<i>Ptilotrigona lurida</i>	39.9	5.6	42.5	12.0	409
<i>Schwarzula timida</i>	40.4	6.5	40.9	12.1	413
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	39.0	6.5	41.9	12.7	418
<i>Melipona quadrifasciata</i>	40.2	6.2	41.1	12.4	418
<i>Melipona asilvai</i>	39.8	6.2	41.9	12.1	422
<i>Melipona compressipes</i>	40.5	6.3	40.0	13.1	427
<i>Melipona marginata</i>	40.6	6.0	40.6	12.8	414
<i>Trigona amalthea</i>	39.6	6.6	42.2	11.7	427
<i>Trigona hypogea</i>	38.3	6.3	42.1	13.3	428
<i>Trigona fuscipennis</i>	37.7	7.0	43.0	12.3	416
<i>Trigona cilipes</i>	40.9	6.9	39.2	12.9	418
<i>Trigona amazonensis</i>	39.3	6.3	42.5	11.9	428
<i>Geotrigona sp</i>	41.0	5.9	40.8	12.3	422
<i>Geotrigona fulvohirta</i>	39.8	6.1	41.5	12.6	427
<i>Tetragonisca angustula</i>	41.4	6.4	39.7	12.5	408
<i>Trigonisca sp</i>	39.9	6.4	41.6	12.1	406
<i>Liotrigona madecassa</i>	39.2	6.3	42.5	12.0	426
<i>Liotrigona mahafalya</i>	39.0	6.3	42.7	12.0	426
<i>Mourella caerulea</i>	40.0	6.3	41.7	11.9	412
<i>Austroplebeia australis</i>	39.4	6.7	42.6	11.2	401
<i>Austroplebeia symei</i>	38.4	6.3	43.3	11.9	427

**Apêndice D – Composição nucleotídica das seqüências parciais do DNAr 16S nos táxons estudados, as proporções de cada base são representadas em porcentagem (%).**

	T(U)	C	A	G	Total
<i>Axestotrigona togoensis</i>	39.9	6.5	39.7	13.8	398
<i>Axestotrigona junodi</i>	39.3	6.6	40.5	13.6	412
<i>Axestotrigona ferruginea</i>	39.4	7.0	39.4	14.1	426
<i>Heterotrigona itama</i>	36.7	8.7	39.5	15.1	403
<i>Homotrigona fimbriata</i>	37.4	8.4	41.1	13.1	428
<i>Hypotrigona gribodoi</i>	39.6	5.9	42.6	11.9	427
<i>Hypotrigona ruspolii</i>	39.0	6.1	42.5	12.4	428
<i>Hypotrigona sp</i>	38.6	6.1	43.4	11.9	396
<i>Plebeina denoiti</i>	40.8	5.9	40.8	12.6	390
<i>Meliplebeia becarii</i>	38.2	8.3	39.7	13.9	411
<i>Meliplebeia ogouensis</i>	37.8	8.2	39.4	14.6	426
<i>Lepidotrigona ventralis</i>	37.5	8.2	38.4	15.9	427
<i>Lepidotrigona terminata</i>	35.5	8.9	40.0	15.7	428
<i>Lisotrigona furva</i>	39.6	6.6	41.5	12.4	427
<i>Lophotrigona canifrons</i>	37.4	8.4	39.7	14.5	428
<i>Tetragonula carbonaria</i>	36.3	9.5	38.5	15.6	410
<i>Tetragonula hockingsi</i>	35.3	10.0	38.3	16.4	428
<i>Tetragonula mellipes</i>	34.2	10.1	39.8	15.9	427
<i>Tetrigona apicalis</i>	37.1	8.5	40.1	14.3	426
<i>Tetrigona melanoleuca</i>	37.6	8.0	39.9	14.6	426
<i>Tetrigona binghami</i>	36.9	9.2	40.1	13.8	426
<i>Tetragonilla atripes</i>	37.3	9.9	38.0	14.8	426
<i>Tetragonilla rufibasalis</i>	37.1	8.9	39.2	14.8	426
<i>Sundatrigona moorei</i>	35.2	9.9	39.4	15.5	426
<i>Plebeina hildebrandti</i>	39.0	6.8	40.6	13.6	426
<i>Plebeiella lendliana</i>	39.6	6.6	41.2	12.6	427
<i>Plebeia frontalis</i>	39.6	6.1	42.4	11.9	427
<i>Platytrigona hobbyi</i>	36.6	8.2	39.0	16.2	426
<i>Odontotrigona haematoptera</i>	37.6	7.7	40.4	14.3	426
<i>Meliponula bocandei</i>	39.0	7.0	39.9	14.1	426
<i>Apotrigona infuscata</i>	37.8	8.2	36.9	17.1	426
<i>Dactylurina staudingeri</i>	38.8	6.6	42.8	11.8	423
<i>Geniotrigona thoracica</i>	38.3	7.5	40.6	13.6	426
<i>Geniotrigona incisa</i>	36.3	8.9	38.4	16.4	427
<i>Dolichotrigona browni</i>	39.0	6.1	43.4	11.5	426
<i>Bombus terrestris</i>	39.1	6.8	40.3	13.8	427
<i>Bombus pennsylvanicus</i>	40.3	7.3	39.8	12.6	427
<i>Bombus avinoviellus</i>	39.3	6.6	39.8	14.4	425
<i>Eufriesea imperialis</i>	37.8	6.1	44.9	11.2	445
<i>Eulaema polychroma</i>	38.7	5.9	43.7	11.7	437
<i>Eufriesea caeruleascens</i>	38.6	6.0	43.7	11.7	435
<i>Apis dorsata</i>	39.1	6.7	40.5	13.8	435
<i>Apis mellifera</i>	39.2	6.4	39.9	14.4	436
<i>Apis cerana</i>	38.1	7.3	40.1	14.4	436
<i>Apis florea</i>	39.5	6.0	41.4	13.0	430
Média	38.9	6.8	41.4	12.9	420.7

**Apêndice E** – Composição nucleotídica das seqüências parciais do Citocromo b nos táxons estudados, as proporções de cada base são representadas em porcentagem (%).

	Posição 1					Posição 2				Posição 3										
	T(U)	C	A	G	Total	T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3			
<i>Heterotrigona itama</i>	43.8	12.5	32.6	11.2	473	34.2	14.6	36.1	15.2	158	48.7	19.6	19.6	12.0	158	48.4	3.2	42.0	6.4	157
<i>Teragonula carbonaria</i>	42.4	16.1	25.9	15.6	467	35.3	15.4	29.5	19.9	156	48.7	19.2	17.9	14.1	156	43.2	13.5	30.3	12.9	155
<i>Austroplebeia australis</i>	47.7	8.8	36.0	7.5	453	40.4	9.3	38.4	11.9	151	49.7	17.2	22.5	10.6	151	53.0	0.0	47.0	0.0	151
<i>Austroplebeia symei</i>	48.0	8.9	35.7	7.4	473	42.4	9.5	37.3	10.8	158	49.4	16.5	22.8	11.4	158	52.2	0.6	47.1	0.0	157
<i>Cephalotrigona capitata</i>	46.1	9.4	35.4	9.1	427	41.3	9.8	35.0	14.0	143	48.6	16.9	21.8	12.7	142	48.6	1.4	49.3	0.7	142
<i>Friesella sp</i>	45.6	10.0	36.4	8.1	472	39.9	10.8	36.1	13.3	158	49.7	17.2	22.3	10.8	157	47.1	1.9	51.0	0.0	157
<i>Frieseomelitta dispar</i>	48.0	8.6	34.6	8.8	431	43.8	9.0	32.6	14.6	144	50.0	16.7	22.2	11.1	144	50.3	0.0	49.0	0.7	143
<i>Frieseomelitta sp</i>	45.0	9.7	37.0	8.2	473	38.0	10.8	38.6	12.7	158	48.1	18.4	21.5	12.0	158	49.0	0.0	51.0	0.0	157
<i>Frieseomelitta varia</i>	47.0	9.1	34.3	9.6	417	43.9	9.4	31.7	15.1	139	48.2	17.3	22.3	12.2	139	48.9	0.7	48.9	1.4	139
<i>Geotrigona sp</i>	46.1	9.3	36.4	8.2	473	40.5	10.1	36.1	13.3	158	47.5	17.1	24.1	11.4	158	50.3	0.6	49.0	0.0	157
<i>Lestrimelitta sp</i>	46.9	8.9	36.2	8.0	473	37.3	9.5	39.9	13.3	158	48.1	16.5	24.7	10.8	158	55.4	0.6	43.9	0.0	157
<i>Lestrimelitta limao</i>	47.4	8.9	35.3	8.5	473	38.0	9.5	39.9	12.7	158	49.4	16.5	23.4	10.8	158	54.8	0.6	42.7	1.9	157
<i>Tetragona dorsalis</i>	44.2	11.6	35.7	8.5	473	39.2	12.0	34.8	13.9	158	44.9	19.6	24.1	11.4	158	48.4	3.2	48.4	0.0	157
<i>Mourella caerulea</i>	45.2	9.6	33.9	11.2	436	36.3	10.3	32.9	20.5	146	48.3	18.6	20.0	13.1	145	51.0	0.0	49.0	0.0	145
<i>Trigona cilipes</i>	44.0	11.2	36.2	8.7	473	41.1	12.0	32.9	13.9	158	44.9	20.3	23.4	11.4	158	45.9	1.3	52.2	0.6	157
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	47.1	9.5	31.9	11.4	473	41.8	10.8	32.9	14.6	158	46.2	17.7	23.4	12.7	158	53.5	0.0	39.5	7.0	157
<i>Oxytrigona sp</i>	44.4	10.8	36.8	8.0	473	37.3	11.4	38.0	13.3	158	46.8	19.0	23.4	10.8	158	49.0	1.9	49.0	0.0	157
<i>Plebeia phrynostoma</i>	47.2	8.6	35.3	8.8	430	39.6	9.0	36.8	14.6	144	50.3	16.8	21.0	11.9	143	51.7	0.0	48.3	0.0	143
<i>Plebeia droryana</i>	47.3	8.6	35.2	8.9	429	39.9	9.1	37.1	14.0	143	50.3	16.8	21.0	11.9	143	51.7	0.0	47.6	0.7	143
<i>Plebeia julianii</i>	46.1	8.6	36.8	8.4	451	39.7	9.9	36.4	13.9	151	49.3	15.3	24.0	11.3	150	49.3	0.7	50.0	0.0	150
<i>Plebeia wittmanni</i>	46.4	8.6	36.6	8.4	429	41.3	8.4	36.4	14.0	143	51.0	16.8	21.7	10.5	143	46.9	0.7	51.7	0.7	143
<i>Plebeia pugnax</i>	46.3	9.3	35.5	8.9	473	39.2	10.1	35.4	15.2	158	48.7	16.5	23.4	11.4	158	51.0	1.3	47.8	0.0	157
<i>Plebeia remota</i>	45.7	8.9	36.6	8.7	470	39.5	10.2	35.7	14.6	157	50.3	16.6	22.3	10.8	157	47.4	0.0	51.9	0.6	156
<i>Plebeia saiqui</i>	46.3	9.3	35.4	9.0	432	38.2	9.7	36.8	15.3	144	49.3	18.1	20.8	11.8	144	51.4	0.0	48.6	0.0	144
<i>Plebeia sp</i>	44.7	9.7	37.0	8.6	465	40.0	10.3	36.1	13.5	155	49.0	16.8	22.6	11.6	155	45.2	1.9	52.3	0.6	155
<i>Plebeia spl</i>	46.5	8.9	35.7	8.9	473	39.9	10.1	35.4	14.6	158	48.7	16.5	23.4	11.4	158	51.0	0.0	48.4	0.6	157
<i>Scaptotrigona postica</i>	48.6	8.8	32.5	10.1	465	43.2	9.7	32.3	14.8	155	48.4	16.1	22.6	12.9	155	54.2	0.6	42.6	2.6	155
<i>Scaptotrigona sp</i>	48.0	8.7	33.3	9.9	435	40.7	9.7	34.5	15.2	145	49.7	16.6	21.4	12.4	145	53.8	0.0	44.1	2.1	145
<i>Scaura atlantica</i>	47.8	9.1	34.2	8.9	473	41.8	10.8	32.3	15.2	158	49.4	15.8	23.4	11.4	158	52.2	0.6	47.1	0.0	157
<i>Scaura latitarsis</i>	47.4	9.5	33.8	9.3	473	41.1	11.4	32.3	15.2	158	49.4	15.8	22.8	12.0	158	51.6	1.3	46.5	0.6	157
<i>Scaura longula</i>	45.8	10.1	36.2	7.9	456	39.5	11.8	36.2	12.5	152	50.0	16.4	22.4	11.2	152	48.0	2.0	50.0	0.0	152
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	45.6	9.3	34.2	10.9	439	36.3	10.3	34.9	18.5	146	49.7	17.0	20.4	12.9	147	50.7	0.7	47.3	1.4	146
<i>Schwarziana sp</i>	45.9	9.3	34.2	10.6	473	38.6	10.1	33.5	17.7	158	48.1	16.5	22.2	13.3	158	51.0	1.3	47.1	0.6	157
<i>Schwarzula sp</i>	45.9	8.8	36.9	8.4	455	39.5	9.9	37.5	13.2	152	49.3	16.4	23.0	11.2	152	49.0	0.0	50.3	0.7	151
<i>Schwarzula timida</i>	44.8	10.1	37.0	8.0	473	38.6	10.8	38.0	12.7	158	49.4	17.7	22.2	10.8	158	46.5	1.9	51.0	0.6	157
<i>Tetragonisca sp</i>	49.6	9.0	31.4	10.1	456	40.1	10.5	33.6	15.8	152	51.3	15.8	21.7	11.2	152	57.2	0.7	38.8	3.3	152
<i>Trigona necrophaga</i>	45.2	10.8	35.9	8.0	473	41.8	12.0	33.5	12.7	158	46.8	19.0	22.8	11.4	158	47.1	1.3	51.6	0.0	157
<i>Trigona hypogea</i>	45.2	11.0	35.3	8.5	473	40.5	11.4	34.8	13.3	158	46.8	19.0	22.8	11.4	158	48.4	2.5	48.4	0.6	157
<i>Trigona fuscipennis</i>	46.0	9.8	35.5	8.7	437	42.1	10.3	33.8	13.8	145	50.7	17.1	20.5	11.6	146	45.2	2.1	52.1	0.7	146
<i>Trigona hyalinata</i>	46.3	9.7	36.1	7.9	454	40.8	9.9	36.8	12.5	152	48.3	17.9	22.5	11.3	151	49.7	1.3	49.0	0.0	151

	T(U)	C	A	G	Total	Posição 1				Posição 2				Posição 3						
						T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3			
<i>Melipona bicolor</i>	44.2	10.6	37.0	8.2	473	36.1	13.3	37.3	13.3	158	48.7	17.7	22.2	11.4	158	47.8	0.6	51.6	0.0	157
<i>Melipona subnitida</i>	46.1	10.3	35.1	8.5	436	39.7	11.0	36.3	13.0	146	48.6	18.5	21.2	11.6	146	50.0	1.4	47.9	0.7	144
<i>Melipona asilvai</i>	44.4	12.1	35.1	8.5	473	37.3	12.7	36.1	13.9	158	48.7	17.7	22.2	11.4	158	47.1	5.7	47.1	0.0	157
<i>Melipona compressipes</i>	44.4	10.6	36.6	8.5	473	37.3	12.0	37.3	13.3	158	48.1	17.1	23.4	11.4	158	47.8	2.5	49.0	0.6	157
<i>Melipona marginata</i>	42.7	11.6	37.4	8.2	473	36.1	13.3	37.3	13.3	158	48.1	18.4	22.2	11.4	158	43.9	3.2	52.9	0.0	157
<i>Melipona quadrifasciata</i>	45.7	11.0	34.9	8.3	444	37.2	13.5	35.8	13.5	148	50.0	17.6	20.9	11.5	148	50.0	2.0	48.0	0.0	148
<i>Trigonisca sp</i>	44.9	10.1	35.9	9.2	437	37.0	9.6	37.7	15.8	146	48.6	18.5	21.9	11.0	146	49.0	2.1	48.3	0.7	145
<i>Leurotrigona muelleri</i>	47.9	9.4	32.5	10.2	403	39.6	9.0	34.3	17.2	134	51.1	19.3	17.8	11.9	135	53.0	0.0	45.5	1.5	134
<i>Celetrigona longicornis</i>	46.4	9.0	35.9	8.7	412	40.9	8.0	36.5	14.6	137	48.9	19.0	21.2	10.9	137	49.3	0.0	50.0	0.7	138
<i>Exaerete frontalis</i>	46.9	9.1	33.8	10.1	473	42.4	10.8	30.4	16.5	158	49.4	16.5	20.3	13.9	158	49.0	0.0	51.0	0.0	157
<i>Bombus lucorum</i>	45.5	11.6	34.2	8.7	473	37.3	12.0	35.4	15.2	158	48.1	19.6	22.2	10.1	158	51.0	3.2	45.2	0.6	157
<i>Bombus pennsylvanicus</i>	46.7	10.8	33.6	8.9	473	36.1	13.9	33.5	16.5	158	48.7	18.4	22.8	10.1	158	55.4	0.0	44.6	0.0	157
<i>Bombus ruderarius</i>	45.5	11.4	33.8	9.3	473	35.4	13.3	35.4	15.8	158	46.8	19.6	23.4	10.1	158	54.1	1.3	42.7	1.9	157
<i>Bombus terrestris</i>	44.0	12.5	34.7	8.9	473	38.0	12.0	34.2	15.8	158	47.5	20.3	22.2	10.1	158	46.5	5.1	47.8	0.6	157
<i>Eufriesea caerulea</i>	47.4	10.0	33.2	9.4	470	42.0	10.8	31.2	15.9	157	49.0	17.2	21.7	12.1	157	51.3	1.9	46.8	0.0	156
<i>Euglossa imperialis</i>	46.1	9.5	35.3	9.1	473	37.3	10.1	37.3	15.2	158	48.7	17.1	22.2	12.0	158	52.2	1.3	46.5	0.0	157
<i>Eulaema bombiformis</i>	44.8	10.1	35.9	9.1	473	41.1	10.8	33.5	14.6	158	47.5	19.0	22.2	11.4	158	45.9	0.6	52.2	1.3	157
<i>Eulaema meriana</i>	45.5	9.7	35.1	9.7	473	38.6	12.0	32.3	17.1	158	50.0	15.2	22.8	12.0	158	47.8	1.9	50.3	0.0	157
<i>Apis mellifera ligustica</i>	45.0	12.3	32.3	10.4	473	38.6	13.9	29.7	17.7	158	44.9	19.0	22.8	13.3	158	51.6	3.8	44.6	0.0	157
<i>Apis nigrocincta</i>	43.1	12.9	32.8	11.2	473	39.2	12.0	30.4	18.4	158	43.7	19.6	22.8	13.9	158	46.5	7.0	45.2	1.3	157
Média	45.9	10.1	34.9	9.1	459	39.3	10.9	35.1	14.7	153	48.6	17.6	22.2	11.6	153	49.8	1.6	47.6	1.0	152