UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Naila Cristina de Souza Canevazzi

Filogenia das abelhas corbiculadas (Apidae, Apinae): uso combinado de dados comportamentais de auto-limpeza e moleculares.

São José do Rio Preto
2012

Naila Cristina de Souza Canevazzi

Filogenia das abelhas corbiculadas (Apidae, Apinae): uso combinado de dados comportamentais de auto-limpeza e moleculares.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em 26/03/2012, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, área de concentração - Sistemática e Evolução, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Noll

São José do Rio Preto
2012

Canevazzi, Naila Cristina de Souza.
Filogenia das abelhas corbiculadas (Apidae, Apinae): uso combinado de dados comportamentais de auto-limpeza e moleculares / Naila Cristina de Souza Canevazzi. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.
92 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Fernando Barbosa Noll
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Zoologia. 2. Abelha – Filogenia. I. Noll, Fernando Barbosa. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 595.799

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Naila Cristina de Souza Canevazzi

Filogenia das abelhas corbiculadas (Apidae, Apinae): uso combinado de dados comportamentais de auto-limpeza e moleculares

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em 26/03/2012, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, área de concentração - Sistemática e Evolução, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Barbosa Noll
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Orientador

Prof. Dr. Eduardo A. B. de Almeida
Universidade de São Paulo

Profª. Drª. Gisele Garcia Azevedo
Universidade Federal do Maranhão

São José do Rio Preto, 26 de março de 2012.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Sidnei Mateus e ao Msc. Pablo Augusto Poleto Antiqueira pela ajuda na obtenção de vários espécimes utilizados neste trabalho. Ao Prof. Sidnei também sou grata pela acolhida em Ribeirão Preto e pela ajuda na identificação de vários espécimes. Ao José Carlos Serrano pela identificação dos euglossíneos.

Agradeço também à Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto e às suas alunas Elaine Dias, Adriana Granzotto e principalmente a Lilian Ricco Medeiros por me acolherem e me ajudarem em seu laboratório de análise molecular de insetos, ajuda essencial para a conclusão deste trabalho. Ao Msc. Fernando Gelin e ao Prof. Dr. Eduardo A. B. de Almeida, que auxiliaram na resolução de diversos problemas, tendo o prof. Eduardo ajudado também na identificação de vários espécimes.

Como não poderia deixar de ser, preciso agradecer a todos os integrantes do meu querido laboratório de “Aculeata, Sistemática e Comportamento”, especialmente as ‘meninas do lab.’: Cíntia Eleonora Lopes Justino, Gracieli Araújo Castilho, Marjorie da Silva e a mais recente integrante Naysa Crespo. Ao Raduan A. Soleman, um dos ‘meninos do lab.’ pela sua simpatia desmedida e ajuda na obtenção de sequências nucleotídicas.

Agradeço especialmente ao professor e amigo Dr. Fernando Barbosa Noll pelos seus conselhos paternais e profissionais, pela sua sensibilidade e excelência em gerenciar e lidar com as pessoas. Sinto-me lisonjeada por ter sido acolhida em 2006 e ter feito parte do seu grupo de trabalho desde então.

Agradeço, é claro, à minha família: mãe, pai, Inês, Diego, Gabi, Wadson, avôs Nadir e Benedito e ao meu querido ‘noivorido’ Rafael por todo apoio e suporte oferecidos ao longo de minha vida. Amo vocês. Aos meus queridos animais de estimação Kika, Bella, Sardinha, Salmão e Sushi, que me permitiram que os apertassem e contemplasse suas vidas simples, acalmando a minha alma a cada troca de olhares.

Agradeço também o apoio financeiro da CAPES e FAPESP, sem os quais não teria desenvolvido este trabalho.

...A abelha nasce e morre
E a cera que ela engendra
Acende a luz quando escorre
Da vela que me orienta...

Nando Reis – A letra A

Resumo

Abelhas corbiculadas (Apidae, Apinae, Apini) compartilham a presença de uma estrutura usada para transportar pólen (a corbícula), são indiscutivelmente monofiléticas e estão divididas em quatro subtribos: Apina, Bombina, Euglossina e Meliponina. Todas as abelhas pertencentes às subtribos Apina (A) e Meliponina (M) são altamente eussociais, enquanto as Bombina (B) são primitivamente eussociais e as Euglossina (E) possuem diversos níveis de socialidade. Várias hipóteses filogenéticas já foram propostas para explicar o relacionamento entre essas quatro subtribos e, consequentemente, a evolução do comportamento social. Geralmente, os dados comportamentais, paleontológicos e morfológicos apontam para a topologia (E,(B,(A,M))), propondo que a eussocialidade avançada surgiu uma única vez no ancestral comum ao clado (A,M). Entretanto, os dados moleculares em sua maioria sugerem uma topologia totalmente diferente da anterior ((A,E),(B,M)), propondo que a eussocialidade avançada surgiu duas vezes, uma no ancestral de Apina e outra no ancestral de Meliponina. Outro fato importante é que os dados são discordantes mesmo entre si. Nem todo estudo utilizando dados morfológicos aponta para o primeiro caminho evolutivo e da mesma forma, nem todo estudo molecular aponta para o segundo, havendo uma série de incongruências e problemas a serem resolvidos. Assim, propusemos o levantamento de caracteres comportamentais de auto-limpeza e de caracteres moleculares de quatro genes, dois nucleares e dois mitocondriais. Utilizamos 22 táxons nas análises moleculares e 12 nas análises comportamental e de evidência total. A árvore que melhor explica nossos dados comportamentais é aquela que agrupa Apina com Meliponina e estabelece que Euglossina foi o primeiro grupo a divergir. Por outro lado, a topologia que melhor explica nossos dados moleculares e a evidência total é aquela que agrupa Bombina com Meliponina e Apina com Euglossina. Esses dois conjuntos de dados apontam caminhos totalmente diferentes para a evolução das abelhas corbiculadas e consequentemente para o surgimento da eussocialidade. Toda essa problemática nos remeteu a uma série de questionamentos. Será que a amostragem nas análises moleculares não tem produzido algum viés? Será que a evolução gênica não foi especialmente problemática nesse grupo de abelhas, pelo menos a dos genes utilizados? Ou será que toda a evolução morfológica e comportamental foi de fato convergente? O capítulo 1 versa sobre os dados moleculares, enquanto o capítulo 2 explora os assuntos pertinentes aos dados comportamentais, assim como a junção desses dois conjuntos de dados.

Palavras-chave: Apini, sistemática, evolução, comportamento, eussocialidade.

Abstract

Corbiculate bees (Apidae, Apinae, Apini) share the presence of a structure used to carry pollen (the corbiculae), they are undoubtedly monophyletic and comprise four subtribes: Apina (A), Bombina (B), Euglossina (E) and Meliponina (M). All the bees in the subtribes Apina and Meliponina are highly eusocial, while Bombina are primitively eusocial and the species belonging to Euglossina have different levels of sociality. Several phylogenetic hypotheses have already been proposed to explain the relationship among these subtribes and, consequently, the evolution of social behavior. Generally, behavioral, paleontological and morphological data point out to the topology (E,(B,(A,M))), suggesting that advanced eusociality arose only once in the common ancestor to the clade (A,M). However, the molecular data mostly suggest a totally different topology ((A,E),(B,M)), proposing that advanced eusociality arose twice, once in Apina ancestor and another in Meliponina ancestor. Another important fact regarding this is that the data are in disagreement even among themselves, not every study using morphological data points out to the first evolutionary path and similarly, not every molecular study points out to the second. So, there are lots of inconsistencies and problems concerning the Corbiculate bee's phylogeny to be solved. Thus, we propose to look for more characters: behavior patterns of self-grooming as well as molecular data of four genes, two nuclear and two mitochondrial. We used 22 taxa for the molecular analyses and 12 for the behavior and total evidence analyses. The tree that best explains our behavior data is the one that places Apina together with Meliponina and points out that Euglossina was the first to diverge. In the other hand, the topology that best explains our molecular data and the total evidence is the one that places Bombina together with Meliponina and Apina with Euglossina. Both data sets suggest totally different paths to the Corbiculate bees' evolution and consequently to the origin of eusociality. All this context drove us to a series of asks. Have the sample in molecular analyses done any bias? Was the gene evolution especially problematic in Corbiculate bees, at least for these genes that have been used? Was all the morphological and behavioral evolution in fact convergent? The Chapter 1 deals with molecular data, while the Chapter 2 explores behavior data as far as the analysis of these two data sets together.

Key-words: Apini, systematics, evolution, behavior, eusociality

Sumário

Introdução Geral 9
Capítulo 1 12
Resumo 13
Abstract 14
1.1 Introdução 15
1.2 Material e métodos 17
1.2.1 Seleção dos táxons 17
1.2.2 Obtenção dos dados moleculares 17
1.2.3 Análise filogenética molecular 18
1.3 Resultados 20
1.3.1 EF-1α 20
1.3.2 rDNA 28S 20
1.3.3 rDNA 16S 21
1.3.4 Citocromo b 22
1.3.5 Genes concatenados 23
1.4 Discussão 24
1.4.1 O problema dos grupos externos 24
1.4.2 Filogenias moleculares 25
1.4.3 E afinal, a eussocialidade surgiu quantas vezes? 27
1.5 Tabelas e figuras 29
Capítulo 2 38
Resumo 39
Abstract 40
2.1 Introdução 41
2.2 Material e métodos 42
2.2.1 Preparação dos espécimes e obtenção dos caracteres 42

2.2.2 Análise filogenética comportamental 43
2.2.3 Análise filogenética combinada: Caracteres comportamentais e moleculares.44
2.3 Resultados 46
2.3.1 Lista de caracteres 46
2.3.1.1 Limpeza de perna 46
2.3.1.2 Limpeza de asa 47
2.3.1.3 Limpeza de mesossoma 49
2.3.1.4 Limpeza de metassoma 50
2.3.1.5 Limpeza de cabeça 51
2.3.1.6 Sequências comportamentais 53
2.3.2 Filogenias 60
2.3.2.1 Análise comportamental 60
2.3.2.2 Análise combinada: dados comportamentais e moleculares 61
2.4 Discussão 64
2.4.1 Filogenia comportamental 64
2.4.1.1 Caracteres utilizados 64
2.4.1.2 O clado das abelhas corbiculadas 65
2.4.1.3 Monofilia das subtribos 68
2.4.1.4 O clado Bombina + Apina + Meliponina 69
2.4.1.5 O clado Apina + Meliponina 69
2.4.1.6 Outros agrupamentos 71
2.4.2 Análise combinada: Caracteres comportamentais e moleculares 71
2.4.2.1 Otimização dos caracteres comportamentais na análise de evidência total ... 72
2.5 Tabelas e figuras 77
Considerações finais 85
Referências Bibliográficas 88

Introdução Geral

As abelhas corbiculadas caracterizam-se principalmente pela presença da corbícula, uma estrutura nas pernas posteriores utilizada para o transporte de pólen (SAKAGAMI & MICHENER, 1987; ROIG-ALSINA & MICHENER, 1993; MICHENER, 2000). De acordo com Roig-Alsina em Roing-Alsina & Michener (1993), essas abelhas formam a tribo Apini e estão divididas em quatro subtribos: a solitária ou comunal Euglossina (E), a primitivamente eussocial Bombina (B) e as abelhas altamente eussociais Meliponina (M) e Apina (A). No entanto, grande parte dos autores que trabalham com esses grupos não aderiu a essa classificação e continua utilizando a proposta anterior, que não dá nome às abelhas corbiculadas. De acordo com Michener nesse mesmo trabalho com Roig-Alsina, existem tantas diferenças entre esses quatro grupos que seria melhor mantê-los como tribos. Assim, todas as corbiculadas permaneceriam dentro de Apinae sem que recebessem um nome formal e seriam tratados como tribos: Apini, Bombini, Euglossini e Meliponini. Neste trabalho optamos por tratá-las de acordo com a primeira opção.

Euglossina contém as abelhas polinizadoras de orquídeas. É um grupo amplamente distribuído na região neotropical e possui cerca de 175 espécies divididas em cinco gêneros (MICHENER, 2000). Quase não há questionamentos sobre a monofilia de Euglossina, mas a relação filogenética entre elas tem sido motivo de debate na literatura (SILVEIRA et al., 2002). A proposta mais recente posiciona *Exaerete* como o primeiro grupo a divergir, seguido por *Eufriesea*, depois por *Aglae* e por fim *Eulaema* é colocada como grupo irmão de *Euglossa* (RAMIREZ et al., 2010). As abelhas Bombina são cosmopolitas, ocorrendo principalmente na Eurásia (SILVEIRA et al., 2002). Antigamente eram divididas em dois gêneros: *Bombus,* primitivamente sociais e *Psithyrus*, parasitas de outras *Bombus*. Posteriormente incluiu-se o último no primeiro e atualmente todas as cerca de 250 espécies estão no gênero *Bombus* (MICHENER, 2000). Meliponina compreende as abelhas sem ferrão. São abelhas restritas às regiões tropicais e subtropicais do globo, sendo muito importantes na polinização nas florestas tropicais (ROUBIK, 1989). Todas as espécies são altamente eussociais e a estimativa é que haja cerca de 400 espécies distribuídas em 60 gêneros, muitas das quais pobremente conhecidas (MICHENER, 2000; SILVEIRA et al., 2002). A subtribo Apina é monotípica, apresentado apenas o gênero *Apis*. Esta subtribo contém 11

espécies, todas altamente eussociais, originalmente restritas ao velho mundo, até a introdução de *Apis mellifera* nos demais continentes para a produção comercial de mel (SILVEIRA et al., 2002).

O comportamento eussocial nas abelhas é encontrado em Bombina, Apina, Meliponina, alguns Halictidae e alguns Xylocopinae (MICHENER, 2000). As espécies são consideradas eussociais quando possuem divisão reprodutiva do trabalho, sobreposição de gerações e cuidado cooperativo com a prole (MICHENER, 2000). O comportamento altamente eussocial é encontrado somente em Apina e Meliponina. Neste caso, rainhas e operárias são morfologicamente muito distintas (MICHENER, 2000). Nem a rainha e nem as operárias conseguem sobreviver sozinhas. A rainha é incapaz de forragear e as operárias não formam colônias viáveis, pois não acasalam e consequentemente não produzem fêmeas. As novas colônias são estabelecidas socialmente por grupos ou enxameios (MICHENER, 2000). Por outro lado, Bombina, Halictidade e Xylocopinae têm representantes primitivamente eussociais. Elas vivem em pequenas colônias, a maioria iniciada por fêmeas solitárias, que desempenham todas as tarefas necessárias, desde a construção do ninho até a alimentação da prole (MICHENER, 2000). Após a emergência da prole, a vida social começa a surgir, incluindo divisão de trabalho entre a fundadora do ninho (rainha) e as filhas (operárias) (MICHENER, 2000). Rainhas e operárias são semelhantes morfologicamente, diferindo fisiologicamente e comportamentalmente (MICHENER, 2000).

O fato de todos os meliponíneos , todos os apíneos e os bombíneos serem eussociais e de as Euglossina possuírem diversos níveis de socialidade embora nenhuma seja eussocial (MICHENER, 2000), nos indica que uma vez estabelecido o comportamento social no ancestral comum a cada um desses três primeiros grupos, não houve alterações nos descendentes. Assim, o relacionamento filogenético entre essas quatro subtribos está diretamente relacionado à evolução do comportamento social. Diferentes hipóteses filogenéticas sugerem diferentes padrões de evolução e várias hipóteses já foram propostas ao longo dos anos:

1. (E,(B,(A,M))) - Michener (1944, 1990); Prentice (1991); Roig-Alsina & Michener (1993); Chavarría & Carpenter (1994); Schultz et al. (1999); Ascher et al. (2001); Noll (2002); Cardinal & Packer (2007).
2. ((B,E),(A,M)) - Michener (1974, 1990); Serrão (2001).
3. (M,(A,(B,E))) - Winston & Michener (1977); Kimsey (1984).

4. (E,(M,(A,B))) - Plant & Paulus (1987).
5. ((A,E),(B,M)) - Cameron (1991); Koulianos et al, (1999); Cameron & Mardulyn (2001); Kawakita et al. (2008); Cardinal et al. (2010).
6. (A,(E,(B,M))) - Sheppard & McPheron (1991); Cameron (1993); Koulianos et al. (1999); Mardulyn & Cameron (1999).

O primeiro estudo que explorou as relações de parentesco entre as abelhas corbiculadas foi realizado por Michener (1944), que usou caracteres morfológicos dos indivíduos adultos para inferir a evolução do grupo. De acordo com ele, a eussocialidade avançada teria surgido uma única vez, no ancestral comum à Meliponina e Apina. Vários estudos utilizando caracteres morfológicos (MICHENER, 1990; PRENTICE, 1991; ROIG-ALSINA & MICHENER, 1993; CARDINAL & PACKER, 2007) chegaram à mesma proposta filogenética de Michener (1944). Noll (2002) utilizando uma ampla gama de caracteres comportamentais chegou à mesma interpretação filogenética e Chavarría & Carpenter (1994) utilizando dados morfológicos e moleculares também.

No entanto, análises filogenéticas recentes utilizando sequências de DNA sugerem diferentes relações entre as quatro subtribos (CAMERON, 1991, 1993; SHEPPARD & MCPHERON, 1991; KOULIANOS et al., 1999; MARDULYN & CAMERON, 1999; CAMERON & MARDULYN, 2001; KAWAKITA et al., 2008; CARDINAL et al., 2010). Nestas análises, Bombina e Meliponina são sempre posicionadas como grupos irmãos, clado não suportado em análises morfológicas ou comportamentais. Sob esta hipótese, a eussocialidade avançada teria surgido duas vezes independentemente em Meliponina e Apina.

Tendo em vista toda essa problemática envolvendo as abelhas corbiculadas, nos propusemos a sequenciar os genes mitocondriais citocromo b (citb) e rDNA codificante da subunidade menor do ribossomo (16S), assim como os genes nucleares rDNA codificante da subunidade maior do ribossomo (28S) e fator de elongação 1-alfa cópia 2 (EF-1α F2 copy). Além de observar padrões comportamentais de auto-limpeza. Estas estratégias foram propostas com o objetivo de levantar mais caracteres para realizar uma análise filogenética robusta e dessa forma, inferir a evolução da tribo Apini e do comportamento social, tão discutidos na literatura.

Capítulo 1

Filogenia molecular das abelhas corbiculadas (Apidae, Apinae) embasada em genes nucleares e mitocondriais

Resumo

Caracteres moleculares têm sido cada vez mais utilizados em análises filogenéticas e essas têm sofrido inúmeros avanços nas últimas décadas, tendo ajudado a resolver vários problemas filogenéticos. No entanto, as análises moleculares realizadas em Apini propõem relacionamentos totalmente diferentes dos que haviam sido propostos até então com outros tipos de caracteres. Nessas análises, Meliponina é quase sempre posicionado como grupo irmão de Bombina, clado não suportado por análises com dados morfológicos ou comportamentais. Já o relacionamento entre o restante da tribo não é bem definido, sendo que em algumas análises Apina aparece como o primeiro grupo a divergir e em outras, forma um clado com Euglossina. Geralmente, cada fragmento gênico, quando analisado isoladamente e dependendo da espécie utilizada como grupo externo, aponta uma topologia diferente. No entanto, com o aumento do número de nucleotídeos, a tendência é que a topologia ((A,E),(B,M)) seja a mais frequentemente encontrada. Foi exatamente o que se observou neste trabalho. Utilizamos quatro fragmentos gênicos, dois nucleares (EF-1α e 28S) e dois mitocondriais (16S e citb). Aproximadamente 24 espécies foram utilizadas, sendo 19 no grupo interno. Cada fragmento gênico apontou para uma hipótese evolutiva diferente, sempre sustentando o clado (B,M), porém quando analisados conjuntamente sustentaram também o clado (A,E).

Abstract

Molecular characters have been increasingly used in phylogenetic analyses and have undergone uncountable advances in recent decades. So, they have contributed to solve several phylogenetic problems. However, the molecular analysis in Apini suggests relationships totally different from that had been proposed previously using other kinds of characters. In molecular analysis, Meliponina is often placed as sister group of Bombina, clade not supported by morphological and behavioral data. The relationships among the other subtribes are not well resolved yet. In some cases, Apina appears as the first group to diverge and, in others, forms a clade with Euglossina. Generally, each gene fragment when analyzed separately and depending on the outgroup species, shows different topologies. Though, when one increases the number of nucleotides, the tendency is to find the topology ((A,E),(B,M)). It was exactly what we observed in this work. We used four gene fragments, two nuclear (EF-1α and 28S) and two mitochondrial (16S and cytb). Approximately 24 species were used, 19 for the ingroup. Each fragment pointed out to a different evolutionary path, always supporting the clade (B,M), but when analyzed together they also supported the clade (A,E).

1.1 INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, Meliponina é considerada mais proximamente relacionada à Apina, visto que compartilham uma série de características de organização social e elaborados sistemas de comunicação (MICHENER, 1944, 1974). No entanto, sequências de DNA sugerem relacionamentos filogenéticos totalmente diferentes entre as subtribos de Apini (CAMERON & MARDULYN, 2001). Bombina e Meliponina são quase sempre grupos irmãos (CAMERON, 1991, 1993; SHEPPARD & MCPHERON, 1991; KOULIANOS et al., 1999; MARDULYN & CAMERON, 1999; CAMERON & MARDULYN, 2001; KAWAKITA et al., 2008; CARDINAL et al., 2010), clado não suportado pelos dados morfológicos e comportamentais (MICHENER, 1944, 1974, 1990; PRENTICE, 1991; ROIG-ALSINA & MICHENER, 1993; SCHULTZ et al., 1999; ASCHER et al., 2001; SERRÃO, 2001; NOLL, 2002; CARDINAL & PACKER, 2007).

Diferentes conjuntos de caracteres morfológicos já sugeriram diferentes relacionamentos filogenéticos, o que fez com que várias topologias já tenham sido propostas para os Apini, como mencionado na Introdução geral. Michener (1990) afirmou que há poucos caracteres morfológicos disponíveis para sustentar fortemente qualquer uma dessas hipóteses evolutivas. Uma vez que a fonte de caracteres capazes de responder inferências nesse nível está limitada, as sequências moleculares têm se tornado uma forte alternativa para essas inferências (CAMERON, 1991; KOULIANOS & CROZIER, 1991). Com o desenvolvimento tecnológico e a diminuição dos custos foi possível que se começasse a utilizar sequências nucleotídicas de vários fragmentos gênicos. Cameron (1991) e Sheppard & McPheron (1991) foram os primeiros a propor essa topologia alternativa (Bombina e Meliponina como grupos irmãos), tendo usado genes nucleares e mitocondriais. Os estudos moleculares posteriores, sempre recuperaram essa mesma topologia. Sob esta hipótese, a eussocialidade avançada teria surgido duas vezes independentemente, no ancestral de Apina e no ancestral de Meliponina.

Genes nucleares evoluem mais lentamente e têm composição de base mais uniforme do que genes mitocondriais (LIN & DANFORTH, 2004). Eles geralmente funcionam melhor como marcadores para inferir divergências mais profundas, que ocorreram há mais tempo (LIN & DANFORTH, 2004). Haja vista todas essas considerações importantes, vários fragmentos já foram testados e utilizados para propor o relacionamento filogenético nessas

espécies, a seguir estão alguns deles. O 16S foi um dos mais utilizados (CAMERON, 1991, 1993; CAMERON & MARDULYN, 2001), seguido do LWRh (MARDULYN & CAMERON, 1999; CAMERON & MARDULYN, 2001; CARDINAL et al., 2010) e do citb (KOULIANOS et al., 1999; CAMERON & MARDULYN, 2001). Vários outros fragmentos também já foram utilizados, como o 28S (CAMERON & MARDULYN, 2001; CARDINAL et al., 2010), Argk, Bub3, CAD, W, Rh, CamkII, Dnk e Gyk, estes últimos foram usados por Kawakita e colaboradores (2008) que utilizaram no total 12 genes nucleares. NaK, EF-1α, PolII e Wg foram usados por Kawakita e colaboradores (2008) e Cardinal e colaboradores (2010), além destes genes, esse último trabalho utilizou também o 18S.

Tendo tudo isto em vista, nos propomos a realizar uma análise filogenética utilizando dados moleculares obtidos de dois genes mitocondriais: citocromo b (citb) e rDNA codificante da subunidade menor do ribossomo (16S) e dois genes nucleares: rDNA codificante da subunidade maior do ribossomo (28S) e fator de elongação 1-alfa cópia 2 (EF-1α F2 copy) para inferir a evolução dessa tribo.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Seleção dos táxons

Para compor o grupo interno procuramos escolher espécies em número representativo de cada uma das quatro subtribos, usando mais espécies nos grupos mais diversos taxonomicamente. Dessa forma, foram utilizadas dezenove espécies como grupo interno para as análises dos genes 28S, EF-1α e 16S. Não foi possível obter sequências do citb para alguns meliponíneos, assim, a análise desse fragmento contou com quatorze espécies e os sítios desses táxons foram considerados como dados faltantes na análise combinada com os quatro genes. Relacionado aos grupos externos, todas as análises contaram com espécies representantes das famílias Halictidae, Megachilidae e Apidae. Nesta última família dispusemos de três espécies diferentes, um Apinae (Anthophorini) e dois Xylocopinae (Xylocopini e Ceratini), dependendo de qual estava disponível para cada gene e de qual espécie não alterasse a monofilia do grupo interno (ver 1.4.1 O problema dos grupos externos). A única exceção foi na análise do fragmento citb, que não teve um megaquilídeo compondo seu grupo externo. Os táxons utilizados para cada uma das análises encontram-se na tabela 1.1.

1.2.2 Obtenção dos dados moleculares

O DNA genômico total de um espécime de cada espécie foi extraído do tórax e/ou pernas das abelhas preservadas em etanol 100%, utilizando-se o kit de extração "DNeasy Blood & Tissue" (Qiagen) (JOWETT, 1986). As sequências foram amplificadas pela reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando o kit "PCR Ready-To-Go Beads" (Amersham Biosciences). As condições da PCR já estão padronizadas e descritas na literatura, assim como os primers de cada fragmento gênico (Tabela 1.2) (CAMERON & MARDULYN, 2001; KAWAKITA et al., 2003).

A purificação dos produtos da PCR foi realizada, na maioria dos casos, diretamente a partir da reação de PCR. No entanto, algumas reações amplificaram mais de uma banda e para serem separadas tiveram de ser purificadas a partir do gel de agarose. Para ambos os

procedimentos utilizou-se o kit "GFX PCR DNA and Gel Band Purification" (Amersham Biosciences). O sequenciamento foi realizado na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", campus de Jaboticabal, utilizando um sequenciador automático ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA). As sequências foram alinhadas por meio do algoritmo Muscle implementado no programa Mega 5 (TAMURA et al., 2011).

1.2.3 Análise filogenética molecular

As análises foram realizadas para os quatro genes em conjunto, assim como, para cada um deles separadamente por meio de parcimônia (P) (SWOFFORD et al., 1996), máxima verossimilhança (ML) (FELSENSTEIN, 1981) e parcimônia com homologia dinâmica por meio do programa POY (VARÓN et al., 2010) que utiliza as sequências de nucleotídeos sem que eles tenham sido previamente alinhados. Esse tipo de procedimento segue diretamente da sequência de nucleotídeos para a reconstrução filogenética, sem a necessidade de inserir *gaps* (WHEELER, 1996).

A procura pela árvore mais parcimoniosa deu-se por meio do programa TNT (GOLOBOFF et al., 2008), usando as configuração padrões da New Technology Search com os algoritmos Ratchet, Drift, Tree Fusion e TBR-max com adição aleatória de táxons. O programa Winclada 1.89 (NIXON, 2002) foi usado como interface. A robustez dos ramos foi acessada através de 1000 replicações de bootstrap, utilizando 10 buscas por replicação e TBR.

Nas análises de máxima verossimilhança, as buscas pela árvore mais verossímil basearam-se nos modelos de substituição de nucleotídeos selecionados pelo programa jModelTest 0.1.1 (POSADA, 2008) com base no critério de informação de Akaike (AIC). As análises foram conduzidas no programa Garli 2.0 (ZWICKL, 2006), que se baseou nos dados originais para o cálculo dos parâmetros utilizados em cada modelo. Foram realizadas 30 buscas com adição aleatória dos táxons. Para acessar o suporte dos nós, foram realizadas 1000 replicações de bootstrap com as mesmas configurações implementadas na busca pelas árvores. No caso da análise envolvendo os quatro genes concatenados, os quatro fragmentos foram tratados como independentes, tendo sido utilizados os modelos de substituição mais adequados para cada um.

Na otimização direta, para as análises dos genes individualmente, realizaram-se 6 buscas com duração de 15 minutos cada uma, além de uma busca adicional de 4 horas para confirmar que as árvores encontradas nas buscas de 15 minutos eram de fato as de menor comprimento. O suporte dos ramos foi medido por meio de 1000 replicações de bootstrap com as mesmas configurações da busca pela melhor árvore. Na análise dos quatro genes combinados, foram realizadas seis buscas de uma hora cada, além de uma busca adicional de oito horas para confirmar que as árvores encontradas nas buscas menores eram de fato as com menos passos.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 EF-1α

Após o alinhamento, esse fragmento gênico contou com 819 pares de bases, sendo 255 parcimoniosamente informativos, 81 autapomórficos e 483 invariáveis.

A análise de **parcimônia** encontrou 24 árvores igualmente parcimoniosas com 858 passos, CI = 56 e RI = 68. As diferenças entre todas essas árvores ocorreram dentro do clado Meliponina, sendo que o relacionamento filogenético entre as subtribos ficou bem resolvido no consenso estrito (figura 1.1A). A análise feita por meio de **otimização direta** retornou oito árvores diferentes igualmente parcimoniosas. Todas as variações entre as oito árvores aconteceram no posicionamento dos meliponíneos, como pode ser observado no consenso estrito (figura 1.1B). O modelo sugerido para a análise de máxima **verossimilhança** foi o GTR com correção gama e a árvore mais verossímil teve comprimento = 1.583 (figura 1.1C).

A monofilia de todas as subtribos foi recuperada em todas as análises com pelo menos 99% de suporte, com exceção de Apina, que não pôde ter sua monofilia avaliada em nenhuma das análises por se ter usado apenas uma espécie dessa subtribo, a única que ocorre nas Américas. Nos três tipos de análises, Bombina e Meliponina posicionaram-se como grupos irmãos com suporte variando de 43 a 65%. Apina e Euglossina estiveram mais proximamente relacionadas com suporte de 44 e 35% nas análises de parcimônia e máxima verossimilhança, respectivamente. Já na otimização direta, Apina foi posicionada como a primeira subtribo do grupo a divergir, sendo que Euglossina, Bombina e Meliponina formaram um clado com 44% de suporte. No que diz respeito aos meliponíneos, as três análises apresentaram em comum os agrupamentos formados pelas duas espécies de *Trigona* e pelas duas espécies de *Frieseomelitta*.

1.3.2 rDNA 28S

Com a inserção dos gaps devido ao alinhamento, o fragmento usado nas análises teve 745 pares de bases. Destes, 157 foram parcimoniosamente informativos, 86 autapomórficos e 502 invariáveis.

A análise de **parcimônia** resultou em seis árvores igualmente parcimoniosas com 442 passos, CI = 72 e RI = 76. Todas as diferenças entre as árvores ocorreram dentro de Meliponina, como se pode constatar no consenso estrito (figura 1.2A). As análises da **otimização direta** resultaram em mais de 40 árvores igualmente parcimoniosas, todas diferindo quanto ao posicionamento dos meliponíneos, como se constata no consenso estrito (figura 1.2B). O jModelTest sugeriu o modelo GTR com correção gama para a análise de máxima **verossimilhança**, a árvore mais verossímil teve comprimento = 0.872 (figura 1.2C).

A monofilia de cada subtribo foi recuperada com suportes acima de 98% para Bombina e Euglossina. Por outro lado, os suportes para o clado Meliponina variaram bastante, de 53 na verossimilhança a 100% na otimização direta. O posicionamento filogenético das subtribos foi o mesmo independente da análise utilizada. Euglossina foi apontado como o primeiro grupo a divergir, tendo as outras três subtribos formado um clado com suportes de 40, 44 e 100% nas análises de parcimônia, verossimilhança e otimização direta respectivamente. Bombina foi posicionada como grupo irmão de Meliponina com suporte variando de 68 na parcimônia a 100% na otimização direta. Dentre os meliponíneos, observa-se que todas as análises apresentaram em comum os agrupamentos formados por *Nannotrigona* e *Plebeia,* pelas duas *Trigona* e pelas duas *Frieseomelitta* e, ainda, *Melipona* e *Celetrigona* foram os dois primeiros gêneros a divergir dentro do grupo.

1.3.3 rDNA 16S

O fragmento 16S contou com 620 pares de bases após o alinhamento, foram 177 parcimoniosamente informativos, 120 autapomórficos e 323 invariáveis.

Foi encontrada somente uma árvore mais **parcimoniosa** com 777 passos, CI = 50 e RI = 53 (figura 1.3A). As análises pela **otimização direta** encontraram dez árvores igualmente parcimoniosas. Nota-se no consenso (figura 1.3B) que a maioria das diferenças foi entre os meliponíneos, mas também houve outras incongruências gerando uma politomia mais basal. A análise de **verossimilhança** foi realizada com o modelo TPM1uf com correção gama. A árvore mais verossímil teve seu comprimento = 2.999 (figura 1.3C).

Todas as análises recuperam a monofilia das subtribos com suporte acima de 92% para Bombina e Meliponina. Os suportes para a monofilia de Euglossina variaram amplamente, 23 na parcimônia, 63 na verossimilhança e 100% na otimização direta. Novamente, Bombina e Meliponina posicionaram-se como grupos irmãos com suporte de 66 a 99%. As análises de verossimilhança e parcimônia apontaram Apina como sendo o primeiro grupo a divergir, tendo as três subtribos restantes se agrupado com suportes bem baixos, 11 e 23%. A análise feita por meio da otimização direta não foi capaz de apontar quem divergiu primeiro, tendo mantido uma politomia com Anthophorini, Apina, Euglossina e o clado formado por Bombina, Meliponina e Xylocopini. A única congruência encontrada entre os três tipos de análise dentro de Meliponina foi o clado formado pelas duas *Frieseomelitta.*

1.3.4 Citocromo b

Não foram inseridos gaps no alinhamento deste fragmento que contou com 574 pares de bases, tendo sido 219 parcimoniosamente informativos, 82 autapomórficos e 273 invariáveis.

Uma única árvore mais **parcimoniosa** com 784 passos foi encontrada com CI = 53 e RI = 53 (figura 1.4A). A **otimização direta** encontrou somente uma árvore mais parcimoniosa (figura 1.4B). Assim como para a maioria dos fragmentos, o modelo utilizado na **verossimilhança** foi o GTR com correção gama, a árvore mais verossímil teve comprimento = 2.174 (figura 1.4C).

Todas as subtribos apresentaram-se monofiléticas com suportes superiores a 88%. Apina e Euglossina posicionaram-se como grupos irmãos nas análises de parcimônia e otimização direta com suportes de 22 e 76% respectivamente. Por outro lado, na verossimilhança, Apina divergiu antes, tendo deixado as três outras subtribos mais proximamente relacionadas com suporte de 45%. Bombina e Meliponina estiveram mais proximamente relacionados com suporte de pelo menos 78% nas três análises. *Celetrigona* e *Plebeia* apresentaram-se mais proximamente relacionadas dentre os meliponíneos da análise tendo *Scaura* como seu grupo irmão nos três tipos de análise. Ainda referente aos meliponíneos, encontrou-se *Tetragonisca* e *Scaptotrigona* formando um clado nas três análises.

1.3.5 Genes concatenados

A análise utilizando todos os fragmentos gênicos em conjunto teve um total de 2731 pares de bases, sendo 733 parcimoniosamente informativos, 380 autapomórficos e 1618 invariáveis.

Na análise de **parcimônia** foram encontradas quatro árvores igualmente parcimoniosas com 2545 passos, CI = 58 e RI = 62. Todas as diferenças entre as árvores ocorreram dentro do clado Meliponina, como se observa no consenso estrito (figura 1.5A). Duas árvores foram encontradas pela análise através da **otimização direta**, estas árvores diferiram substancialmente como se pode observar no consenso estrito (figura 1.5B). A árvore mais verossímil obtida por meio da análise de máxima **verossimilhança** teve comprimento = 1.940 (figura 1.5C).

Da mesma forma como na análise individual dos genes, a monofilia das três subtribos foi recuperada, todas com suporte de pelo menos 99% em todos os tipos de análises. Meliponina mostrou-se mais proximamente relacionada à Bombina, apresentando suporte de pelo menos 95%. Nas análises de parcimônia e verossimilhança, Apina e Euglossina apresentaram-se como grupos irmãos, com suporte de 77 e 87%, respectivamente. Em contraste, na análise realizada por otimização direta, as árvores diferiram na topologia dos ramos mais basais e, deste modo, o consenso estrito é politômico em Xylocopini, Apina, Euglossina e o clado formado por Bombina e Meliponina. As três análises retornaram em comum os agrupamentos formados pelas duas espécies de *Frieseomelitta* e *Trigona*.

1.4 DISCUSSÃO

1.4.1 O problema dos grupos externos

A escolha dos grupos externos foi um sério problema a ser enfrentado durante as análises moleculares. Em qualquer tipo de análise sempre havia uma espécie dos grupos externos posicionando-se internamente. No entanto, os pesquisadores concordam que as abelhas corbiculadas são monofiléticas (SAKAGAMI & MICHENER, 1987; ROIG-ALSINA & MICHENER, 1993), não havendo qualquer tipo de discussão quanto à sua monofilia e nem quanto à monofilia de cada uma das quatro subtribos (MICHENER, 1990).

Notamos que os problemas tornavam-se mais evidentes à medida que adicionávamos espécies mais proximamente relacionadas às corbiculadas, visto que análises utilizando somente Halictidae e Megachilidae raramente apresentaram problemas. Curioso é o fato de tanto Xylocopini quanto Anthophorini serem espécies consagradas como grupos externos no estudo das corbiculadas, uma vez que já foram utilizadas diversas vezes em estudos moleculares por outros autores (CAMERON, 1991, 1993; KOULIANOS et al., 1999; MARDULYN & CAMERON, 1999; CAMERON & MARDULYN, 2001; KAWAKITA et al., 2008). Por outro lado, não se observou o uso de Megachilidae nem de Halictidae.

A tabela 1.3 mostra os testes realizados com análises de parcimônia para verificar quais combinações de táxons invalidavam a monofilia das abelhas corbiculadas em cada um dos fragmentos gênicos. Analisando os trabalhos da literatura, notamos que esse acontecimento foi relativamente comum, Mardulyn & Cameron (1999) usaram Xylocopini e Eucerini como grupos externos, tendo o último formado um clado com Apina. Já Cameron & Mardulyn (2001) usaram Eucerini, Centridini, Anthophorini e Xylocopini, tendo encontrado pelo menos um táxon dos grupos externos posicionado internamente em três dos quatro fragmentos utilizados. Os trabalhos que não tiveram esse problema utilizaram somente uma espécie como grupo externo (CAMERON, 1991, 1993; KOULIANOS et al., 1999) ou fizeram análises dos fragmentos individuais sem localizar a raiz e sem utilizar o grupo externo, usando-o somente na análise dos genes combinados (KAWAKITA et al., 2008). Pelos resultados da tabela 1.3, parece que de fato, a utilização de vários genes, elimina esse problema, até mesmo porque as espécies que causam problemas não os causam em todos

os fragmentos. Isto é, uma espécie pode não ser uma boa escolha para atuar como grupo externo na análise de um fragmento, mas se mostrar adequada na análise de outros.

O principal fator em relação a esse problema é que os grupos externos, mesmo não conflitando com a monofilia do grupo interno, podem alterar a sua topologia. Foi o que ocorreu com os genes 16S e citb, que retornaram duas topologias diferentes cada um: ((A,E),(B,M)) e (A,(E,(B,M))) dependendo do conjunto de táxons utilizado como grupo externo (tabela 1.3). Com os genes EF-1α e 28S, a escolha do grupo externo ou conflitava com a monofilia do grupo interno ou retornava sempre a mesma topologia, ((A,E),(B,M)) no primeiro caso e (E,(A,(B,M))) no segundo (tabela 1.3). Quando se utilizou somente Xylocopini, apareceu uma topologia inédita para o 28S: (B,(M,(A,E))), Bombina seria o primeiro a divergir e Meliponina não seria mais proximamente relacionado a ele e sim ao clado formado por Apina e Euglossina.

Um problema de se utilizar como grupo externo táxons distantemente relacionados é que a probabilidade de que a similaridade na sequência seja devido à identidade aleatória aumenta e a chance de que qualquer outro caráter seja filogeneticamente informativo diminui (CAMERON et al., 1992). Por outro lado, se o conjunto de táxons for suficientemente divergente, mesmo que proximamente relacionado, a polarização dos caracteres torna-se essencialmente aleatória e os resultados tornam-se fenéticos ao invés de filogenéticos, podendo levar à inclusão de grupos externos internamente uma vez que a divergência entre os diferentes táxons é essencialmente por similaridade (CAMERON et al., 1992). Deste modo, utilizou-se como grupo externo para cada fragmento, o maior número de táxons possível desde que esses táxons não levassem à inclusão de algum táxon do grupo externo internamente. Embora isso represente um problema do ponto de vista metodológico, pretendemos no futuro, adicionar outros táxons como grupos externos e realizar mais análises a fim de verificar como os grupos externos influenciam a topologia.

1.4.2 Filogenias moleculares

A topologia dos cladogramas em cada uma das análises está mais relacionada ao gene utilizado do que ao método que se utilizou para obtê-la. A tabela 1.4 apresenta um resumo das topologias encontradas através dos diferentes métodos. Ou seja, apesar das topologias variarem bastante, elas variaram mais entre os diferentes fragmentos do que em

relação aos diferentes métodos, uma vez que se obteve a mesma topologia em pelo menos dois dos três métodos utilizados. Nota-se também que para cada fragmento, as análises de Parcimônia e Máxima Verossimilhança retornaram resultados congruentes na maioria das vezes, tendo diferido apenas para o gene citb (tabela 1.4).

Com exceção do agrupamento formado por Meliponina e Bombina que foi recuperado em todas as análises, o posicionamento dos outros grupos variou de todas as formas possíveis, como já foi observado em diversos outros trabalhos na literatura (CAMERON, 1991, 1993; KOULIANOS et al., 1999; MARDULYN & CAMERON, 1999; CAMERON & MARDULYN, 2001; KAWAKITA et al., 2008). Os métodos utilizados no fragmento 28S foram unânimes em apresentar Euglossina como a primeira subtribo a divergir e posicionou Apina como mais proximamente relacionada ao clado formado por Bombina e Meliponina. Cameron & Mardulyn (2001) analisando unicamente esse mesmo fragmento gênico para quinze espécies no grupo interno e quatro no externo encontraram outro tipo de relacionamento, Apina e Euglossina mostraram-se grupos irmãos. Vale ressaltar que no trabalho citado, esse clado esteve mais proximamente relacionado a duas espécies do grupo externo do que ao clado Bombina e Meliponina.

O fragmento 16S, por sua vez, sustentou o oposto, Apina como sendo o primeiro grupo a divergir e Euglossina como mais proximamente relacionada ao clado Bombina e Meliponina. Curiosamente, as análises de máxima verossimilhança do fragmento citb e a análise do fragmento EF-1α pela otimização direta sustentam o mesmo posicionamento que o gene 16S. Cameron & Mardulyn (2001) também utilizaram o citb e encontraram esse mesmo resultado. Três outros trabalhos utilizaram o fragmento 16S, um deles apontou o mesmo resultado que obtivemos aqui, Apina como o primeiro clado a divergir (CAMERON, 1993). Já os outros dois agruparam Apina e Euglossina (CAMERON, 1991; CAMERON & MARDULYN, 2001), sendo que neste último, não se recuperou a monofilia de Bombina.

Os métodos restantes usados nesses dois fragmentos (citb e EF-1α) sustentam a terceira topologia, agrupam Euglossina e Apina, fazendo com que as espécies de ambas as subtribos tenham compartilhado um ancestral comum mais recente. Essa também foi a topologia apresentada por Kawakita e colaboradores (2008) ao estudar o fragmento EF-1α. Assim como é a topologia encontrada nos trabalharam que investigaram mais de um gene (CAMERON & MARDULYN, 2001 – 4 genes; KAWAKITA et al., 2008 – 12 genes; CARDINAL et al., 2010 – 7 genes).

É interessante notar que todos os métodos encontraram três topologias diferentes, dependendo do fragmento gênico que foi utilizado. Assim, de acordo com as análises moleculares, qualquer arranjo é possível entre Apina e Euglossina, a primeira subtribo a divergir pode ser Apina ou Euglossina, ou ainda, ambas podem formar um clado sendo grupos irmãos. A escolha depende do fragmento gênico utilizado e do método que se acredita ser o mais apropriado. Observamos que a escolha do método não causa tanta influência como a escolha do fragmento. No entanto, as análises moleculares são unânimes em apontar Bombina e Meliponina como grupos irmãos com elevados valores de suporte, não deixando dúvidas quanto a este relacionamento filogenético. Dessa forma, é importante que se utilizem tantos fragmentos quanto seja possível, de modo que o caminho evolutivo apontado pela maioria dos genes reflita o processo evolutivo real. E parece que quanto maior o conjunto de dados que se utiliza, mais forte fica o relacionamento entre Apina e Euglossina posicionando-as como grupos irmãos (CAMERON & MARDULYN, 2001; KAWAKITA et al., 2008; CARDINAL et al., 2010).

Haja vista que a topologia ((A,E),(B,M)) é a encontrada na análise final neste trabalho e em vários outros quando se utilizam vários fragmentos gênicos (CAMERON, 1991; SHEPPARD & MCPHERON, 1991; KOULIANOS et al., 1999; CAMERON & MARDULYN, 2001; KAWAKITA et al., 2008; CARDINAL et al., 2010), acreditamos que a melhor topologia seja esta, a que aponta Meliponina como grupo irmão de Bombina e Euglossina como grupo irmão de Apina. Ressaltando que mesmo nesses trabalhos, cada sequência gênica, quando analisada isoladamente, aponta para uma filogenia diferente.

1.4.3 E afinal, a eussocialidade surgiu quantas vezes?

Admitindo-se que a topologia (A,E),(B,M) reflita a evolução real das abelhas corbiculadas, uma vez que as análises são unânimes em agrupar Bombina e Meliponina e que Apina tende a se agrupar com Euglossina quanto mais genes são acrescentados, acreditamos que a eussocialidade avançada teria surgido mais de uma vez. Uma, no ancestral de Meliponina e outra, no ancestral de Apina e ainda, que a eussocialidade primitiva já estava presente no ancestral de todas as abelhas corbiculadas, tendo Bombina se mantido primitivamente eussocial e Euglossina tendo sofrido vários níveis de reversões,

até o retorno completo ao comportamento solitário em algumas espécies. Essa foi a mesma conclusão a que chegaram Cardinal & Danforth (2011).

Sabe-se que espécies primitivamente eussociais quase sempre possuem estágios solitários e a seleção pode favorecer o aumento ou a diminuição da complexidade social (MICHENER, 1974). Variações nos níveis de socialidade em diferentes populações da mesma espécie sugerem a evolução da diminuição tanto quanto do aumento das interações sociais dentro de certas espécies primitivamente eussociais (MICHENER, 1974). Dessa forma, essa oscilação de um nível social para outro provavelmente ocorreu e a reversão pode ser tão comum quanto à progressão para níveis sociais mais elaborados (MICHENER, 1974). Somente as espécies altamente eussociais (Apina e Meliponina) atingiram um patamar onde reversões para outros estágios, mesmo que igualmente parcimoniosas são bastante improváveis porque as rainhas de colônias eussociais perderam quase completamente suas habilidades para sobreviver sem a ajuda das operárias e, além disso, as colônias são perenes e estabelecidas exclusivamente via enxameio (MICHENER, 1944). Corroborando essas informações, Danforth (2002) e Danforth e colaboradores (2003) estudando Halictidae concluíram que as reversões são muito mais comuns nos himenópteros primitivamente sociais do que se imaginava, sendo muito difícil o surgimento da eussocialidade, porém muito fácil a sua perda.

Todas essas informações sustentam a hipótese de evolução da eussocialidade apresentada no primeiro parágrafo. A socialidade teria surgido no ancestral comum das corbiculadas (CARDINAL & DANFORTH, 2011), sendo mantida em Bombina. Aquilo que é chamado de eussocialidade avançada teria, então, surgido independentemente em Meliponina e Apina, enquanto em Euglossina teriam ocorrido diferentes graus de reversão, levando a maior parte dos representantes desse táxon ao comportamento solitário. Desse modo, os casos de solitariedade encontrados principalmente em *Euglossa* (DRESSLER, 1982; AUGUSTO & GARÓFALO, 2004) seriam efeito de evolução convergente.

1.5 TABELAS E FIGURAS

Tabela 1.1. Lista das espécies utilizadas nas análises moleculares.

Táxons	EF-1α	28S	16S	citb	Genes combinados
Grupos externos					
Halictidae					
Halictidae sp1	x	x		x	
Auglochlora cfr. *morrae*	x	x	x	x	x
Megachilidae					
Megachile maculata	x	x	x		x
Apidae					
Xylocopinae					
Xylocopini					
*Xylocopa (*cfr. *Neoxylocopa)*	x	x	x	x	x
Ceratini					
Ceratina sp.	x				
Apinae					
Anthophorini					
Anthophorini sp1	x		x		
Grupo interno					
Apini					
Apina					
Apis mellifera	x	x	x	x	x
Bombina					
Bombus brasiliensis	x	x	x	x	x
Bombus pauloensis	x	x	x	x	x
Euglossina					
Eulaema nigrita	x	x	x	x	x
Euglossa chordata	x	x	x	x	x
Euglossa pleosticta	x	x	x	x	x
Euglossa securigera	x	x	x	x	x
Meliponina					
Celetrigona longicornis	x	x	x	x	x
Frieseomelitta languida	x	x	x	x	x
Frieseomelitta varia	x	x	x		x
Melipona scutellaris	x	x	x		x
Nannotrigona testaceicornis	x	x	x		x
Partamona conf. *helleri*	x	x	x		x
Plebeia droryana	x	x	x	x	x
Scaptotrigona aff. *depilis*	x	x	x	x	x
Scaura longula	x	x	x	x	x
Tetragonisca angustula	x	x	x	x	x
Trigona recursa	x	x	x	x	x
Trigona spinipes	x	x	x		x

Tabela 1.2. Primers e programas utilizados nas reações de PCR para cada fragmento gênico.

	Primers	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final
EF-1	5’ GGA CAC AGA GAT TTC ATC AAR AA 3’ 5’ TTG CAA AGC TTC RTG RTG CAT TT 3’	5’ a 94◦C	30 x 30’’ a 94◦C	30’’ a 55°C	60’’ a 72°C	7’ a 72°C
28S	5' AAG AGA GAG TTC AAG AGT ACG TG 3' 5' TAG TTC ACC ATC TTT CGG GTC CC 3'	30’’ a 94°C	35 x 60’’ a 94°C	60’’ a 55-60°C		2’ a 72°C
16S	5’ CAC CTG TTT ATC AAA AAC AT 3’ 5’ TAT AGA TAG AAA CCA AYC TG 3’			60’’ a 50-55°C		
citb	5' CGT TTA ATT CAY ATA AAT GG 3' 5' ATT ACA CCT CCT AAT TTA TTA GGA AT 3'					

Tabela 1.3. A) Topologias parciais encontradas por meio de análise de parcimônia em cada um dos quatro fragmentos gênicos em decorrência do grupo externo utilizado. B) Topologias parciais encontradas por meio de parcimônia, máxima verossimilhança (ML) e alinhamento dinâmico (POY) para os quatro fragmentos gênicos analisados conjuntamente em decorrência do grupo externo utilizado. Grupos externos: Hal – Halictidae, Meg – Megachilidae, An – Anthophorini, Ce – Ceratinini, Ei – Eucerini, Xy – Xylocopini. Grupo interno: A - Apina, B – Bombina, E – Euglossina, Ec – *Euglossa*, En – *Eulaema*, M - Meliponina. Quando não houve grupo externo posicionado internamente foi exibida somente a topologia referente ao grupo interno. Quando o grupo externo posicionou-se internamente, foram exibidos somente esses agrupamentos. Os fragmentos EF-1α, 16S e os genes combinados utilizaram Ceratinini. 28S e citb utilizaram Eucerini. Megachilidae não foi utilizado nas análises do citb. Fundo transparente: topologias bem resolvidas; cinza claro: topologias sem grupo externo incluso, porém, mal resolvidas; cinza escuro: topologias mal resolvidas e com grupos externos inclusos.

A)	Grupos externos					Topologias para cada um dos genes			
	Hal	Meg	An	Ce/Ei	Xy	EF-1α	28S	16S	citb
	x	x	x	x	x	((A,E),(B,M))	((Al,An),(A,(B,M)))	((Ce,Xy),(B,M))	(Al,An,Xy,A,E,(B,M))
	x	x		x	x	((Ce,Xy),B)	(Al,(A,(B,M)))	((Ce,Xy),B,(A,E)M)	((Al,Xy),A,E,(B,M))
	x	x	x		x	(Xy,A,E,(B,M))	(An,(A,(B,M)))	(A,(E,(B,M)))	(An,Xy,A,E,(B,M))
	x	x	x	x		((Ce,B)M)	((Al,An),(A,(B,M)))	(Ce,An,(A,E),(B,M))	(An,(Al,A),(E,(B,M)))
	x	x	x			((A,E),(B,M))	(An,(A,(B,M)))	(A,En,Ec,(B,M))	(A,E,(B,M))
	x	x		x		((Ce,B)M)	(E,(A,(B,M)))	((B,(A,E))M)	((Al,A),(E,(B,M)))
	x	x			x	(Xy,B,M)	(E,(A,(B,M)))	((A,E),(Xy,(B,M)))	((A,E),(B,M))
	x	x				((A,E),(B,M))	(E,(A,(B,M)))	(M,(B,(A,E)))	(A,(E,(B,M)))
			x			((A,E),(B,M))	A,E,(B,M)	Ec,(A,En,(B,M))	(A,E,(B,M))
					x	((A,E),B,M)	(B,((A,E)M))	((A,E),(B,M))	((A,E),(B,M))

B)	Grupos externos					Topologias para genes combinados		
	Hal	Meg	An	Ce/Ei	Xy	Parcimônia	ML	POY
	x	x	x	x	x	((A,E),(B,M))	((A,E),(B,M))	((A,E),(Xy,(B,M)))
	x	x			x	((A,E),(B,M))	((A,E),(B,M))	(Hal,(Meg,(Xy,A, E,(B,M))))
	x				x	(A,(E,(B,M)))	(Hal,(A,E),(Xy,(B,M)))	

Tabela 1.4. Relacionamentos filogenéticos propostos entre as subtribos de Apini de acordo com cada fragmento gênico e método utilizado.

	EF-1α	28S	16S	citb	Genes combinados
Parcimônia	((A,E),(B,M))	(E,(A,(B,M)))	(A,(E,(B,M)))	((A,E),(B,M))	((A,E),(B,M))
POY	(A,(E,(B,M)))	(E,(A,(B,M)))	(An,A,E,(Xy,(B,M)))	((A,E),(B,M))	(Xy,A,E,(B,M))
ML	((A,E),(B,M))	(E,(A,(B,M)))	(A,(E,(B,M)))	(A,(E,(B,M)))	((A,E),(B,M))

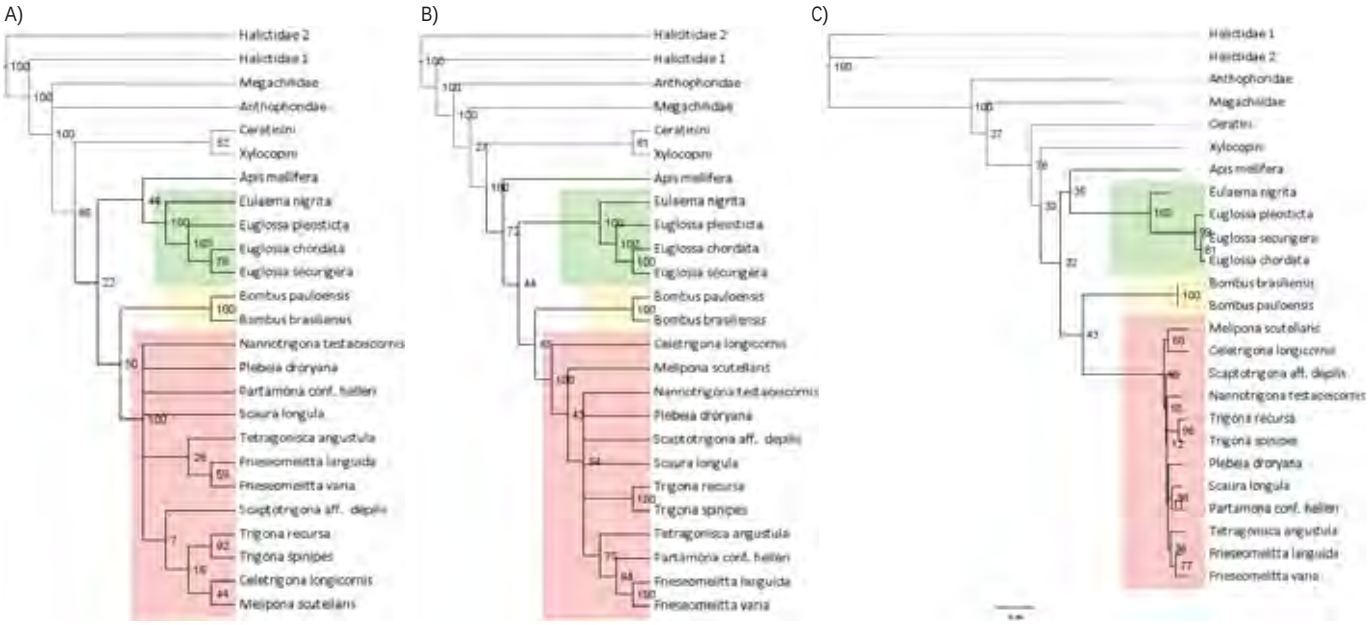


Figura 1.1. Análise filogenética molecular retratando a evolução das abelhas corbiculadas segundo o fragmento gênico **EF-1α** de 819 pares de bases. A) Consenso estrito das 24 árvores igualmente parcimoniosas encontradas pelo método da parcimônia, L = 858, CI = 56 e RI = 68. B) Consenso estrito das oito árvores igualmente parcimoniosas encontras através da otimização direta. C) Árvore mais verossímil segundo o método da máxima verossimilhança, -log-likelihood = 4905.9746 e L = 1.583. Números nos ramos são valores de bootstrap em 1000 replicações. L = comprimento da árvore, CI = índice de consistência, RI = índice de retenção. Código de cores: rosa = Meliponina, amarelo = Bombina, verde = Euglossina. *Apis mellifera* = Apina.

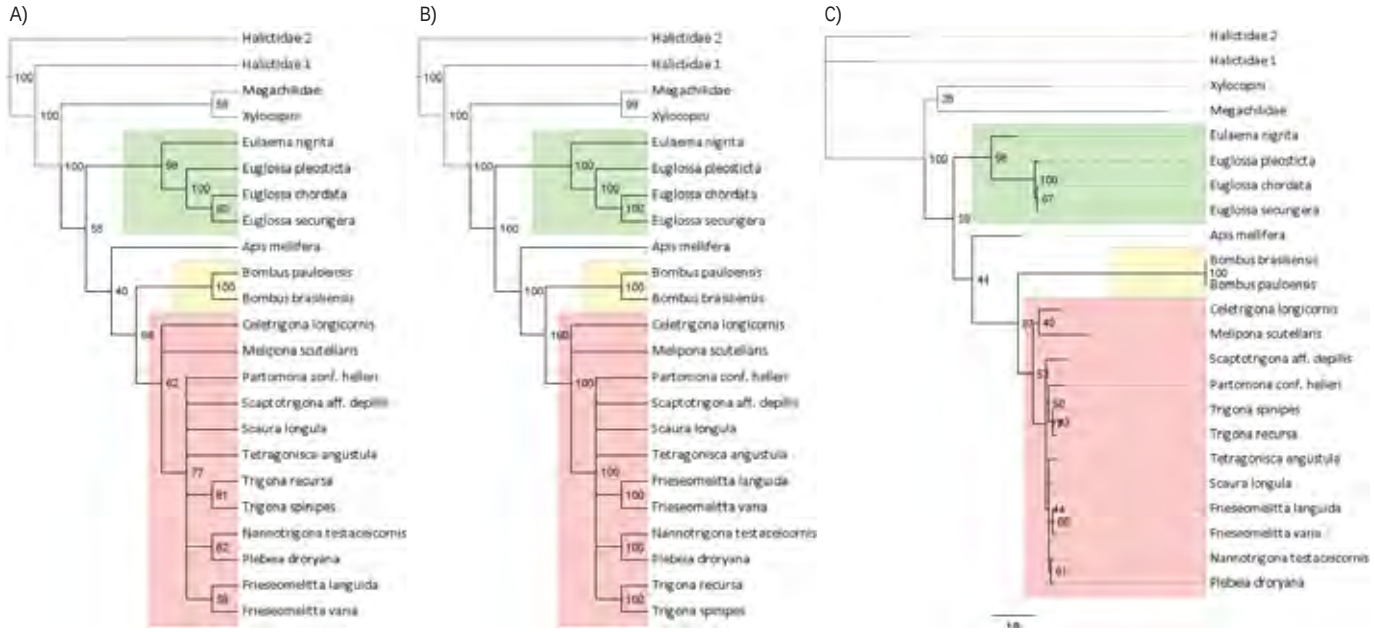


Figura 1.2. Análise filogenética molecular retratando a evolução das abelhas corbiculadas segundo o fragmento gênico **28S** de 745 pares de bases. A) Consenso estrito das seis árvores igualmente parcimoniosas encontradas pelo método da parcimônia, L = 442, CI = 72 e RI = 76. B) Consenso estrito das cinquenta árvores igualmente parcimoniosas encontras pela otimização direta. C) Árvore mais verossímil segundo o método da máxima verossimilhança, -log-likelihood = 3171.7707 e L = 0.872. Números nos ramos são valores de bootstrap em 1000 replicações. L = comprimento da árvore, CI = índice de consistência, RI = índice de retenção. Código de cores: rosa = Meliponina, amarelo = Bombina, verde = Euglossina. *Apis mellifera* = Apina.

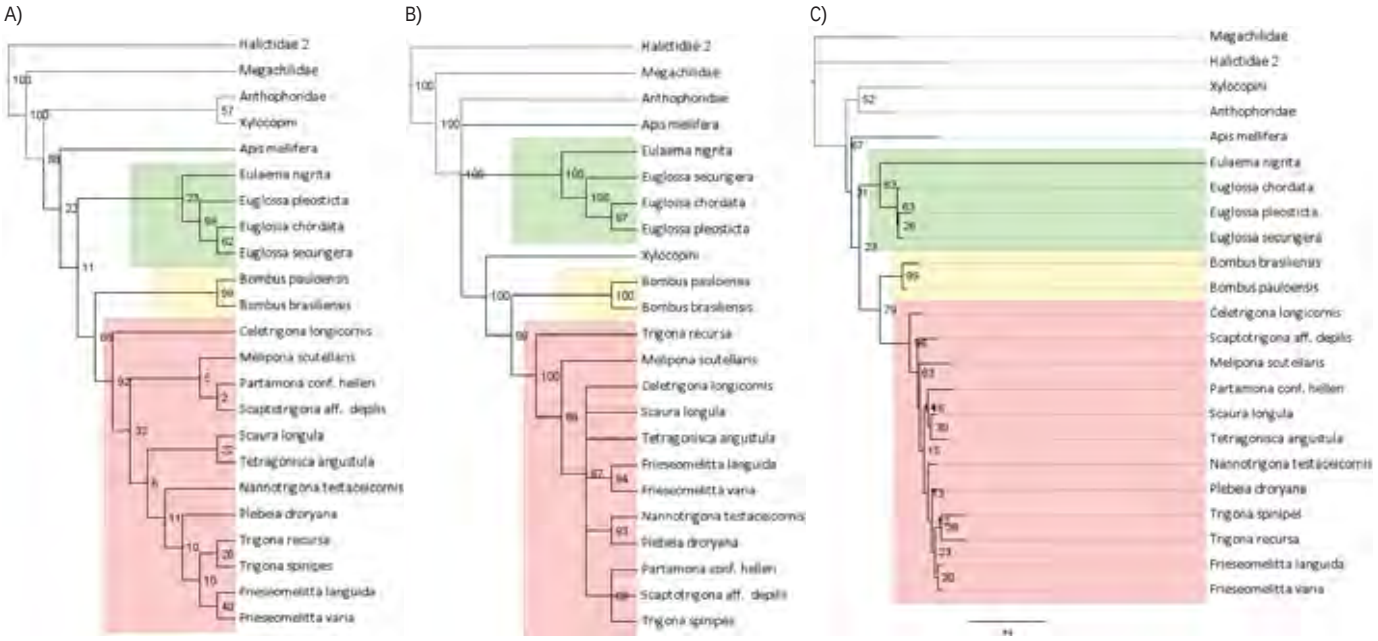


Figura 1.3. Análise filogenética molecular retratando a evolução das abelhas corbiculadas segundo o fragmento gênico **16S** de 620 pares de bases. A) Árvore mais parcimoniosa encontradas pelo método da parcimônia, L = 777, CI = 50 e RI = 53. B) Consenso estrito das dez árvores mais parcimoniosas encontras pela otimização direta. C) Árvore mais verossímil segundo o método da máxima verossimilhança, -log-likelihood = 3974.6779 e L = 2.999. Números nos ramos são valores de bootstrap em 1000 replicações. L = comprimento da árvore, CI = índice de consistência, RI = índice de retenção. Código de cores: rosa = Meliponina, amarelo = Bombina, verde = Euglossina. *Apis mellifera* = Apina.

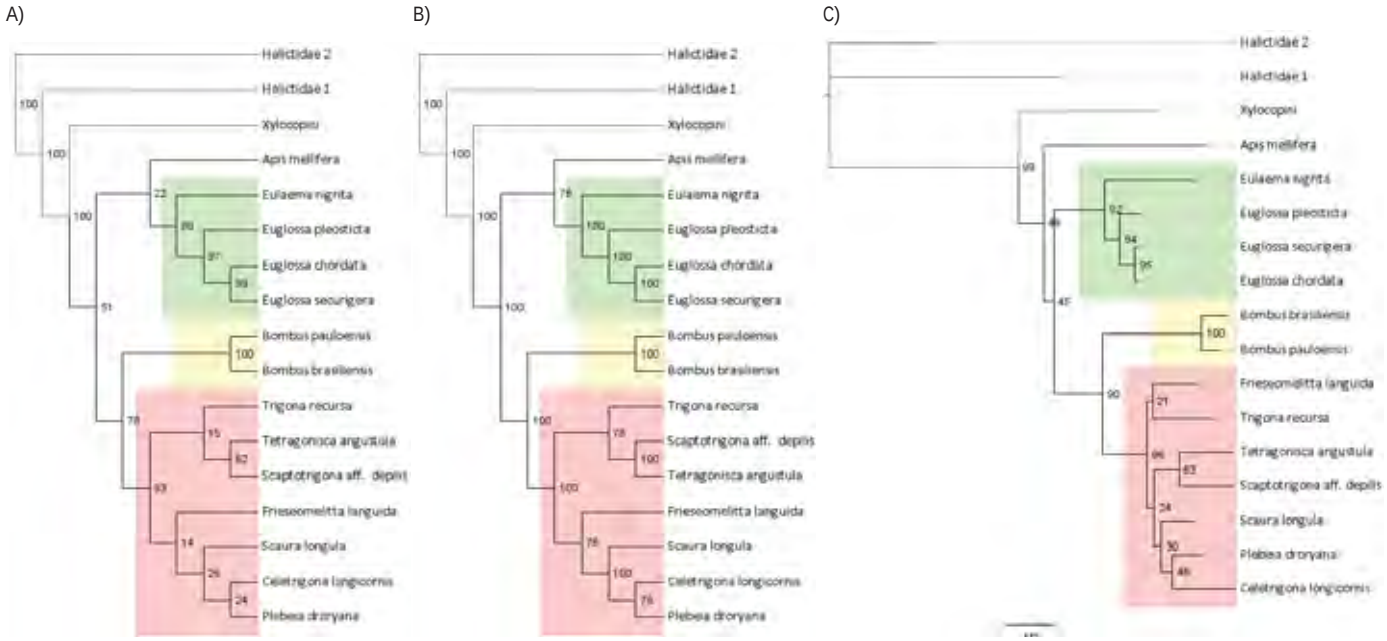


Figura 1.4. Análise filogenética molecular retratando a evolução das abelhas corbiculadas segundo o fragmento gênico **citb** de 574 pares de bases. A) Árvore mais parcimoniosa encontrada pelo método da parcimônia, L = 784, CI = 53 e RI = 53. B) Árvore mais parcimoniosa encontra pela otimização direta. C) Árvore mais verossímil segundo o método da máxima verossimilhança, -log-likelihood = 3929.0212 e L = 2.174. Números nos ramos são valores de bootstrap em 1000 replicações. L = comprimento da árvore, CI = índice de consistência, RI = índice de retenção. Código de cores: rosa = Meliponina, amarelo = Bombina, verde = Euglossina. *Apis mellifera* = Apina.

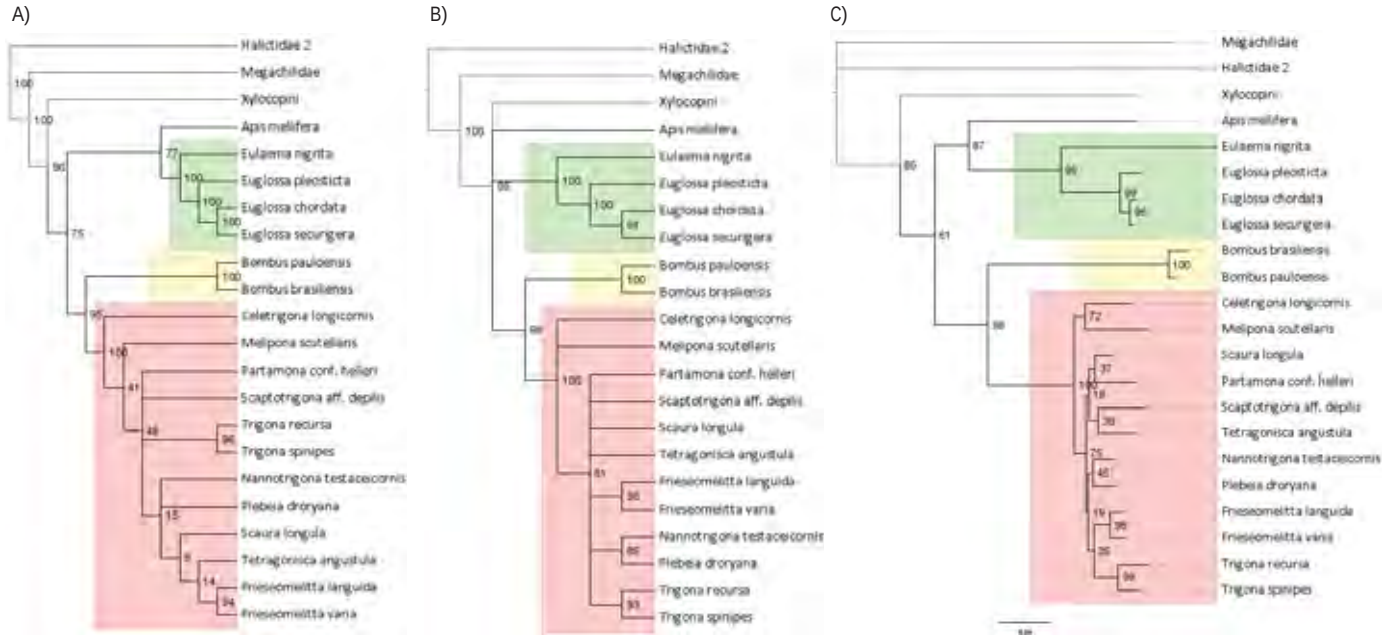


Figura 1.5. Análise filogenética molecular retratando a evolução das abelhas corbiculadas segundo quatro fragmentos gênicos totalizando 2731 pares de bases. A) Consenso estrito das quatro árvores igualmente parcimoniosa encontradas pelo método da parcimônia, L = 2545, CI = 58 e RI = 62. B) Consenso estrito das duas árvores mais parcimoniosas encontras através da otimização direta. C) Árvore mais verossímil segundo o método da máxima verossimilhança, -log-likelihood = 14752.5799 e L = 1.940. Números nos ramos são valores de bootstrap em 1000 replicações. L = comprimento da árvore, CI = índice de consistência, RI = índice de retenção. Código de cores: rosa = Meliponina, amarelo = Bombina, verde = Euglossina. *Apis mellifera* = Apina.

Capítulo 2

Filogenia comportamental das abelhas corbiculadas (Apidae, Apinae) baseada em caracteres de auto-limpeza e Análise de evidência total

Resumo

Caracteres comportamentais vêm sendo extensivamente utilizados nos últimos anos como fonte importante de caracteres para inferência filogenética. Uma vez que o posicionamento filogenético das subtribos de Apini vem sendo cada vez mais discutido e a necessidade de novos caracteres é iminente, decidimos utilizar padrões comportamentais de auto-limpeza de modo a obter mais caracteres. Analisamos a presença e ausência de certos padrões comportamentais, assim como a sequência de alguns deles, obtendo 95 caracteres no total. Onze espécies representantes de todos os grupamentos compuseram o grupo interno e um Xylocopini (Apidae, Xylocopinae) compôs o grupo externo. Por meio de análises de parcimônia, encontramos uma árvore mais parcimoniosa (E,(B,(A,M))) com 186 passos, CI = 47 e RI = 47. Essa topologia está em acordo com a maioria dos trabalhos que utilizaram dados morfológicos e os poucos que utilizaram dados comportamentais, sugerindo que a eussocialidade surgiu uma única vez no ancestral comum do clado (A,M). No sentido de aumentar o número de caracteres, adicionou-se a essa matriz os caracteres moleculares dos quatro fragmentos gênicos obtidos no capítulo anterior. Obtivemos duas árvores igualmente parcimoniosas com 1768 passos, CI = 67 e RI = 60. O consenso estrito das novas árvores apresentou a mesma topologia de quando se utilizou somente dados moleculares ((A,E),(B,M)), indicando que a eussocialidade teria surgido duas vezes, uma no ancestral comum de Apina e outra no ancestral comum de Meliponina.

Abstract

Behavioral traits have been extensively used in recent years as an important source of characters in phylogenetic inference. Because the phylogenetic placement of the subtribes within Apini is increasingly debated and the need of new character is imminent, we decided to use behavioral patterns like self-cleaning to gather more characters. We analyzed the presence and absence of certain behavioral patterns, as well as the sequence of some of them, obtaining 95 characters. Eleven species belonging to all groups comprised the ingroup and Xylocopini (Apidae, Xylocopinae) composed the outgroup. Through parsimony analysis, we find only one most parsimonious tree (E,(B,(A,M))) with 186 steps, CI = 47 and RI = 47. This topology is in agreement with most studies using morphological data and the few that used behavioral data suggesting that advanced eusociality arose only once in the common ancestor of the clade (A,M). In order to increase the number of characters, molecular data of four gene fragments obtained in the previous chapter was added in the matrix. We found two equally parsimonious trees with 1768 steps, CI = 67 e RI = 60. The strict consensus' topology pointed out the same topology when using only molecular data ((A,E),(B,M)), indicating that the advanced eusociality have arisen twice, once in Apina common ancestor and other in Meliponina common ancestor.

2.1 INTRODUÇÃO

A utilização de caracteres comportamentais para inferir filogenias é relativamente comum em invertebrados e como qualquer outra característica geneticamente determinada, é potencialmente útil para reconstruções filogenéticas (JANDER, 1966 apud BASIBUYUK & QUICKE, 1999; FARISH, 1972). Além disso, caracteres comportamentais não são mais homoplásticos do que os caracteres morfológicos ou moleculares, podendo ser perfeitamente utilizados nas análises filogenéticas (PRUM, 1990; DE QUEIROZ & WIMBERGER, 1993; KURT & HARTL, 1995; RENDALL & DI FIORE, 2007).

Basibuyuk & Quicke (1999) propuseram uma filogenia para Hymenoptera baseada em comportamentos de auto-limpeza. No sentido tradicional, os movimentos de limpeza dos insetos são estereotipados (WILSON, 1962; THELEN & FARISH, 1977; TURILLAZZI & ZAPPONI, 1982). Em besouros, por exemplo, indivíduos sem apêndices torácicos ou com apêndices danificados fazem os movimentos de limpeza de modo idêntico àqueles com apêndices normais, mesmo com a limpeza sendo impossível (VALENTINE, 1973). A variação nos movimentos e na sequência de limpeza provê informação relevante para classificação e filogenia (JANDER, 1966 apud BASIBUYUK & QUICKE, 1999; FARISH, 1972; VALENTINE & GLORIOSO, 1978).

Segundo Michener (1990), os caracteres morfológicos capazes de resolver os conflitos entre as subtribos já foram extensivamente explorados, portanto, para resolver o impasse filogenético em Apini, diferentes tipos de caracteres filogenéticos devem ser utilizados. As unidades comportamentais que juntas formam o comportamento social nas abelhas corbiculadas apresentam muitos caracteres informativos (MICHENER, 1974 apud WCISLO, 1997), que são raramente utilizados em análises filogenéticas (NOLL, 2002). De acordo com Noll (2002), dados comportamentais são muito úteis para reconstrução filogenética nestas abelhas e deveriam ser usados sempre que possível. Desta forma, avaliamos o repertório comportamental de auto-limpeza nessas abelhas com o propósito de identificar novos caracteres para a inferência filogenética nesse grupo e, consequentemente, a evolução da eussocialidade.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Preparação dos espécimes e obtenção dos caracteres

As abelhas foram obtidas por meio de coleta ativa em flores e por atração com isca aromática de cineol no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, campus da UNESP em São José do Rio Preto; na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, campus da USP em Ribeirão Preto e na Serra do Japi, município de Jundiaí. Também foram utilizadas abelhas provenientes do meliponário da FFCLRP/USP.

Sempre que possível foram coletados ao menos dez indivíduos de cada espécie. Cada abelha foi colocada em cima da bancada, sobre uma folha de sulfite branca e com uma placa de petri invertida sobre ela. A abelha permaneceu assim por alguns minutos sem que o pesquisador interferisse. Decorrido esse tempo no novo ambiente, o comportamento de auto-limpeza ocorria naturalmente na maioria das vezes. Quando o comportamento não ocorria, algumas estratégias foram adotadas para induzi-lo: a abelha foi colocada alguns segundos no congelador, ou foi impregnada com grafite ou foi alimentada com pequenos pedaços de maçã. Cada uma dessas estratégias pode induzir o comportamento de auto-limpeza, a primeira por diminuir o metabolismo do animal, a segunda por sujá-lo e a terceira por alimentá-lo (é conhecida a ocorrência de limpeza após a alimentação). As duas primeiras estratégias já foram utilizadas por Farish (1972) e Basibuyuk & Quicke (1999) e a última por Jander & Jander (1978). Cada espécime foi filmado por pelo menos dez minutos. Posteriormente, os vídeos foram assistidos em câmera lenta, quadro a quadro, as limpezas foram anotadas e elaborou-se um etograma contendo as unidades comportais e suas descrições. Os caracteres e seus estados foram sugeridos com base nas observações e no etograma elaborado.

Para a perfeita compreensão da descrição dos caracteres fazem-se necessário alguns esclarecimentos:

a) A bilateralidade dos indivíduos foi considerada, principalmente nas análises de sequências comportamentais. Portanto, para nós, é diferente dizer que a abelha limpou a antena ipsilateral e depois limpou o olho ipsilateral e dizer que ela limpou a antena ipsilateral e depois limpou o olho contralateral. De forma análoga, o comportamento no qual

o indivíduo limpa o olho e a antena, ambos os movimentos do lado esquerdo é considerado o mesmo no qual ele limpa o olho e a antena, ambos os movimentos do lado direito.

b) Outro esclarecimento importante relaciona-se às simbologias utilizadas na descrição dos caracteres: os números foram atribuídos de acordo com a ordem em que foram observados, ou seja, os comportamentos observados primeiro tiveram os primeiros números. As letras maiúsculas referem-se ao local da limpeza, "L" refere-se à limpeza de perna, "W" à limpeza de asa, "T" à limpeza de mesossoma e "A" à limpeza de metassoma. A letra "b" minúscula foi usada para indicar quando o movimento ocorreu dos dois lados do corpo ao mesmo tempo.

No etograma, utilizou-se o seguinte código: Número do caráter na matriz filogenética (ex. 1), código do caráter (ex. 1L), nome do caráter (ex. limpeza das pernas posteriores) e seguiu-se com a descrição do caráter (ver etograma em 2.3.1).

2.2.2 Análise filogenética comportamental

Para compor o grupo interno das análises comportamentais procuramos escolher espécies em número representativo de cada uma das quatro subtribos, usando mais espécies nos grupos mais diversos taxonomicamente. No entanto, tivemos de limitar a análise a poucas espécies, mantendo a proporcionalidade entre os grupos, uma vez que a análise comportamental requer muito mais tempo do que outros tipos de análises devido à observação quadro a quadro dos vídeos e à necessidade de observações em número suficiente de modo a abranger todo o repertório comportamental das espécies sob estudo. Dessa forma, foram utilizadas onze espécies no grupo interno e uma no grupo externo (tabela 2.1). Essa espécie do grupo externo é uma Xylocopini comumente utilizada como grupo externo nas investigações filogenéticas pertinentes a tribo Apini. Ela pertence à mesma família do grupo interno (Apidae), no entanto, está alocada em outra subfamília, Xylocopinae.

A análise filogenética seguiu a metodologia desenvolvida por Hennig (1966) e complementada por inúmeros avanços nas últimas décadas, sintetizada em Scotland & Pennington (2000), Schuh (2000) e Amorim (2002). Além do critério de ausência e presença de caracteres comportamentais comumente utilizados, sequências comportamentais

também foram utilizadas como caracteres filogenéticos. A otimização dos caracteres ocorreu por comparação com o grupo externo, de acordo com o proposto por Nixon & Carpenter (1993). Na maioria dos casos, os caracteres foram tratados como não aditivos, sendo que as exceções estão devidamente identificadas.

A procura pela melhor árvore deu-se pelo método da parcimônia, com adição aleatória de táxons, utilizando-se a New Technology Search com os algoritmos Ratchet, Drift, Tree Fusion e TBR-max. O suporte dos ramos foi acessado através da análise de bootstrap com 1000 replicações, utilizando 10 buscas por replicação e TBR. Foi realizada busca sem pesagem e com pesagem implícita no TNT com k=3,0000 (GOLOBOFF et al., 2008), utilizando o Winclada (Nixon, 2002) como interface.

2.2.3 Análise filogenética combinada: Caracteres comportamentais e moleculares

Uma vez que um número menor de táxons foi utilizado nas análises comportamentais em comparação com as análises moleculares do capítulo anterior, tivemos de reduzir o número de táxons das análises em conjunto de modo a minimizar os *missing data*. Desta forma, todas as análises realizadas com dados comportamentais e moleculares foram feitas utilizando-se os mesmos 12 táxons da análise comportamental. Para testar a influência da combinação de dados comportamentais e moleculares, acrescentaram-se os 95 caracteres comportamentais na matriz de dados moleculares para cada fragmento individualmente e para todos eles em conjunto, sempre utilizando os mesmos 12 táxons. Esse procedimento foi necessário para confirmar se o cladograma encontrado utilizando esse número reduzido de táxons continuava sendo o mesmo daquele encontrado no capítulo anterior com um número maior de táxons e, assim, poder afirmar se houve ou não influência dos caracteres comportamentais após a inclusão desses dados.

As sequências foram alinhadas por meio do algoritmo Muscle implementado no programa Mega 5 (TAMURA et al., 2011). A procura pela árvore mais parcimoniosa deu-se por meio do programa TNT (GOLOBOFF et al., 2008), usando as configuração padrões da New Technology Search com os algoritmos Ratchet, Drift, Tree Fusion e TBR-max com adição aleatória de táxons. O programa Winclada 1.89 (NIXON, 2002) foi usado como interface. A

robustez dos ramos foi acessada através de 1000 replicações de bootstrap, utilizando 10 buscas por replicação e TBR.

2.3 RESULTADOS

A matriz completa contou com 95 caracteres (tabela 2.2), 25 relacionados à presença e ausência de determinados comportamentos e 70 relacionados a diversas sequências combinadas destes comportamentos. Para facilitar o entendimento dos caracteres comportamentais, foi elaborada a figura 2.1 contendo as principais estruturas anatômicas utilizadas nas descrições.

2.3.1 Lista de caracteres

2.3.1.1 Limpeza de perna

Caráter 1. Limpeza das pernas posteriores – 1L: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: os tarsos de ambas as pernas posteriores se esfregam, com movimentos vai-e-vém, da porção proximal para a distal. Abdome permanece levemente levantado.

Caráter 2. Limpeza da tíbia posterior – 3L: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: o basitarso posterior é encostado na porção proximal interna da tíbia posterior contralateral e desliza para baixo, limpando-a por toda a sua extensão. Abdome acompanha o movimento da perna da limpeza, inclinando-se para cima e retornando à posição de repouso conforme ela sobe e desce pela tíbia. Perna média ipsilateral à perna que é limpa pode ajudar na limpeza, esfregando a porção externa do fêmur ou tíbia em sincronia com a perna posterior contralateral.

Caráter 3. Limpeza da perna média e posteriores – 4L: (0) ausente; (1) 4L e 4L* presentes, com 4L* só ocorrendo antes de 4L; (2) 4L e 4L* presentes, 4L ocorrendo de forma independente do 4L*; (3) 4L e 4L* presentes e fundidos; caráter tratado como não ordenado.

Descrição: a perna média pode ser colocada entre as duas pernas posteriores de duas formas diferentes: a perna média se junta com a perna posterior contralateral e depois a outra perna posterior é acrescentada ou a perna média aproxima-se da perna posterior ipsilateral, as duas pernas posteriores são levantadas e colocadas uma de cada lado da perna média, como se a abelha tivesse ‘dado um pulo’ com as pernas posteriores. Após a perna média estar posicionada entre as pernas posteriores, ela é

puxada para frente e para o seu lado de origem. 4L* - uma variação que pode ocorrer é as três pernas serem colocadas embaixo do abdome, mas com a perna posterior ipsilateral no meio, ao invés da perna média. Quando isto ocorre, é a perna posterior que é puxada. Geralmente o 4L* está associado às sequências de limpeza envolvendo o 4L. Por exemplo, se a perna média direita for puxada, a perna posterior direita fica no meio e a perna média direita é imediatamente colocada ao lado daquela, que então é puxada.

Caráter 4. Limpeza da perna anterior e média – 5L: (0) 5L e 5L* presentes, com 5L* precedendo 5L; (1) 5L e 5L* presentes, com 5L* ocorrendo somente após 5L; (2) somente 5L presente; caráter ordenado.

Descrição: a perna anterior dirige-se para trás ao mesmo tempo em que a perna média ipsilateral dirige-se para frente; a perna média dobra formando ângulos agudos entre fêmur-tíbia e tíbia-basitarso e a perna anterior é puxada para frente, passando por dentro do espaço formado pela perna média dobrada. Dessa forma, limpa-se a porção externa da tíbia anterior. 5L* - uma variação que pode ocorrer antes ou após esta sequência de movimentos é a porção externa do basitarso médio tocar a parte interna e proximal da tíbia anterior e, ao mesmo tempo em que a perna média desliza para baixo, a perna anterior desliza para cima.

Caráter 5. Limpeza das tíbias posteriores – 7L: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: a perna média posiciona-se na região medial externa da tíbia posterior ipsilateral e desliza para baixo. O movimento é muito rápido e ocorre nos dois lados do corpo simultaneamente. Às vezes, as pernas medianas quase não deslizam, encostam, vão um pouco para baixo, separam-se e encostam um pouco acima novamente, repetindo essa movimentação muitas vezes.

2.3.1.2 Limpeza de asa

Caráter 6. Limpeza da superfície dorsal da asa posterior – 1W: (0) ausente; (1) presente com angulação máxima de 45°; (2) presente com angulação máxima de 90° ; caráter ordenado.

Descrição: Rotaciona a asa posterior em 90°, de modo que a asa fique na lateral do corpo, perpendicular à superfície e com a veia costal pra baixo. A asa anterior fica inicialmente em sua posição de repouso, paralela à superfície, mas ao longo das

limpezas, move-se gradualmente para o lado, continuando paralela. A perna posterior ipsilateral, usando fêmur e tíbia, esfrega a asa posterior da região proximal para a apical. Ao mesmo tempo, rotaciona sutilmente o abdome em direção a asa, movimentando-o em sincronia com os movimentos da perna. Este comportamento pode ocorrer de duas formas: na primeira, a asa anterior aumenta gradualmente a angulação, apesar de não separar a margem da asa do corpo, e chega a aproximadamente 45°. Na segunda, esta angulação chega a 90° e a asa pode girar ficando perpendicular à superfície com a veia costal orientada para cima.

Caráter 7. Limpeza da superfície dorsal da asa anterior – 2W: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: As asas sobrepostas que estavam na posição de repouso são rotacionadas 90°, de modo que fiquem ao lado do corpo, perpendiculares à superfície e com a veia costal para baixo. A perna posterior ipsilateral, usando fêmur e tíbia, esfrega a asa anterior da sua metade para a região apical. Vê-se, lateralmente, que a perna movimenta-se amplamente, com junção fêmur-tíbia ultrapassando a região do propódeo. O abdome acompanha os movimentos da perna como descrito em 1W. Assim, a superfície dorsal da asa anterior é limpa com a perna e a ventral da asa posterior com o abdome. Os primeiros movimentos são amplos, como os descritos, mas após algumas sequências, que variam em número, os movimentos tornam-se mais curtos, com a perna limpando só a porção apical e superior da asa. Vê-se, lateralmente, que junção fêmur-tíbia já não alcança o propódeo. Às vezes, os primeiros movimentos da perna ocorrem sem que as asas estejam totalmente abaixadas ao lado do corpo. Nestes casos, parece que a própria perna ajuda a posicioná-las gradualmente e a limpeza ocorre praticamente só na veia costal da asa anterior e no próprio abdome.

Caráter 8. Limpeza da superfície ventral da asa posterior – 3W: (0) limpeza somente com asas adjacentes = 0; (2) limpeza somente com asas sobrepostas = 2; (1) ambos os tipos de limpeza; caráter não ordenado.

Descrição: Rotaciona as asas em 90°, de modo que fiquem ao lado do corpo, com a veia costal para cima e perpendiculares à superfície. Os movimentos da perna e abdome são como os descritos em 1W. Geralmente, existe um primeiro movimento amplo, limpando a asa da sua metade para a região apical e os movimentos seguintes são mais curtos, limpando praticamente apenas a veia costal da asa anterior. No

primeiro movimento, a asa anterior pode não estar bem posicionada e neste caso ocorrem dois movimentos longos. Por outro lado, no último ou dois últimos movimentos, a asa pode subir sutilmente e a limpeza, apesar de ser na porção apical da asa, já não é mais na veia, ocorrendo um pouco mais abaixo. Neste comportamento, as asas podem estar adjacentes, com a asa anterior acima e a posterior abaixo ou podem estar sobrepostas, com a asa anterior mais próxima ao abdome. No primeiro caso, pernas e abdome limpam a asa posterior. Na segunda situação, a perna limpa a asa posterior ventralmente enquanto o abdome limpa a asa anterior dorsalmente.

Caráter 9. Limpeza da superfície ventral da asa anterior – 4W: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: rotaciona a asa anterior em 90°, de modo que ela fique na lateral do corpo, perpendicular à superfície, com a veia costal para cima e abre a asa posterior afastando-a do corpo, deixando-a paralela à superfície em um ângulo de 30° a 90° em relação ao eixo longitudinal do corpo. Os movimentos da perna e abdome são similares ao descrito em 1W, com os primeiros movimentos amplos e os seguintes na porção apical e superior da asa. Algumas vezes, no primeiro movimento, a asa anterior não está bem posicionada e a limpeza ocorre no abdome e porção inferior da asa. Outras variações que podem ocorrer são a diminuição do ângulo da asa posterior nos últimos movimentos e a asa anterior subir sutilmente, como se estivesse gradualmente retornando à posição de repouso. Assim, as últimas limpezas ocorrem ainda na porção apical, porém na parte inferior da asa.

Caráter 10. Vibração das quatro asas – 5W: (0) presente; (1) ausente.

Descrição: a abelha vibra simultaneamente as quatro asas por alguns segundos.

2.3.1.3 Limpeza de mesossoma

Caráter 11. Limpeza ventral do tórax – 1T: (0) presente; (1) ausente.

Descrição: dobra a perna média, de modo a usar o basitarso para limpar a superfície ventral do tórax, bem embaixo da perna, faz movimentos com o basitarso esfregando o tórax de fora pra dentro e da frente pra trás, parece que coxa e trocânter da respectiva perna também são limpos.

Caráter 12. Limpeza dorsal do tórax – 2T: (0) limpeza ampla do tórax; (1) limpeza curta do tórax.

Descrição: encosta o basitarso médio na linha mediana dorsal do tórax e desliza a perna para frente e para lateral, podendo ou não incluir a cabeça na limpeza. Os tarsos podem encostar-se à porção posterior do mesoscuto, próximo à tégula, a tíbia forma aproximadamente 90° com o eixo longitudinal do corpo e, dessa forma, limpa o tórax amplamente. Os tarsos também podem encostar-se na porção anterior do mesoscuto ou mesmo bem próximo à cabeça. Esta variação do movimento, apesar de limpar uma pequena parte do tórax é idêntica ao final da limpeza na sua forma mais ampla, sendo, portanto considerada como um estado diferente do mesmo caráter.

Caráter 13. Limpeza lateral do tórax – 3T: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: arqueia a perna média, formando ângulo de 90° entre fêmur-tíbia e tíbia-basitarso e movimenta a perna para frente e para baixo na lateral do tórax, tíbia fica quase paralela à superfície.

Caráter 14. Limpeza látero-dorsal do tórax – 4T: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: coloca tarsos da perna média próximo a tégula e estica a perna para frente, esfregando essa região látero-dorsal do tórax em linha reta, pode ou não incluir a cabeça.

2.3.1.4 Limpeza de metassoma

Caráter 15. Limpeza da superfície dorsal do abdome – AD: (0) perna sobre abdome e sob a asa; (1) perna sobre abdome e/ou sobre a asa.

Descrição: a perna posterior é posicionada sobre o dorso do abdome em sua porção média e desliza em direção a sua porção final. Essa limpeza pode ser somente no abdome, sem envolver a asa, ficando a perna sobre o abdome e sob a asa ou pode envolver a asa, ficando a perna sobre as duas estruturas.

Caráter 16. Limpeza da superfície lateral do abdome usando fêmur e tíbia da perna ipsilateral – AFT: (0) ausente; (1) presente, ocorrendo anteriormente à limpeza de asa; (2) presente, ocorrendo anteriormente à limpeza de asa e também anteriormente à limpeza de perna; caráter não ordenado.

Descrição: a perna ipsilateral é posicionada na lateral do abdome em sua porção ântero-medial e move-se em direção a porção final do abdome, esfregando o fêmur e a tíbia na superfície a ser limpa, o basitarso não é utilizado.

Caráter 17. Limpeza da superfície lateral do abdome usando tíbia e basitarso da perna ipsilateral – ATB: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: A perna ipsilateral é posicionada na lateral do abdome em sua porção média e move-se em direção a porção final do abdome, encostando somente a porção final da tíbia e inicial do basitarso no abdome.

2.3.1.5 Limpeza de cabeça

Caráter 18. Limpeza unilateral da antena – 1H: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: perna anterior ipsilateral é posicionada entre escapo e flagelo, deixando a antena 'presa' na junção tíbia-basitarso da perna, a perna move-se para frente e para baixo ao longo do comprimento do flagelo. Algumas vezes, vê-se nitidamente a antena sendo colocada no limpador de antena.

Caráter 19. Limpeza bilateral da antena – 1Hb: (0) ausente; (1) simultâneo; (2) descompassado; caráter não ordenado.

Descrição: Igual ao caráter anterior, executado nos dois lados do corpo ao mesmo tempo. O movimento das pernas pode ser totalmente ou praticamente simultâneo ou a limpeza da segunda antena pode começar quando a limpeza da primeira antena já está na metade ou quase acabando. Algumas espécies apresentaram o comportamento das duas formas, nesses casos, o estado do caráter usado foi o predominante no total das limpezas.

Caráter 20. Limpeza da mandíbula – 3H mdb: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: Basitarso da perna anterior ipsilateral é posicionada na base da mandíbula ou na porção final do olho, próximo à região malar e desliza de sua posição inicial até a mandíbula e por sobre a mesma. Dependendo da posição inicial do basitarso, a região malar também é limpa. Às vezes, tem-se a impressão que nesse movimento, a tíbia da referida perna encosta e limpa a metade inferior do olho, ocorrendo a limpeza das duas estruturas simultaneamente.

Caráter 21. Limpeza da metade inferior do olho e clípeo – 3H clp: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: Tíbia e basitarso da perna anterior ipsilateral posiciona-se logo abaixo da antena, a perna desliza da borda para a região mediana do clípeo e de cima para baixo, a tíbia vai ficando paralela à superfície, podendo ou não alcançar o labro. Algumas vezes, a perna posiciona-se mais abaixo, parecendo limpar só o labro. Observando a movimentação da tíbia, da mesma forma como no comportamento anterior, parece que ela encosta e limpa a metade inferior do olho simultaneamente à limpeza do clípeo.

Caráter 22. Limpeza do olho todo e clípeo – 3H olho/clp: (0) ausente = 0; presente = 1.

Descrição: tíbia e basitarso da perna anterior ipsilateral é colocada acima da metade superior do olho. A perna movimenta-se para baixo e para frente da fronte da abelha, em direção ao clípeo, a tíbia vai ficando inclinada e posteriormente paralela à superfície, termina a limpeza descendo a perna pelo clípeo, podendo chegar ao labro.

Caráter 23. Limpeza do olho todo – 3H olho: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: tíbia e basitarso da perna anterior ipsilateral é posicionada acima da metade superior do olho. O fêmur encontra-se paralelo à superfície, enquanto tíbia está perpendicular ou levemente inclinada, a tíbia movimenta-se para baixo e da área para-ocular em direção à gena, num movimento parecido com o de pára-brisas, limpando toda a superfície do olho.

Caráter 24. Limpeza simultânea do olho e antena – 4H: (0) começa pela antena; (1) ambos os modos; (2) olho e antena ao mesmo tempo; (3) ausente; caráter não ordenado.

Descrição: perna anterior de um lado do corpo é posicionada na antena ipsilateral, realizando 1H. Simultaneamente, a perna anterior do outro lado do corpo é posicionada no olho ipsilateral, realizando 3H, geralmente o 3H olho ou 3H olho/clp. Algumas espécies começam a limpeza pela antena, outras começam os dois movimentos ao mesmo tempo, enquanto outras realizam o comportamento dos dois modos, aparentemente sem preferência por começar pelo lado da antena ou para fazer junto.

Caráter 25. Limpeza da antena predominantemente unilateral ou bilateral – 1H predominante: (0) predomínio da limpeza unilateral; (1) limpeza unilateral é de três a cinco vezes mais frequente que a limpeza bilateral; (2) predomínio da limpeza bilateral; caráter ordenado.

Descrição: notou-se claramente, nas diferentes espécies, uma preferência pela limpeza das antenas unilateralmente ou bilateralmente. Existem espécies nas quais ocorre predominantemente limpeza unilateral, espécies nas quais a limpeza unilateral é de três a cinco vezes mais frequente que a limpeza bilateral e espécies nas quais ocorre predominantemente limpeza bilateral.

2.3.1.6 Sequências comportamentais

Caráter 26. A dorsal/lateral: (0) sequência comportamental presente; (1) ausente.

Descrição: nesta sequência, ocorrem várias limpezas do abdome. A primeira é tipicamente uma limpeza dorsal (AD), geralmente sem incluir a asa. As limpezas subsequentes são intermediárias, tornam-se gradualmente laterais, sendo a última, tipicamente lateral (AFT ou ATB).

Caráter 27. 1W/4W/3W: (0) sequência comportamental fundida; (1) sequência comportamental bem delimitada.

Descrição: imediatamente após executar sequências 1W, a abelha gira as asas 180°, de modo que fiquem perpendiculares à superfície e com a veia costal orientada para cima, e as limpa (4W ou 3W). Cada um destes comportamentos pode apresentar-se de forma bem delimitada, onde se observa o início e o fim de cada um deles antes do início do próximo ou pode apresentar-se de modo fundido, onde se observa mudança na posição das asas, mas as pernas movem-se como se estivessem executando um único tipo de limpeza.

Caráter 28. 1W isolado: (0) ausência de 1W executado de forma isolada; (1) 1W executado de forma isolada, sem limpeza ventral da asa associada posteriormente.

Descrição: a limpeza dorsal da asa posterior geralmente está associada a sua limpeza ventral. De modo que algumas espécies só apresentaram o 1W seguido de limpeza ventral (3W e 4W) e outras o apresentaram de forma isolada.

Caráter 29. 3W isolado: (0) ausência de 3W isolado; (1) 3W executado de forma isolada, sem 1W associado anteriormente.

Caráter 30. 4W isolado: (0) 4W executado de forma isolada, sem 1W associado anteriormente; (1) ausência de 4W isolado.

Caráter 31. 2W combinado: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após executar sequências 2W, gira as asas 180° de modo que a veia costal fique orientada para cima e limpa a superfície ventral da asa, por meio de 3W ou 4W.

Caráter 32. 2W/2W: ausente = 0; presente = 1.

Descrição: imediatamente após executar sequências 2W de um lado do corpo, começa a mesma sequência do lado oposto.

Caráter 33. 3W/3W: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após executar sequências 3W de um lado do corpo, começa a mesma sequência do lado oposto.

Caráter 34. 1H sozinho: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: a limpeza da antena, geralmente está associada a outras limpezas de cabeça e da perna anterior. Quando a limpeza da antena ocorre independente de outra limpeza, dizemos que ocorreu 1H sozinho e, portanto, o comportamento sem sequência está presente.

Caráter 35. 1H/5L: (0) presente; (1) ausente.

Descrição: imediatamente após limpar a antena (1H), limpa a perna anterior ipsilateral (5L).

Caráter 36. 5L/1H: (0) presente; (1) ausente.

Descrição: imediatamente após executar a limpeza da perna anterior (5L), limpa a antena ipsilateral (1H).

Caráter 37. 1H/3H: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpar a antena (1H), limpa o olho ipsilateral (3H), podendo ser ele todo, só sua metade inferior, incluindo ou não clípeo e mandíbula.

Caráter 38. 1H/1H: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpar a antena de um lado do corpo (1H), limpa-a também do lado oposto.

Caráter 39. 1H/4H: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpar a antena (1H), limpa novamente a mesma antena e o olho contralateral simultaneamente (4H).

Caráter 40. 1H/3Hb: (0) presente; (1) ausente.

Descrição: imediatamente após limpar a antena (1H), limpa os dois olhos simultaneamente (3Hb).

Caráter 41. 1H/1Hb: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpar a antena unilateralmente (1H), limpa-as bilateralmente (1Hb).

Caráter 42. 3H/1H: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após qualquer tipo de limpeza de olho (3H), incluindo ou não clípeo e mandíbula, limpa a antena ipsilateral (1H).

Caráter 43. 3H/1Hb: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após qualquer tipo de limpeza de olho (3H), incluindo ou não clípeo e mandíbula, limpa ambas as antenas (1Hb).

Caráter 44. 3H/5L: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após qualquer tipo de limpeza de olho (3H), incluindo ou não clípeo e mandíbula, limpa a perna anterior ipsilateral (5L).

Caráter 45. 3H/3Hb: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após qualquer tipo de limpeza de olho (3H), incluindo ou não clípeo e mandíbula, limpa os dois olhos simultaneamente (3Hb).

Caráter 46. 3Hb/1H: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpar os dois olhos simultaneamente (3Hb), limpa uma antena (1H).

Caráter 47. 3Hb/1Hb: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpar os dois olhos simultaneamente (3Hb), limpa ambas as antenas (1Hb).

Caráter 48. 1Hb sozinho: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: a limpeza simultânea de ambas as antenas, geralmente está associada a outras limpezas de cabeça e da perna anterior. Quando a limpeza das antenas ocorre independente de outra limpeza, dizemos que ocorreu 1Hb isoladamente e, portanto, o comportamento sem sequência está presente.

Caráter 49. 1Hb/3Hb: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpar as duas antenas simultaneamente (1Hb), limpa ambos os olhos (3Hb).

Caráter 50. 1Hb/3H: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpar as duas antenas simultaneamente (1Hb), executa qualquer tipo de limpeza de olho (3H) em um dos olhos.

Caráter 51. 1Hb/5L: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpar as duas antenas simultaneamente (1Hb), limpa uma das pernas anteriores (5L).

Caráter 52. 5L/1Hb: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpar um das pernas anteriores (5L), limpa as duas antenas simultaneamente (1Hb).

Caráter 53. 1Hb/1H: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpar as duas antenas simultaneamente (1Hb), limpa uma das antenas novamente (1H).

Caráter 54. 1Hb/4H: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpar as duas antenas simultaneamente (1Hb), limpa uma das antenas novamente ao mesmo tempo que limpa o olho contralateral a esta antena (4H).

Caráter 55. 1Hb/4L: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpar as duas antenas simultaneamente (1Hb), limpa a perna média e as pernas posteriores (4L).

Caráter 56. 4L/1Hb: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpar as pernas posteriores e uma das pernas média uma na outra (4L), limpa as duas antenas simultaneamente (1Hb).

Caráter 57. 4H/3Hb: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza simultânea da antena e do olho contralateral (4H), limpa os dois olhos simultaneamente (3Hb).

Caráter 58. 4H/3H contralateral: (0) ausente; (1) presente e limpa olho uma única vez; presente e limpa olho duas vezes = 2; caráter não ordenado.

Descrição: imediatamente após a limpeza simultânea da antena e do olho contralateral (4H), executa um dos tipos de limpeza no olho (3H) contralateral à antena.

Caráter 59. 4H/3H: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza simultânea da antena e do olho contralateral (4H), executa um dos tipos de limpeza no olho (3H) ipsilateral à antena.

Caráter 60. 4H/5L contralateral: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza simultânea da antena e do olho contralateral (4H), limpa a perna anterior (5L) contralateral à antena.

Caráter 61. 4H/5L: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza simultânea da antena e do olho contralateral (4H), limpa a perna anterior (5L) ipsilateral à antena.

Caráter 62. 4H/1H contralateral: (0) presente; (1) ausente.

Descrição: imediatamente após a limpeza simultânea da antena e do olho contralateral (4H), limpa novamente a antena (1H).

Caráter 63. 4H/1Hb: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza simultânea da antena e do olho contralateral (4H), limpa ambas as antenas simultaneamente (1Hb).

Caráter 64. 3L/1L: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza da tíbia posterior (3L), limpa o basitarso das pernas posteriores (1L).

Caráter 65. 3L/4L: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza da tíbia posterior (3L), limpa as pernas posteriores e a perna média (4L) ipsilateral.

Caráter 66. 3L/4L contralateral: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza da tíbia posterior (3L), limpa as pernas posteriores e a perna média (4L) contralateral.

Caráter 67. 4L/3L: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza das pernas posteriores e da perna média (4L), limpa a tíbia (3L) ipsilateral à perna média usada no 4L.

Caráter 68. 4L/3L contralateral: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza das pernas posteriores e da perna média (4L), limpa a tíbia (3L) contralateral à perna média usada no 4L.

Caráter 69. 3L/1A: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza da tíbia posterior (3L), limpa o abdome lateralmente (AFT ou ATB) do mesmo lado onde a tíbia foi limpa.

Caráter 70. 3L/1Ab: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza da tíbia posterior (3L), limpa o abdome látero-ventralmente dos dois lados ao mesmo tempo (1Ab).

Caráter 71. 5L/4L: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza da perna anterior (5L), limpa as pernas posteriores e a perna média (4L), usando a perna média ipsilateral ao comportamento anterior.

Caráter 72. 4L/1L: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza das pernas posteriores e média (4L), limpa o basitarso das pernas posteriores (1L).

Caráter 73. 4L/4L contralateral: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza das pernas posteriores e média (4L) de um lado do corpo, executa-a do lado oposto.

Caráter 74. 4L/1A: (0) presente; (1) ausente.

Descrição: imediatamente após a limpeza das pernas posteriores e média (4L), limpa o abdome lateralmente (AFT ou ATB) do lado ipsilateral à perna média.

Caráter 75. 4L/1Ab: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza das pernas posteriores e média (4L), limpa o abdome látero-ventralmente dos dois lados ao mesmo tempo (1Ab).

Caráter 76. 1L/1A: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpar o basitarso das pernas posteriores, esfregando-os um no outro (1L), limpa o abdome lateralmente (AFT ou ATB).

Caráter 77. 1L/1Ab: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpar o basitarso das pernas posteriores, esfregando-os um no outro (1L), limpa o abdome látero-ventralmente dos dois lados ao mesmo tempo (1Ab).

Caráter 78. asa/3L: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após executar limpeza de asa de qualquer tipo (1W, 2W, 3W ou 4W), executa a limpeza da tíbia posterior (3L) que estava envolvida na limpeza da asa.

Caráter 79. 5L sozinho: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: a limpeza da perna anterior (5L) geralmente está associada a outras limpezas de cabeça ou de tórax. Quando essa limpeza ocorre independente de outras, dizemos que ela ocorreu sozinha e, portanto, o comportamento sem sequência está presente.

Caráter 80. 5L/1T: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpeza da perna anterior (5L), a perna média ipsilateral limpa o tórax ventralmente (1T).

Caráter 81. 1Hb/1A: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpeza de ambas as antenas (1Hb), ocorre a limpeza lateral do abdome (AFT ou ATB).

Caráter 82. 1A/2W: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza lateral do abdome (AFT ou ATB), ocorre limpeza da superfície dorsal da asa anterior (2W) ipsilateral ao abdome que foi limpo.

Caráter 83. 2W/1A: (0) presente; (1) ausente.

Descrição: imediatamente após limpeza da superfície dorsal da asa anterior (2W), ocorre limpeza lateral do abdome (AFT ou ATB) ipsilateral à asa que foi limpa.

Caráter 84. 1A/3W: (0) presente; (1) ausente.

Descrição: imediatamente após a limpeza lateral do abdome (AFT ou ATB), ocorre limpeza da superfície ventral da asa anterior (3W).

Caráter 85. 3 ou 4W/1A: (0) presente; (1) ausente.

Descrição: imediatamente após limpeza da superfície ventral de qualquer uma das asas (3W ou 4W), ocorre limpeza lateral do abdome (AFT ou ATB) do lado ipsilateral à asa que foi limpa.

Caráter 86. 2W/1A contralateral: (0) presente; (1) ausente.

Descrição: imediatamente após limpeza da superfície dorsal da asa anterior (2W), ocorre limpeza lateral do abdome (AFT ou ATB) do lado contralateral à asa que foi limpa.

Caráter 87. 2W/1Ab: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpeza da superfície dorsal da asa anterior (2W), ocorre limpeza látero-ventral do abdome dos dois lados ao mesmo tempo (1Ab).

Caráter 88. 3 ou 4W/1A: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpeza da superfície ventral de qualquer uma das asas (3W ou 4W), ocorre limpeza lateral do abdome (AFT ou ATB) do lado ipsilateral à asa que foi limpa.

Caráter 89. 5L/1A: (0) presente; (1) ausente.

Descrição: imediatamente após limpeza da perna anterior (5L), ocorre limpeza lateral do abdome (AFT ou ATB) do lado ipsilateral à perna que foi limpa.

Caráter 90. 5L/1A contralateral: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpeza da perna anterior (5L), ocorre limpeza lateral do abdome (AFT ou ATB) do lado contralateral à perna que foi limpa.

Caráter 91. 1A/4L: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza lateral do abdome (AFT ou ATB), limpa as pernas posteriores e média (4L), usando a perna média ipsilateral ao lado do abdome que foi limpo.

Caráter 92. 1A/4L contralateral: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza lateral do abdome (AFT ou ATB), limpa as pernas posteriores e média (4L), usando a perna média contralateral ao lado do abdome que foi limpo.

Caráter 93. 1A/3L: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza lateral do abdome (AFT ou ATB), limpa a tíbia posterior (3L) que estava envolvida na limpeza do abdome.

Caráter 94. 1A/1L: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após a limpeza lateral do abdome (AFT ou ATB), limpa o basitarso das pernas posteriores (1L).

Caráter 95. 1Ab/1L: (0) ausente; (1) presente.

Descrição: imediatamente após limpeza látero-ventral do abdome dos dois lados ao mesmo tempo (1Ab), limpa o basitarso das pernas posteriores (1L).

2.3.2 Filogenias

2.3.2.1 Análise comportamental

Primeiramente realizamos a análise filogenética utilizando somente os 25 caracteres que indicavam ausência e presença de comportamentos. Desses caracteres, 11 mostraram-se não informativos. Encontramos duas árvores mais parcimoniosas com 38 passos, CI = 68 e RI = 75. O consenso estrito (figura 2.2A) mostra que ambas as espécies de Euglossina divergiram antes das outras, mas a relação entre elas não é definida. Recuperou-se a monofilia de Bombina com 79% de suporte, mas não a de Meliponina, uma vez que *Apis*

esteve inserida entre os demais meliponíneos. O clado formado por Bombina, Apina e Meliponina teve 81% de suporte e o formado por Meliponina e Apina teve 78%.

Com o acréscimo das sequências comportamentais foi encontrada somente uma árvore mais parcimoniosa (figura 2.2B) com 186 passos, CI = 47 e RI = 47. Nessa árvore, o posicionamento dos euglossíneos foi resolvido e Meliponina mostrou-se um grupo monofilético, sendo grupo irmão de Apina. Portanto, a monofilia de três das quatro subtribos foi recuperada, embora os valores de bootstrap não tenham sido elevados. Não se pôde verificar a monofilia de Apina, uma vez que contamos com apenas um representante dessa subtribo, devido à presença de somente essa espécie nas Américas. De um modo geral, os suportes foram baixos, com exceção do clado formado por Apina e Meliponina que foi 70%.

Posteriormente seguiu-se a análise com pesagem implícita e também foi encontrada uma única árvore mais parcimoniosa (figura 2.2C) com 187 passos, CI = 47, RI = 47. Essa árvore foi congruente com a árvore sem pesagem na maioria dos clados, tendo diferido somente nas relações filogenéticas dentro de Meliponina. Assim como na análise anterior, os suportes foram baixos, com exceção do clado Apina + Meliponina (66%). As duas espécies de *Frieseomelitta* agruparam-se, formando um clado irmão dos outros meliponíneos. Dentre os meliponíneos restantes, *Plebeia* foi a primeira a divergir, tendo sido seguida por *Nannotrigona*, permanecendo *Celetrigona* e *Melipona* como grupos irmãos.

2.3.2.2 Análise combinada: dados comportamentais e moleculares

A análise dos dados comportamentais em conjunto com os moleculares apresentou duas árvores igualmente parcimoniosas com 1768 passos, CI = 67 e RI = 60. No consenso estrito (figura 2.3A) as monofilias de Bombina, Euglossina e Meliponina foram recuperadas com 100% de suporte. Apina e Euglossina formaram um clado suportado por 83% das pseudoreplicações, enquanto Bombina e Meliponina também foram tidas como mais proximamente relacionadas com suporte de 88%. O relacionamento filogenético encontrado com o uso desses dados foi exatamente igual, pelo menos no que diz respeito às subtribos, ao encontrado na análise combinada desses quatro genes, apresentada no capítulo 1 (figura 1.5A), quando não se incluiu os caracteres comportamentais.

A análise com todos os genes do capítulo anterior contou com 22 táxons enquanto a análise incluindo os caracteres comportamentais contou com apenas 12. Por esse motivo, foi realizada outra análise utilizando somente os caracteres moleculares para esses 12 táxons, sem levar em conta os dados comportamentais, para conferir que a topologia encontrada ainda seria a mesma de quando se utilizou mais táxons. Foram encontradas duas árvores mais parcimoniosas com 1566 passos, CI = 71 e RI = 63. O consenso estrito (figura 2.3B) foi amplamente resolvido, apresentando exatamente a mesma topologia de quando se utilizou os 22 táxons. Apina e Euglossina formaram um clado suportado por 93%, enquanto Bombina e Meliponina também foram tidas como mais proximamente relacionadas com suporte de 96%. O suporte da monofilia das subtribos foi de 100%.

Como observado até o momento, a adição dos dados comportamentais aos dados moleculares, não causou nenhuma alteração no relacionamento filogenético das subtribos. No entanto, desejou-se explorar a influência desses dados nos fragmentos gênicos um a um.

O gene **EF-1α** analisado para os 12 táxons retornou quatro árvores igualmente parcimoniosas com 426 passos, CI = 73 e RI = 72, essas árvores são tão diferentes que o consenso estrito (figura 2.4A) foi pobremente resolvido, houve uma grande politomia basal ligando Bombina, Meliponina e o clado formado por Apina + Euglossina, esse clado teve suporte de 54%, enquanto a monofilia das subtribos foi suportada por 100%. Por outro lado, após a inserção dos dados comportamentais, obtiveram-se duas árvores mais parcimoniosas com 621 passos, CI = 64 e RI = 62. Observa-se no consenso estrito (figura 2.4A) que aquela grande politomia foi desmanchada com Bombina sendo posicionada como o primeiro clado a divergir e que o clado formado por Apina + Euglossina foi desmanchado. As três subtribos continuaram a ser recuperadas com 100% de suporte.

A análise para os 12 táxons do fragmento **28S** resultou em uma única árvore mais parcimoniosa (figura 2.4B) com 179 passos, CI = 76 e RI = 80. A monofilia de cada subtribo foi recuperada, tendo sido superior a 73%. Com suporte de 86%, Apina apareceu como grupo irmão de Euglossina, que por sua vez foram grupo irmão de Meliponina com 56% de suporte, tendo Bombina sido a primeira das subtribos a divergir. A inserção dos dados comportamentais influenciou grandemente a análise, obteve-se novamente uma única árvore mais parcimoniosa (figura 2.4B) com 448 passos, CI = 66 e RI = 61 e a topologia dessa árvore foi a mesma encontrada para a análise comportamental no que se refere aos grandes grupos, Euglossina e não Bombina foi o primeiro grupo a divergir e Apina foi colocado como

grupo irmão de Meliponina. As principais diferenças ocorreram dentro do clado Meliponina, *Melipona* seria o primeiro meliponíneo a divergir, sendo seguido por *Celetrigona*, as *Frieseomelitta* apareceram como grupos irmãos, o mesmo tendo ocorrido com *Nannotrigona* e *Plebeia*, estes quatro últimos clados estiveram mais proximamente relacionados entre si. Os suportes de cada subtribo foram superiores a 95%.

Foi encontrada uma única árvore mais parcimoniosa (figura 2.4C) com 441 passos, CI = 68 e RI = 58 para o gene **16S** quando se analisaram somente os 12 táxons. Essa árvore não recuperou a monofilia de Euglossina, uma vez que posicionou *Eulaema nigrita* como mais proximamente relacionada à *Apis mellifera* e não à *Euglossa chordata.* A monofilia das outras duas subtribos foi recuperada com pelo menos 98% de suporte. Esse clado formado por Apina e Euglossina teria sido o primeiro a divergir e Bombina apareceu como grupo irmão de Meliponina com suporte de 84%. Quando se inseriu os dados comportamentais obtiveram-se três árvores mais parcimoniosas com 640 passos, CI = 61 e RI = 51. Os dois conjuntos de dados eram muito incongruentes entre si, de modo que a análise com ambos resultou em um consenso estrito pobremente resolvido (figura 2.4C), os únicos agrupamentos formados foram o clado Bombina com 98% de suporte e o clado Meliponina com 100% de suporte.

Encontrou-se uma única árvore mais parcimoniosa (figura 2.4D) com 438 passos, CI = 65 e RI = 50 para o fragmento do **citb** quando este foi analisado para os 12 táxons sem os dados comportamentais. A topologia encontrada foi a mesma para a análise com 17 táxons, Apina agrupou-se com Euglossina enquanto Bombina agrupou-se com Meliponina com suportes de 40 e 81% respectivamente. Os clados foram recuperados com suportes superiores a 91%. A análise dos dados comportamentais conjuntamente com o gene citb também resultou em uma única árvore mais parcimoniosa (figura 2.4D) com 583 passos, CI = 64 e RI = 48. As três subtribos foram recuperadas com mais de 96% de suporte. Bombina continuou como grupo irmão de Meliponina com 65% de suporte. Porém Apina deixou de ser grupo irmão de Euglossina e passou a ser grupo irmão do clado Meliponina e Bombina com 35% de suporte.

2.4 DISCUSSÃO

2.4.1 Filogenia comportamental

2.4.1.1 Caracteres utilizados

Utilizou-se toda a gama de comportamentos de auto-limpeza para a montagem da matriz comportamental. Identificamos comportamentos de limpeza de todas as partes corpóreas: cabeça, mesossoma, metassoma, asas, pernas e antenas. Além disso, observou-se que algumas sequências de limpeza ocorriam preferencialmente após outras e, assim, também utilizamos a presença ou a ausência dessas sequências como caracteres extras.

É interessante observar que somente a presença ou a ausência das entidades comportamentais (25 caracteres), sem levar em conta sua sequência já foi capaz de apresentar uma árvore com resolução razoável (figura 2.2A) e, de certa forma, concordante com as topologias propostas na literatura utilizando-se dados morfológicos (MICHENER, 1944; PRENTICE, 1991; ROIG-ALSINA & MICHENER, 1993), comportamentais (NOLL, 2002) e morfológicos e moleculares (CHAVARRÍA & CARPENTER, 1994). Euglossina foi apontada como a primeira subtribo a divergir e Bombina esteve mais proximamente relacionada com o clado Apina + Meliponina. A adição das sequências comportamentais melhorou a análise no sentido em que resolveu a politomia de Euglossina com o restante da tribo e promoveu a monofilia de Meliponina, retirando *Apis mellifera* do seu interior e deixando-a como mais proximamente relacionada a essa subtribo (figura 2.2B). A pesagem implícita modificou somente os relacionamentos internos à Meliponina, uma vez que agrupou as duas *Frieseomelitta* e posicionou *Melipona* mais proximamente a *Celetrigona.* Estas duas últimas espécies são de fato 'aparentemente' mais próximas, visto que são os primeiros meliponíneos a divergir dentre os que utilizamos (RASMUSSEN & CAMERON, 2009). No entanto, isto ocorre por compartilharem características plesiomórficas. Ao contrário dessa análise que as colocou como espécies mais derivadas.

Vários dos caracteres comportamentais foram incongruentes entre si e, por isso, houve várias homoplasias, o que levou a baixos índices de consistência e retenção. Entretanto, alguns destes caracteres talvez não sejam de fato homoplásticos, posto que não

foi possível identificar sua presença ou mesmo o estado correto em que se apresentam em alguns táxons. Por exemplo, os caracteres 8 e 31 (3W e 2W combinado, respectivamente). No caráter 8, Xylocopini sempre que executa esta limpeza está com as asas posicionadas uma acima da outra (adjacentes); Euglossina, Bombina e três meliponíneos executam esta limpeza somente com as asas sobrepostas, enquanto *Apis* e mais três meliponíneos têm a capacidade de executar o movimento das duas formas. É possível que todos os meliponíneos tenham a capacidade de executar o movimento das duas formas, embora tenha sido observado o comportamento somente de um modo para três espécies. Já o caráter 31, não observado no grupo externo nem em *Frieseomelitta varia*, gera dúvidas sobre se ele realmente não ocorre ou simplesmente não foi registrado. Situação parecida ocorreu com vários outros caracteres, uma vez que não há como garantir, por mais que se amplie o tempo de observação, que determinado comportamento ou sequência comportamental não foi observado porque ele realmente não ocorre naquela espécie ou porque simplesmente não foi registrado mesmo ocorrendo na espécie.

Vinte e sete caracteres não foram informativos. Os caracteres 1 (1L) e 62 (4H/1H) não são informativos visto que surgiram uma única vez no ancestral comum a todo o grupo interno e permaneceram presentes e inalterados em todos os táxons. Os caracteres 11 (1T), 35 (1H/5L), 65 (3L/4L) e 80 (5L/1T) são autapomorfias enquanto os outros vinte e um caracteres apresentaram o mesmo estado em todos os táxons, inclusive no grupo externo (figuras 2.5 e 2.6).

2.4.1.2 O clado das abelhas corbiculadas (Euglossina + Bombina + Apina + Meliponina)

Além das sinapomorfias 1 e 62 que surgiram e se mantiveram sem alterações em todos as espécies do grupo interno, há mais 11 sinapomorfias para esse clado. Os caracteres 3 e 16 surgiram no ancestral comum a todo o grupo e sofreram alterações na forma como são exibidos, tendo sido considerados caracteres multi-estado. O caráter 16 não foi sinapomórfico na pesagem implícita. Os outros nove caracteres (14, 30, 31, 32, 46, 73, 74, 82 e 92) compartilharam a presença do mesmo estado de caráter no grupo interno, sendo que houve reversão para o estado exibido pelo grupo externo em alguns táxons (figuras 2.5 e 2.6).

Com relação ao caráter 3 (4L) todo o grupo interno apresenta a limpeza das pernas posteriores e média, variando apenas na forma como o executa. Nos grupos mais basais, Euglossina e Bombina, a limpeza da perna média pode ocorrer a qualquer momento, embora a limpeza da perna posterior só ocorra vinculada à limpeza da perna média; *Apis* nunca limpa a perna média sem antes ter limpado a perna posterior; enquanto os meliponíneos limpam qualquer perna de forma independente. É possível aventar que num primeiro momento as abelhas ajustaram-se a limpar a perna média, limpando a posterior antes, até mesmo por uma questão da movimentação. É mais simples, juntar a perna média pelo lado de fora das pernas posteriores e ao reposicionar as pernas para deixar a perna média no meio, acabar aproveitando o movimento para limpar a perna posterior ipsilateral. Num segundo momento, as abelhas ajustaram a perna média diretamente no meio das pernas posteriores através de uma das duas estratégias explicadas na descrição deste comportamento. Parece que no clado Meliponina a evolução ocorreu no sentido de otimizar esta separação, possibilitando a execução de ambos os movimentos independentemente um do outro e em Apina ocorreu no sentido oposto, praticamente fundindo-os. De fato, parece que Apina está executando um único movimento composto por estas duas partes. No entanto, por não ter observado o referido comportamento no grupo externo, preferimos tratar esse caráter como não aditivo.

O caráter 16 (AFT) versa sobre a limpeza do abdome, ela está ausente no grupo externo e ocorre de duas maneiras no grupo interno. Nas espécies mais basais, ele só ocorre vinculado à limpeza de asas (estado 1). Ou seja, após limpar as asas, a abelha limpa o abdome do mesmo lado no qual limpou a asa. Por outro lado, nas espécies mais derivadas dentro de Meliponina, a limpeza do abdome ocorre tanto após a limpeza das asas quanto após a limpeza das pernas (estado 2). A pesagem implícita considerou que a mudança para o estado 2 ocorreu no ancestral comum a Apina e Meliponina tendo este caráter revertido ao estado 1 em um meliponíneo e por isso, teria deixado de ser sinapomorfia.

Além dessas sinapomorfias, a pesagem implícita considerou mais duas, os caracteres 94 (1A/1L) e 95 (1Ab/1L) (figura 2.6). Por conta da nova topologia, essas sequências comportamentais teriam surgido uma única vez no ancestral comum e teriam sido posteriormente perdidas em alguns ramos. Na topologia sem pesagem, essas sequências teriam surgido mais de uma vez.

Os caracteres 6, 8 e 19 não foram considerados sinapomorfias do grupo interno (figura 2.5), uma vez que são caracteres multi-estado e o estado que surgiu no ancestral comum das abelhas corbiculadas surgiu novamente dentro do grupo. No entanto, se considerarmos apenas o surgimento do caráter sem levar em conta suas variações, eles também poderiam ser considerados sinapomorfias, fato que ocorreu na pesagem implícita para os dois primeiros caracteres citados (figura 2.6). Vejamos em detalhes cada um desses caracteres.

Quanto ao caráter 6 (1W), todo o grupo interno limpa a asa posterior dorsalmente, exibindo variações na forma como o faz. Todos eles vão abrindo a asa anterior gradualmente durante a limpeza. No entanto, Euglossina, Apina e alguns Meliponina não chegam a desencostar a asa anterior do abdome, já Bombina e outros Meliponina além de desencostá-la chegam a virá-la, deixando-a perpendicular à superfície. A asa anterior sempre fica praticamente fechada nos primeiros movimentos, mesmo dentre os indivíduos que a desencostam e viram-na no fim, sugerindo que a capacidade de abri-la totalmente surgiu como uma evolução do primeiro estado. Por conta desta capacidade ter aparecido em grupos tão diversos quanto alguns meliponíneos e em Bombina, parece que de fato, a capacidade para abrir totalmente a asa surgiu de forma independente. No entanto, o surgimento da limpeza da asa posterior dorsalmente deu-se num evento único, podendo ser considerado sinapomórfico (figura 2.5).

Já o caráter 19 (1Hb) apresenta-se sob o estado 1, com movimentos simultâneos em Euglossina e cinco Meliponina e sob o estado 2, com movimentos começando pela antena nas espécies restantes (figura 2.5). Dessa forma, o estado 1 teria surgido no ancestral de todas as corbiculadas, teria aparecido o estado 2 e depois novamente o estado 1 no ancestral de Meliponina.

Com caráter 8 (3W) foi a mesma situação. A capacidade para executar a limpeza com asas sobrepostas surgiu no ancestral comum a todo o grupo, tendo variado os indivíduos onde a limpeza com as asas dispostas adjacentemente continuou ocorrendo (figura 2.5). Euglossina, Bombina e três meliponíneos perderam a capacidade para executar a limpeza com as asas adjacentes, enquanto *Apis* e outros três meliponíneos executam a limpeza das duas formas possíveis. Portanto é como se o a perda da capacidade de limpar as asas adjacentes tivesse ocorrido mais de uma vez, mas a capacidade para executar esse

movimento com as asas sobrepostas surgiu uma única vez, no ancestral comum ao grupo interno.

2.4.1.3 Monofilia das subtribos

Os caracteres 24, 27 e 90 suportam o clado **Euglossina** (figuras 2.5 e 2.6). O caráter 24 (4H) tem o estado 2 encontrado somente nestas duas espécies, só elas executam a limpeza de olho e antena unicamente de modo simultâneo, enquanto os outros táxons podem começar o movimento pela antena. O caráter 27 (1W/4W/3W) diz respeito a uma sequência de limpeza de asa que ocorre de forma peculiar dentro desse clado, a transição entre essas limpezas acontece de forma bem delimitada, percebe-se o início e o término de cada uma; já nos outros táxons, a transição não é bem marcada. Por fim, o caráter 90 (5L/1A contralateral), referente a uma sequência de limpeza de pernas e abdome está presente em todos os indivíduos exceto nesse clado.

O caráter 10 (5W) dá suporte ao clado **Bombina** (figuras 2.5 e 2.6). Esse comportamento foi encontrado em todos os táxons com exceção das duas *Bombus,* parecendo que houve uma reversão somente nesta subtribo.

Além do caráter 3, mais três caracteres (25, 47 e 52) são sinapomorfias para **Meliponina** (figuras 2.5 e 2.6). Como já mencionado, o estado 2 do caráter 3, que diz respeito ao comportamento 4L, ocorre de forma independente somente nos indivíduos desse clado. Os caracteres 47 (3Hb/1Hb) e 52 (5L/1Hb) são sequências comportamentais que ocorrem em todos os meliponíneos analisados e somente neles. O primeiro diz respeito à limpeza bilateral dos olhos, seguida pela limpeza bilateral das antenas e o segundo, à limpeza da perna anterior, seguida pela limpeza bilateral das antenas. A análise do caráter 25 (1H predominante) é bastante interessante, ele identifica o modo como o indivíduo limpa as antenas. Xylocopini e Euglossina, quase não usam limpeza bilateral de antena, optando por limpar suas antenas uma a uma; no ancestral comum de Bombina, Apina e Meliponina a limpeza bilateral começa a ficar mais frequente, passando a ser predominante dentro de Meliponina. Dessa forma, esse caráter foi considerado ordenado e seu estado 1 surgiu no ancestral comum a Bombina, Apina e Meliponina, tendo evoluído para o estado 2 no ancestral comum aos meliponíneos. Assim, cada um dos seus estados funciona como

sinapomorfia para um desses clados, o estado 1 para Bombina, Apina + Meliponina e o estado 2 para Meliponina.

2.4.1.4 O clado Bombina + Apina + Meliponina

Os caracteres 4, 25, 50, 51 e 57 suportam o clado formado por Bombina, Apina + Meliponina (figuras 2.5 e 2.6), sendo que o caráter 51 (1Hb/5L) sofreu reversão em uma *Bombus* e o 57 (4H/3Hb) em dois meliponíneos. O caráter 50 (1Hb/3H) surgiu no ancestral comum ao grupo e manteve-se presente em todos os táxons. Os três caracteres são sequências comportamentais de limpeza de cabeça observadas somente nos integrantes desse clado.

Como mencionado no tópico anterior, o estado 1 do caráter 25 também é uma sinapomorfia para esse clado. Igualmente interessante é a análise evolutiva do caráter 4 (5L), visto que nos táxons mais basais, há dois tipos de movimento compondo o comportamento, a abelha limpa tanto a parte externa da perna anterior quanto a interna, mas a parte interna sempre é limpa antes da parte externa em Xylocopini e Euglossina. Bombina, por sua vez, também executa os dois movimentos, mas a parte interna só é limpa após a parte externa, já em Meliponina e Apina a limpeza da parte interna foi totalmente suprimida, sendo este um dos caracteres que sustentam o relacionamento Apina + Meliponina. Foi como se durante a evolução do caráter fosse priorizada a limpeza externa, uma vez que basalmente a limpeza da porção interna ocorre totalmente vinculada à externa. Já em *Bombus* ocorrem sequências de limpeza, onde também aparece a limpeza interna, porém ocorrendo intercalada ou no final da externa e, finalmente em Meliponina e Apina a limpeza interna não ocorre. Portanto, ele também foi tratado como ordenado e seu estado 1 teria surgido no ancestral comum a essas três subtribos, tendo evoluído para o estado 2 no ancestral comum de Apina + Meliponina, funcionando como sinapomorfia para esse clado também (figuras 2.5 e 2.6).

2.4.1.5 O clado Apina + Meliponina

Além do caráter 4, outros oito caracteres (8, 15, 24, 66, 67, 70, 91 e 93) são sinapomórficos para o clado formado por Apina e Meliponina (figuras 2.5 e 2.6). O caráter 8

(3W), em seu estado 1 (limpeza ventral da asa posterior adjacente ou sobreposta) surgiu no ancestral comum de Apina e Meliponina, tendo sido alterado para o estado 2 em três meliponíneos, uma vez que eles perderam a capacidade de limpá-las de forma adjacente. O caráter 15 (AD) diz respeito à limpeza dorsal do abdome, nos táxons mais basais essa limpeza era realizada somente no abdome, em *Apis* e nos meliponíneos ela ocorre também por cima da asa quando esta se encontra em posição de repouso. O estado 1 do caráter 24 (4H) também é uma sinapomorfia para este grupo, estando presente em todos os indivíduos com exceção de *Plebeia,* que não apresentou o comportamento em nenhum dos seus dois modos. Bombina executa essa limpeza da mesma forma que o grupo externo, começa pela antena. Euglossina limpa antena e olho começando o movimento dos dois lados do corpo ao mesmo tempo. Enquanto Apina e Meliponina limpa das duas formas. Os caracteres 66, 67, 70, 91 e 93 (3L/4L, 4L/3L, 3L/1Ab, 1A/4L e 1A/3L, respectivamente) apresentam sequências importantes de limpeza de perna, usando somente pernas ou pernas e abdome. Todas elas passaram a existir no ancestral comum a esse grupo, tendo sido posteriormente extinguida em pelo menos uma espécie. Pode ser também que essas sequências existam em todas as espécies, mas não tenham sido observadas em algumas. De qualquer forma, fazendo ou não parte do repertório real de atividades da espécie, são sinapomorfias para o grupo, uma vez que surgiram no ancestral comum a todas, podendo ou não ter sido perdidas posteriormente.

Os caracteres 8 e 66 não foram considerados sinapomorfias na análise de pesagem sucessiva (figura 2.6), uma vez que na topologia apresentada por essa análise teria sido mais parcimonioso o surgimento independente desses caracteres em diferentes espécies. No caráter 8, por exemplo, a aquisição da limpeza da asa de modo adjacente ocorreu novamente em *Apis* e mais três meliponíneos. O oposto do ocorrido na topologia sem pesagem, onde ela havia sido perdida em três meliponíneos. Da mesma forma que o caráter 8, na nova topologia, foi mais parcimonioso atribuir 3 surgimentos independentes para a sequência do caráter 66, enquanto na topologia anterior, acreditou-se em uma única perda. Em contrapartida, a pesagem sucessiva apontou o estado 2 do caráter 16 como sinapomórfico (figura 2.6), uma vez que somente *Frieseomelitta varia* o apresenta em seu estado 1. Assim, de acordo com esta topologia houve um surgimento único do estado 2 com posterior retorno ao estado 1, enquanto na topologia sem pesagem o estado 2 surgiu após a divergência desta espécie.

2.4.1.6 Outros agrupamentos

Na pesagem implícita, duas sinapomorfias uniram as espécies de *Frieseomelitta* num mesmo ramo, 77 (1L/1Ab) e 83 (2W/1A) (figura 2.6). Essas duas sequências comportamentais estão presentes em todo o grupo interno, exceto nessas duas espécies. Outro agrupamento formado nessa análise foi o ramo *Celetrigona* e *Melipona,* tidas como irmãs por serem as únicas espécies a apresentar a sequência do caráter 63 (4H/1Hb) (figura 2.6).

De qualquer forma, a análise foi eficiente em apontar a topologia E,(B,(A,M)), exatamente a mesma encontrada em outro estudo envolvendo comportamento de auto-limpeza (NOLL & PIZARRO, 2009), vários aspectos comportamentais (NOLL, 2002), caracteres morfológicos (MICHENER, 1944; MICHENER, 1990; PRENTICE, 1991; ROIG-ALSINA & MICHENER, 1993) e caracteres morfológicos e moleculares (CHAVARRÍA & CARPENTER, 1994). De acordo com esta hipótese, a eussocialidade avançada teria surgido uma única vez, no ancestral comum de Meliponina e Apina.

2.4.2 Análise combinada: Caracteres comportamentais e moleculares

A topologia encontrada na análise combinada foi a mesma encontrada somente com os dados moleculares e os valores de suporte mantiveram-se parecidos nos clados onde ambas as topologias concordavam. No entanto, nos ramos onde as topologias discordaram houve grande queda no valor de suporte. O ramo que sustenta Apina e Euglossina diminuiu 10%, o que sustenta Bombina e Meliponina caiu 8%. A maior queda foi no ramo que sustenta as *Frieseomelitta*, *Plebeia* e *Nannotrigona*, deixando *Melipona* e *Celetrigona* mais basais, o suporte diminuiu 22% (figura 2.3).

A inclusão dos dados comportamentais na matriz molecular praticamente não interferiu no resultado obtido quando se utilizaram todos os dados moleculares. Por outro lado, quando se analisa fragmento a fragmento, nota-se que os dados comportamentais são muito mais influentes (figuras 2.3 e 2.4). Por exemplo, no gene EF-1α*,* após a inserção dos

dados comportamentais, a grande politomia basal e o clado formado por Apina e Euglossina foram desfeitos, uma vez que não são sustentados nas análises comportamentais (figura 2.4A). Já, a topologia para o fragmento 28S foi um misto dos resultados comportamentais e moleculares. Prevaleceu o relacionamento da análise comportamental nas subtribos: Euglossina e não Bombina foi o primeiro grupo a divergir e Apina foi colocado como grupo irmão de Meliponina (figura 2.4B). Entretanto, dentro de Meliponina prevaleceu o resultado molecular: as *Frieseomelitta* agruparam-se, mas ao contrário da filogenia comportamental, como espécies mais derivadas, além disso, *Celetrigona* e *Melipona* foram para a base do clado Meliponina, relacionamentos mais parecidos com os atualmente aceitos (RASMUSSEN & CAMERON, 2009) (figura 2.4B). O fragmento 16S que estava quase completamente resolvido, tendo agrupado Meliponina com Bombina e Apina com Euglossina (embora Euglossina não tenha permanecido monofilética), ficou quase que completamente politômico com a inserção dos dados comportamentais, mantiveram-se somente as monofilias de Bombina e Meliponina, ramos comuns nas duas análises (figura 2.4C). O citb, por sua vez, manteve o clado Bombina e Meliponina, mas não suportou o clado Apina e Euglossina, tenho trazido Apina para perto do ramo Bombina e Meliponina, posicionando Euglossina como mais basal (figura 2.4D).

Apesar da enorme diferença no número de caracteres, não há motivos para excluir um conjunto de dados. 95 caracteres é pouco mais de um quinto dos dados moleculares para o fragmento citb e pouco mais de um oitavo para o fragmento EF-1α e mesmo assim, notamos sua interferência formando e desmanchando clados que seus dados suportam ou não. É claro que quando se reúne todos os dados moleculares, a diferença numérica (um vinte e oito avos) dilui o efeito discordante dos dados comportamentais, que passam a ser homoplásticos na topologia dos dados moleculares.

2.4.2.1 Otimização dos caracteres comportamentais na análise de evidência total

Sabemos que a topologia apresentada para a análise com dados moleculares e comportamentais não é a mais parcimoniosa para se explicar a evolução dos caracteres comportamentais. A topologia da análise de evidência total apresenta 201 passos para explicar os caracteres comportamentais enquanto a comportamental utiliza 187 passos. No

entanto, gostaríamos de saber como os dados comportamentais se otimizam nessa topologia e para isso elaboramos a figura 2.7. Os caracteres que suportam o grupo interno, assim como os que suportam as subtribos são essencialmente os mesmos, o interesse voltou-se para aqueles caracteres que sustentam os ramos inexistentes na análise comportamental.

Não há sinapomorfia comportamental inequívoca para o clado formado por Apina e Euglossina, os caracteres 38 (1H/1H) e 59 (4H/3H) que estão na base deste clado surgiram diversas vezes ao longo da história evolutiva do grupo, tanto em Apina e Euglossina, quanto em Bombina e também em Meliponina (figura 2.7). Se otimizarmos esses caracteres no modo acctran, ambos deixam de aparecer neste ramo e aparecem no ancestral comum a todas as corbiculadas.

Um único caráter aparece como sinapomorfia inequívoca do ramo formado por Bombina e Meliponina, o caráter 28 (1W isolado) (figura 2.7). De acordo com esta topologia, ele teria surgido no ancestral comum a Bombina e Meliponina, tendo sido perdido posteriormente em três espécies de meliponíneos. Já na topologia da árvore comportamental, o caráter teria surgido duas vezes, uma no ancestral comum aos bombíneos e outra no ancestral comum desses três meliponíneos. O caráter 6 (1W) pode ser considerado como sinapomorfia dependendo da sua otimização (figura 2.7), ele está ausente somente no grupo externo, ocorrendo de duas formas diferentes no grupo interno. Os bombíneos só realizam-no no estado 2 e os meliponíneos variam, algumas espécies realizam o estado 1 e outras, o estado 2. Segundo a otimização deltran, o estado 2 teria surgido no ancestral comum a este clado e teria retornado ao estado 1 em alguns meliponíneos. Já na otimização acctran, o estado 2 teria evoluído a partir do estado 1 duas vezes, uma no ancestral comum a este clado e outra no ancestral comum às *Frieseomelitta*. Como já foi discutido anteriormente, acreditamos que a capacidade para limpar a asa no estado 1 tenha surgido no ancestral comum ao grupo todo e que a abertura da asa tenha aumentado de 45° para 90° mais de uma vez e de forma independente dentro do grupo, posição que não permite ao caráter ser tratado como sinapomorfia.

Os caracteres 57, 60 e 95 podem ou não aparecer na base desse ramo que agrupa Bombina e Meliponina dependendo da otimização (figura 2.7). Pode-se considerar que o comportamento descrito pelo caráter 60 (4H/5L contralateral) tenha surgido na base do grupo e depois tenha sido perdido em uma *Bombus* e um meliponíneo ou que tenha surgido

de formas independentes em uma *Bombus* e no ancestral comum a Meliponina tendo sido perdido em uma espécie. De qualquer forma, por estar presente em um euglossíneo, não é sinapomórfico. Por outro lado, os caracteres 57 (4H/3Hb) e 95 (1Ab/1L) poderiam ter surgido no ancestral comum às corbiculadas, tendo sido perdido em alguns ramos ou ter surgido de formas independentes no ancestral à Bombina + Meliponina e também em Apina no caso do caráter 57 e em Euglossina no caso do caráter 95. Todas as possibilidades são igualmente parcimoniosas. Como os caracteres são sequências comportamentais e cada componente da sequência está presente em todas corbiculadas, nos parece igualmente provável o seu aparecimento ou a sua extinção. No entanto, como sabemos que a sequência pode existir mesmo nos táxons onde não foi presenciado e que ela está presente em organismos tão diferentes taxonomicamente, aventamos que o mais provável seria o seu surgimento no ancestral comum às abelhas corbiculadas.

A interpretação da evolução de alguns caracteres na filogenia molecular deve ser alterada, principalmente em relação aos 25 primeiros que dizem respeito à presença de determinados comportamentos e à forma como ocorrem. O caráter 2 (3L) era explicado por dois surgimentos independentes e uma perda, surgimento em *Eulaema* e no ancestral comum a *Apis* e Meliponina (figuras 2.5 e 2.6) e uma perda em *Plebeia.* Na nova topologia são necessários 4 passos, um surgimento único, no ancestral comum ao grupo interno e 3 perdas posteriores (figura 2.7).

Não há alterações quanto a evolução do caráter 3 (4L) independentemente da topologia adotada, uma vez que o estado 1 surge no ancestral comum às corbiculadas e segue caminhos opostos no ramo que leva à Apina e no ramo que leva à Meliponina (figuras 2.5, 2.6 e 2.7). A evolução do caráter 6 (1W) também ocorre de forma igual em ambas as topologias, o estado 2 surge mais de uma vez a partir do 1 e o estado 1 regressa a partir do 2. Mesma situação ocorre para o caráter 8 (3W), o comportamento surge no ancestral comum ao grupo externo e altera a forma de exibição várias vezes dentro do grupo.

Por outro lado, a evolução do caráter 4 (5L) é mais difícil de ser explicada na nova topologia. O estado 1 teria surgido no ancestral comum de Bombina e o estado 2 teria surgido de formas independentes diretamente do estado 0, no ancestral comum a *Apis* e Meliponina (Figura 2.7). Ou seja, todos teriam perdido a capacidade de executar a limpeza interna, a perda foi parcial em Bombina e total nas outras duas, todas essas mudanças teriam ocorrido independentemente uma da outra, exigindo três passos. Na mudança do

estado 0 para o 1 ocorre subordinação de um dos componentes do comportamento e do estado 0 para o 2 ocorre a perda desse mesmo componente do comportamento e esta perda pode perfeitamente ter ocorrido de forma independente nos dois clados. Por outro lado, caso se tratasse da aquisição de um novo componente, seria muito improvável que os dois tivessem surgido independentemente. No entanto, na topologia obtida pela análise comportamental, todas as transformações neste caráter ocorreram com apenas dois passos, enquanto na nova topologia três foram necessários. À medida que mais passos são necessários para a explicação dos caracteres, menos parcimoniosa e, consequentemente, menos provável as transformações se tornam.

O caráter 15 (AD) ocorre em todos os indivíduos analisados, porém mais basalmente a limpeza é só no abdome, enquanto nos mais derivados ela pode ocorrer também na asa. Na topologia apresentadas pelos dados comportamentais foram necessários dois passos para explicá-la, um surgimento da limpeza na asa no ancestral comum a *Apis* e Meliponina e uma perda em *Melipona* (figura 2.5 e 2.6). Cabe ressaltar que a limpeza na asa não foi observada em *Melipona,* mas mesmo assim poderia ser que em um número maior de observações, esse comportamento se confirmasse. De qualquer modo, na hipótese combinada é assumido que a limpeza na asa a partir da do abdome teria surgido duas vezes independentemente em *Apis* e no ancestral comum à Meliponina. Por último, o caráter 25 (1H predominante). Consonante com a topologia comportamental, a preferência para a limpeza teria começado a se intensificar no ancestral comum a Bombina, Apina e Meliponina, tendo sido predominante de fato, no ancestral comum a Meliponina, essa hipótese evolutiva para o comportamento sugere 2 passos (figura 2.5 e 2.6). A topologia da hipótese combinada assume que a preferência para a limpeza bilateral estava presente no ancestral comum a todas as corbiculadas tendo sido de fato predominante nos meliponíneos e regredido a predominância da limpeza unilateral, assim como é no grupo externo nos euglossíneos, exigindo para isso 3 passos (figura 2.7).

Após essa intensa discussão a respeito da evolução dos caracteres comportamentais, podemos concluir que embora menos parcimoniosa, a topologia da hipótese combinada não invalida a evolução dos caracteres comportamentais da forma como os propusemos, apenas admite passos a mais. No entanto, o número de passos extras para explicar a evolução comportamental na topologia da hipótese combinada é menor do que o número de passos extras para explicar a evolução molecular na topologia comportamental.

Sendo assim, a melhor topologia encontrada neste trabalho para explicar nossos dados comportamentais é aquela que agrupa Apina com Meliponina e estabelece que Euglossina foi o primeiro grupo a divergir. Quando os dados são tomados em conjunto, o relacionamento filogenético proposto pelos dados moleculares predomina, indicando que a eussocialidade, no seu modo primitivo, estava presente no ancestral comum às corbiculadas e a eussocialidade completa surgiu duas vezes de formas independes no ancestral comum à Meliponina e no ancestral comum à Apina. Deste modo, as espécies dentro de Euglossina teriam sofrido diferentes níveis de reversão.

2.5 TABELAS E FIGURAS

Tabela 2.1. Lista das espécies utilizadas na análise comportamental.

Grupo externo	**Euglossina**
Xylocopinae: Xylocopini:	*Eulaema nigrita*
*Xylocopa (*cfr. *Neoxylocopa)*	*Euglossa chordata*
	Meliponina
Grupo interno	*Celetrigona longicornis*
Apinae: Apini:	*Frieseomelitta languida*
Apina	*Frieseomelitta varia*
Apis mellifera	*Melipona scutellaris*
Bombina	*Nannotrigona testaceicornis*
Bombus brasiliensis	*Plebeia droryana*
Bombus pauloensis	

Tabela 2.2. Matriz completa de caracteres comportamentais utilizados na análise filogenética.

```
                          1   5    10   15   20   25   30   35   40   45   50   55   60   65   70   75   80   85   90   95
                          |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
Xylocopini                0000001010001000110111100 00-100001001000-1-110----------0000000-------1-000---11-00000000000000
Euglossa chordata         1010011210001101111111112011011111100111001011101100000000011110-------1101111-11010110101101011
Eulaema nigrita           1110011210101100111177120010101111001100010111010000010000101101100000011101111011010000101010 11
Bombus brasiliensis       1011021211001101112111101001111101001100010111011110000001011010-------1101011-11010101011000017
Bombus pauloensis         1011021211001101112111101001111111011100111110111000000111011 0-------1111011-11110100110001011
Apis mellifera            1132111110001117112111111110011110100110071011101111000001110010111110111111?111111100010012111110
Celetrigona longicornis   1122121110001112111111112100101101011001111111111111111111201111011011011111111111111000101131110?
Frieseomelitta languida   1122121210011172111111172100111101011001011111111111100000001010011111111110101111111000003111 11
Frieseomellita varia      1122021110001011111111112100110011101110111111111111101101100010111101111100101111110000003011 10
Melipona scutellaris      1122021110001102112111112101111111001000111111111111?000011101101000010111111111000001000210101
Nannotrigona testaceicornis 1122711210011117111111112101111011001100011110111111101111011101001001111101?111101010101101110 1
Plebeia droryana          1022011210001012111177132101101111001000011111111111110000--------------1111111-11110011001011001
```

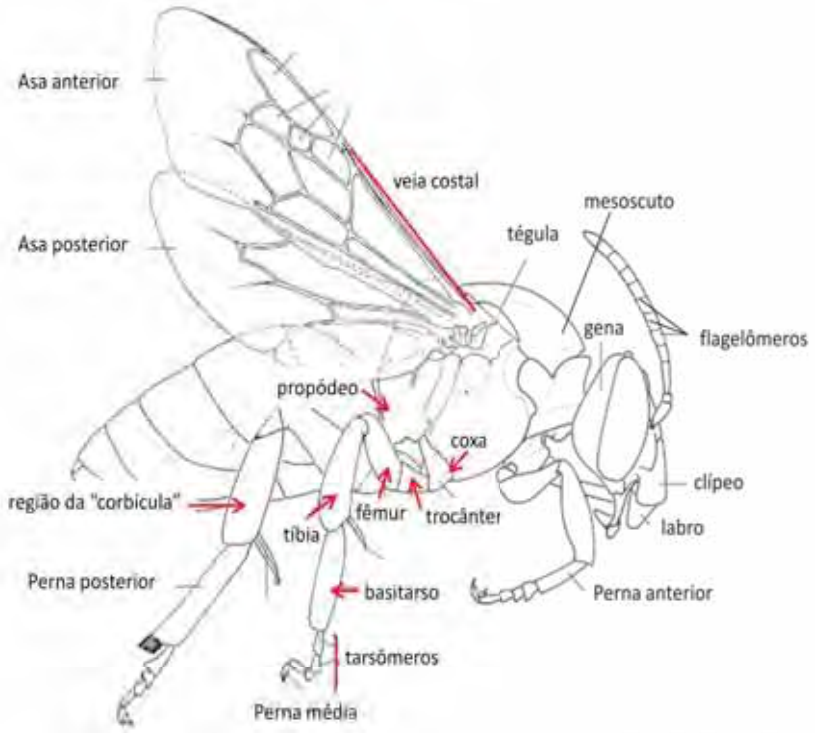
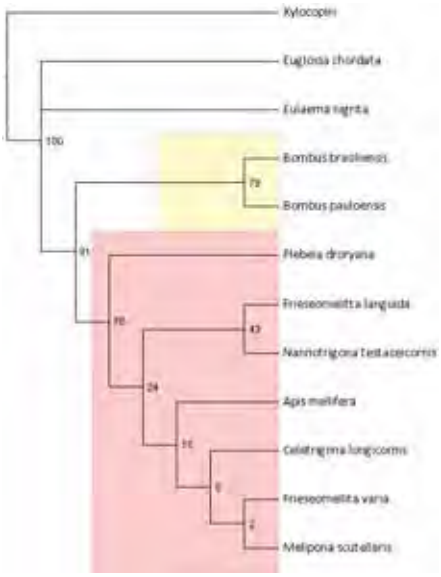
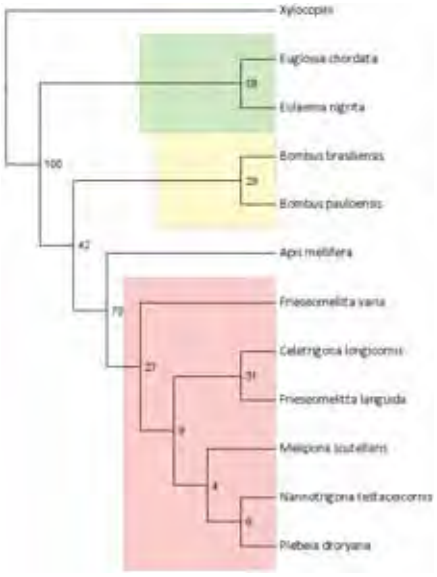


Figura 2.1. Fêmea de *Thygater analis* (Eucerini), vista lateral, pilosidade omitida. A superfície da asa visualizada é a ventral, pois é a que fica voltada para baixo quando as asas estão em posição de repouso. Modificado de Silveira et al., 2002.

A) 25 caracteres comportamentais



B) 95 caracteres comportamentais sem pesagem



C) 95 caracteres comportamentais com pesagem

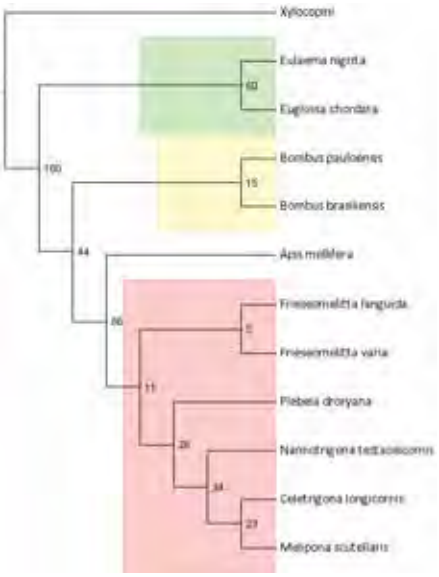
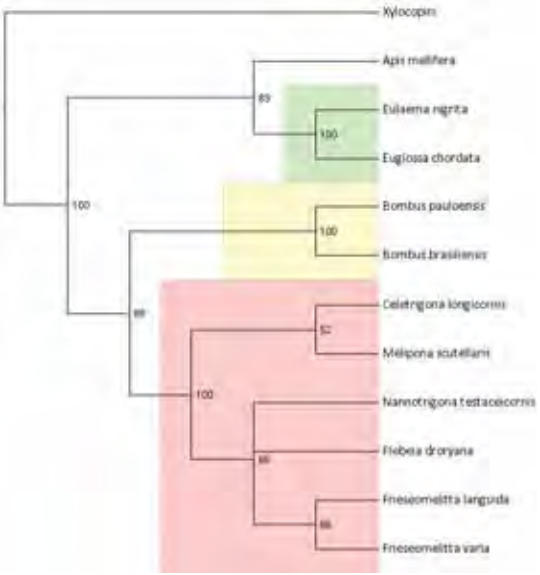


Figura 2.2. Análise filogenética comportamental retratando a evolução das abelhas corbiculadas. A) Consenso estrito das duas árvores igualmente parcimoniosas encontradas, utilizando somente os 25 caracteres que indicam ausência e presença de comportamentos, L = 38, CI = 68 e RI = 75. B) Árvore mais parcimoniosa encontrada utilizando todos os 95 caracteres que incluíam sequências comportamentais sem pesagem, L = 186, CI = 47 e RI = 47. C) Árvore mais parcimoniosa encontrada obtida por meio de pesagem implícita, utilizando todos os 95 caracteres, L = 187, CI = 47 e RI = 47. Números nos ramos são valores de bootstrap em 1000 replicações. L = comprimento da árvore, CI = índice de consistência, RI = índice de retenção. Código de cores: rosa = Meliponina, amarelo = Bombina, verde = Euglossina. *Apis mellifera* = Apina.

A) Caracteres moleculares e comportamentais



B) Caracteres moleculares

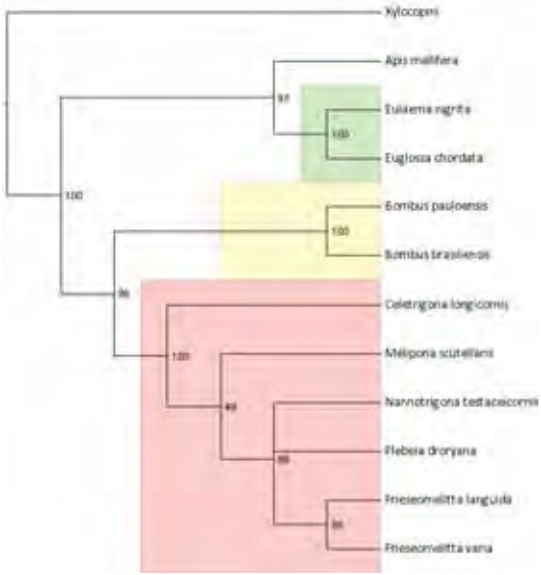


Figura 2.3. Cladogramas retratando o relacionamento filogenético das abelhas corbiculadas. A) Consenso estrito das duas árvores igualmente parcimoniosas obtidas utilizando caracteres comportamentais e moleculares, L = 1768, CI = 67 e RI = 60. B) Consenso estrito das duas árvores igualmente parcimoniosas encontradas utilizando somente os dados moleculares dos quatro genes, L = 1566, CI = 71, RI = 63. Números nos ramos são valores de bootstrap em 1000 replicações. L = comprimento da árvore, CI = índice de consistência, RI = índice de retenção. Código de cores: rosa = Meliponina, amarelo = Bombina, verde = Euglossina. *Apis mellifera* = Apina.

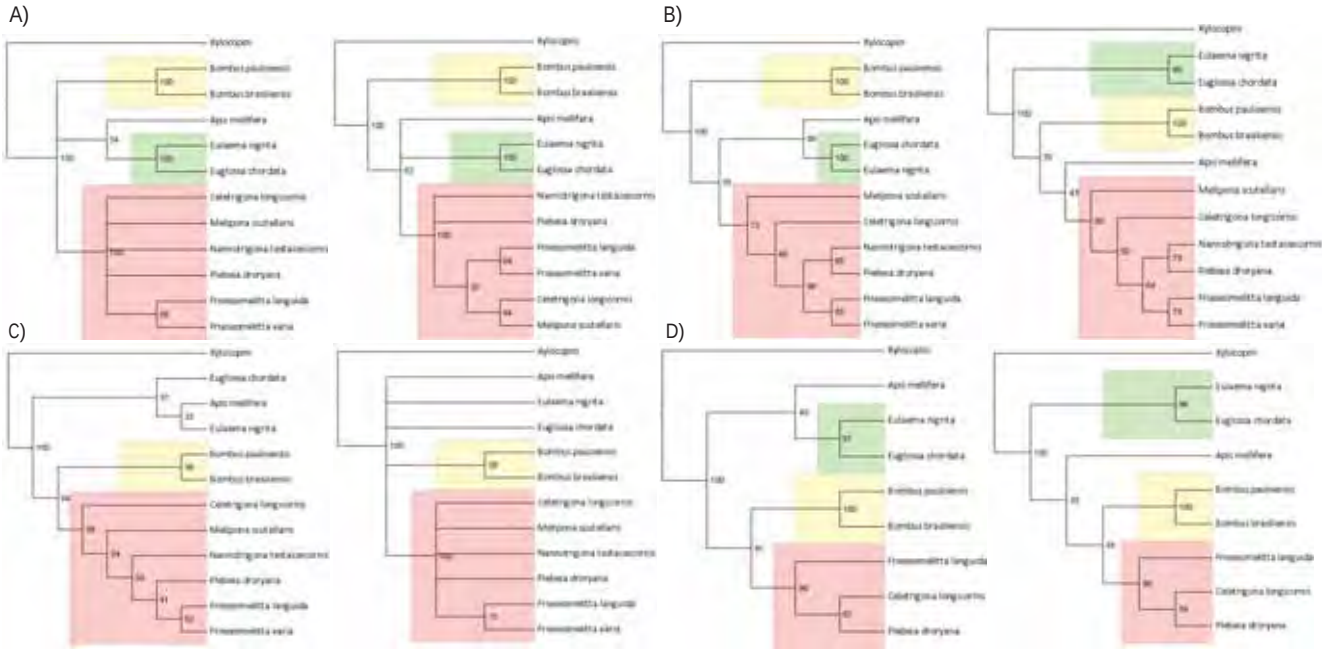


Figura 2.4. Cladogramas retratando o posicionamento filogenético das abelhas corbiculadas. À esquerda cladogramas estritamente moleculares, à direita cladogramas obtidos por meio de caracteres moleculares e comportamentais. A) Consenso estrito das árvores obtidas para o gene EF-1alfa, L=426, CI=73 e RI=72; L=621, CI=64 e RI=62, respectivamente. B) Árvores mais parcimoniosas obtidas para o gene 28S, L=179, CI=76 e RI=80; L=448, CI=66 e RI=61, respectivamente. C) Árvore mais parcimoniosa L=441, CI=68, RI=58 e consenso estrito L=640, CI=61 e RI=51 obtidos para o gene 16S. D) Árvores mais parcimoniosas obtidas para o gene citb, L=438, CI=65 e RI=50; L=583, CI=64 e RI=48. Números nos ramos são valores de bootstrap em 1000 replicações. L = comprimento da árvore, CI = índice de consistência, RI = índice de retenção. Código de cores: rosa = Meliponina, amarelo = Bombina, verde = Euglossina. *Apis mellifera* = Apina.

Figura 2.5. Filogenia comportamental das abelhas corbiculadas. Análise de parcimônia **sem pesagem,** 95 caracteres, L = 186, CI = 47 e RI = 47. Mesma árvore apresentada na figura 2.2B. Números acima e abaixo dos ramos são os caracteres e seus respectivos estados (tabela 2.2). Círculos preenchidos representam sinapomorfias incontestáveis e círculos abertos representam homoplasias.

Figura 2.6. Filogenia comportamental das abelhas corbiculadas. Análise de parcimônia **com pesagem,** 95 caracteres, L = 187, CI = 47 e RI = 47. Mesma árvore apresentada na figura 2.2C. Números acima e abaixo dos ramos são os caracteres e seus respectivos estados (tabela 2.2). Círculos preenchidos representam sinapomorfias incontestáveis e círculos abertos representam homoplasias.

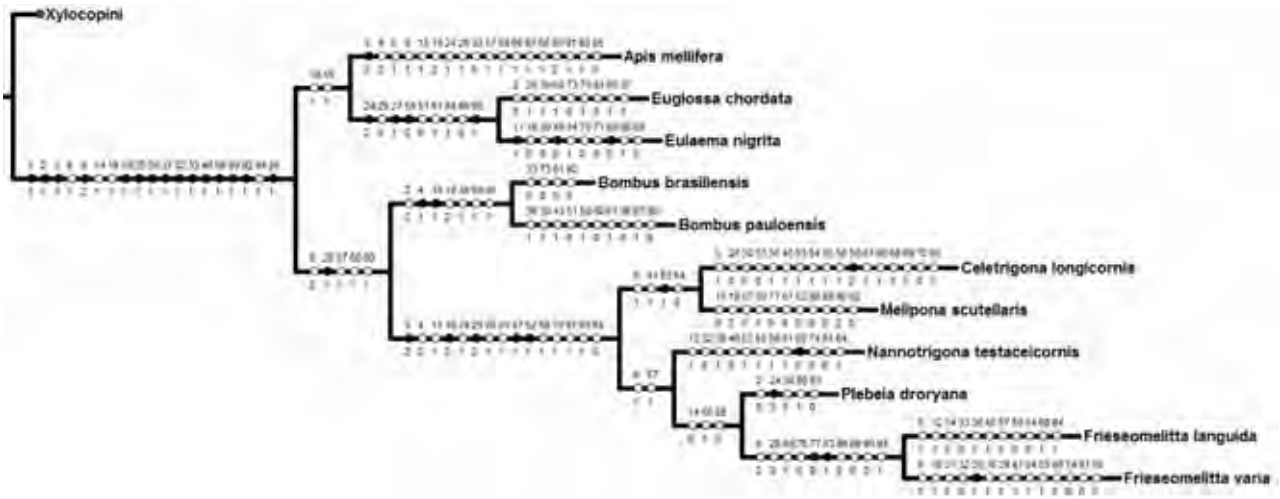


Figura 2.7. Filogenia comportamental e molecular das abelhas corbiculadas. Análise de parcimônia sem pesagem, 2817 caracteres, L = 1768, CI = 67 e RI = 60. Mesma árvore apresentada na figura 2.3A. Números acima e abaixo dos ramos são os caracteres comportamentais e seus respectivos estados (tabela 2.2). Círculos preenchidos representam sinapomorfias incontestáveis e círculos abertos representam homoplasias.

Considerações finais

A melhor topologia encontrada neste trabalho para explicar nossos dados comportamentais é aquela que agrupa Apina com Meliponina e estabelece que Euglossina foi o primeiro grupo a divergir. Esta hipótese indica que a eussocialidade avançada foi herdada a partir de um ancestral comum em Apina e Meliponina, tendo surgido a partir da eussocialidade primitiva presente em *Bombus*. Enquanto a topologia que melhor explica nossos dados moleculares é aquela que agrupa Bombina com Meliponina e Apina com Euglossina, embora esse último seja menos suportado. Esses dois conjuntos de dados apontam caminhos totalmente diferentes para a evolução das abelhas corbiculadas e consequentemente para o surgimento da eussocialidade.

Quando analisados conjuntamente, o relacionamento filogenético proposto pelos dados moleculares predomina, indicando que a eussocialidade, no seu modo primitivo, estava presente no ancestral comum às corbiculadas e a eussocialidade completa surgiu duas vezes de formas independes no ancestral comum à Meliponina e no ancestral comum à Apina. Tendo as espécies dentro de Euglossina sofrido diferentes níveis de reversão.

Noll (2002) analisou uma série de comportamentos que constituem a socialidade. Ao invés de usar somente o caráter socialidade dividido em três estados: primitivamente social (Bombina), altamente social (Apina e Meliponina) e solitária ou comunal (Euglossina), ele utilizou 42 caracteres que dizem respeito à vida na colônia, como por exemplo, estoque de alimento, reprodução de operárias, interações fêmea-fêmea, construção do ninho, forrageio, etc. Tendo encontrado exatamente o mesmo relacionamento filogenético proposto pela maioria dos trabalhos que usaram morfologia.

Alguns podem argumentar que utilizar caracteres relacionados à vida social gere um viés que leve ao agrupamento de Meliponina e Apina, já que as duas são eussociais e convergentemente podem ter apresentado as mesmas respostas aos problemas decorrentes da vida eussocial. Assim, teriam apresentado estados de caráter semelhantes que levaram ao seu agrupamento devido à convergência ao invés de simplesmente terem compartilhado um ancestral em comum. No entanto, ao se desmembrar o caráter socialidade em 42 caracteres, vê-se que não seria simplesmente uma pequena característica a convergir e sim

várias, algumas das quais evoluíram de forma independente em vários caracteres (NOLL, 2002).

Em contrapartida, não se pode dizer o mesmo a respeito dos caracteres comportamentais de auto-limpeza. Não há motivos para acreditar que esse comportamento sofra alguma influência do modo de vida da espécie. Os movimentos elementares de limpeza são traçados desde os traqueados primitivos através da linhagem de descendentes até as abelhas adultas (JANDER, 1976) por meio dos princípios metodológicos de homologia e analogia desenvolvidos por Remane (1956 apud JANDER, 1976) e Hennig (1966). Noll & Pizarro (2009) em um trabalho completamente independente deste, avaliaram o comportamento de auto-limpeza de alguns táxons e chegaram exatamente a mesma proposto filogenética que nós.

É no mínimo intrigante o fato de dados comportamentais de um modo geral (NOLL, 2002; NOLL & PIZARRO, 2009), dados morfológicos (MICHENER, 1944, 1990; PRENTICE, 1991; ROIG-ALSINA & MICHENER, 1993; CARDINAL & PACKER, 2007) e dados paleontológicos (SCHULTZ et al., 2001) sugerirem uma hipótese evolutiva e dados moleculares (CAMERON, 1991, 1993; SHEPPARD & MCPHERON, 1991; KOULIANOS et al., 1999; MARDULYN & CAMERON, 1999; CAMERON & MARDULYN, 2001; KAWAKITA et al., 2008; CARDINAL et al., 2010) sugerirem outra completamente diferente. Ainda, quatro gêneros fósseis recentemente descritos de abelhas corbiculadas, representando pelo menos 13 novas espécies, possuem caracteres morfológicos intermediários entre Bombina e as abelhas altamente eussociais Meliponina e Apina (SCHULTZ et al., 2001). Além disso, quatro novos gêneros representando 11 novas espécies fósseis possuem combinações de caracteres morfológicos intermediários entre Apina e Meliponina (SCHULTZ et al., 2001).

Toda essa problemática nos remete a uma série de questionamentos. Será que a amostragem no caso das análises moleculares não tem produzido algum viés? Sabemos que nem sempre a evolução do gene reflete a evolução da espécie. Será que a evolução gênica não foi especialmente problemática nesse grupo de abelhas, pelo menos a dos genes utilizados? Um exemplo claro de posicionamento ambíguo nesse grupo dá-se em Apina e Euglossina. Cada fragmento gênico o resolve de um modo e com suporte relativamente alto. Ainda há o problema dos grupos externos, que pareceu influenciar bastante a topologia. Conclusões baseadas em poucos grupos externos pode não ser confiáveis e demonstram a importância de uma amostragem adequada de abelhas não corbiculadas (SCHULTZ et al.,

2001). Ou será que toda a evolução morfológica e comportamental foi de fato convergente? Isso parece ser pouco provável.

Referências Bibliográficas

AMORIM, D. S. **Fundamentos de Sistemática Filogenética.** Ribeirão Preto, SP: Holos. 2002. 156 p.

ASCHER, J. S.; DANFORTH, B. N.; JI, S. Q. Phylogenetic utility of the major opsin in bees (Hymenoptera: Apoidea): A reassessment. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 19, n. 1, p. 76–93, 2001.

AUGUSTO, S. C.; GARÓFALO, C. A. Nesting biology and social structure of Euglossa (Euglossa) townsendi Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). **Insect. Soc.**, v. 51, n. 4, p. 400-409. 2004

BASIBUYUK, H. H.; QUICKE, D. L. J. Grooming behaviours in the Hymenoptera (Insecta): potential phylogenetic significance. **Zool. J. Linn. Soc-Lond.**, v. 125, n. 3, p. 349–382, 1999.

CAMERON, S. A. A new tribal phylogeny of the Apidae inferred from mitochondrial DNA sequences. In: SMITH, D. R. (Ed.). **Diversity in the Genus *Apis.*** Boulder, CO: Western Press, 1991. p. 71-87.

CAMERON, S. A. Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, n. 18, p. 8687–8691, 1993.

CAMERON, S. A.; DERR, J. N.; AUSTIN, A. D.; WOOLEY, J. B.; WHARTON, R. A. The application of nucleotide sequence data to phylogeny of the Hymenoptera: A review. **J. Hymenop. Res.**, v. 1, n. 1, p. 63-79, 1992.

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

CARDINAL, S.; DANFORTH, B. N. The Antiquity and Evolutionary History of Social Behavior in Bees. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. 1-9, 2011.

CARDINAL, S.; PACKER, L. Phylogenetic analysis of the corbiculate Apinae based on morphology of the sting apparatus (Hymenoptera: Apidae). **Cladistics**, v. 23, n. 2, p. 99-118, 2007.

CARDINAL, S.; STRAKA, J.; DANFORTH, B. N. Comprehensive phylogeny of apid bees reveals the evolutionary origins and antiquity of cleptoparasitism. **P. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 37, p. 16207–16211, 2010.

CHAVARRIA, G.; CARPENTER, J. M. "Total evidence" and the evolution of highly social bees. **Cladistics**, v. 10, n. 3, p. 229-258, 1994.

DANFORTH, B. N. Evolution of sociality in a primitively eusocial lineage of bees. **P. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 1, p. 286-290, 2002.

DANFORTH, B. N.; CONWAY, L.; JI, S. Phylogeny of eusocial *Lasioglossum* reveals multiple losses of eusociality within a primitively eusocial clade of bees (Hymenoptera: Halictidae). **Syst. Biol.**, v. 52, v. 1, p. 23-36, 2003.

DE QUEIROZ, A.; WIMBERGER, P. H. The usefulness of behavior for phylogeny estimation: levels of homoplasy in behavioral and morphological characters. **Evolution**, v. 47, n. 1, p. 46–60, 1993.

DRESSLER, R. L. Biology of the orchid bees (Euglossini). **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v. 13, p. 373-394, 1982.

FARISH, D. J. The evolutionary implications of qualitative variation in the grooming behavior of the Hymenoptera (Insecta). **Anim. Behav.**, v. 20, n. 4, p. 662–676, 1972.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from molecular sequences: a maximum likelihood approach. **J. Mol. Evol.**, v. 17, n. 6, p. 368-376, 1981.

GOLOBOFF, P.; FARRIS, J. S.; NIXON, K. TNT: a free program for phylogenetic analysis. **Cladistics**, v. 24, n. 5, p. 774-786, 2008.

HENNIG, W. **Phylogenetic Systematics.** Urbana, IL: University of Illinois Press. 1966. 265 p.

JANDER, U. Untersuchen zur Stammesgeschichte von Putzbewegungen von Tracheaten. **Z. Tierpsychol.**, v. 23, n. 7, p. 799–844, 1966.

JANDER, R.; JANDER, U. Wing grooming in bees (Apoidea) and the evolution of wing grooming in insects. **J. Kansas Entomol. Soc.**, v. 51, n.4, p. 653-665, 1978.

JOWETT, T. Preparation of nucleic acids. In: ROBERTS, D. B. (Ed.). **Drosophila:** A Practical Approach, New York, NY: Oxford University Press, 1986. p. 275-277.

KAWAKITA, A.; ASCHER, J. S.; SOTA, T.; KATO, M.; ROUBIK, D. W. Phylogenetic analysis of the corbiculate bee tribes based on 12 nuclear protein-coding genes (Hymenoptera: Apoidea: Apidae). **Apidologie**, v. 39, n. 1, p. 163–175, 2008.

KAWAKITA, A.; SOTA, T.; ASCHER, J. S.; ITO, M.; TANAKA, H.; KATO, M. Evolution and phylogenetic utility of alignment gaps within intron sequences of three nuclear genes in bumble bees (*Bombus*). **Mol. Biol. Evol.**, v. 20, n. 1, p. 87–92. 2003.

KIMSEY, L. S. A reevaluation of the phylogenetic relationships in the Apidae (Hymenoptera). **Syst. Entomol.**, v. 9, n. 4, p. 435-442, 1984.

KOULIANOS, S.; CROZIER, R. H. Two ancient mitochondrial alleles in Australian honeybees. **Apidologie**, v. 22, n. 6, p. 621-626, 1991.

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

KURT, F.; Hartl, G. B. Socio-ethogram of adult males versus biochemical-genetic variation in assessing phylogenetic relationships of the Caprinae. **Acta Theriol.**, v. 3, p. 183–197, 1995. Suplemento

LIN, C. P.; DANFORTH, B. N. How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined data sets. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 30, n. 3, p. 686–702, 2004.

MARDULYN, P.; CAMERON, S. A. The major opsin in bees (Insecta: Hymenoptera), a promising nuclear gene for higher level phylogenetics. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 12, n. 2, p. 168–176, 1999.

MICHENER, C. D. Comparative external morphology, phylogeny, and a classification of the bees. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 82, p. 151-326, 1944.

MICHENER, C. D. **The social behavior of bees.** Cambridge, MA: Harvard University Press. 1974. 404 p.

MICHENER, C. D. Classification of the Apidae (Hymenoptera). **Univ. Kansas Sci. Bull.**, v. 54, n. 4, p. 75-164, 1990.

MICHENER, C. D. **The Bees of the World.** Baltimore, MD: Johns Hopkins. 2000. 913 p.

NIXON, K. C. **WinClada ver. 1.00.08**. Ithaca, NY: Published by the author. 2002. 308 p.

NIXON, K. C.; CARPENTER, J. M. On outgroups. **Cladistics**, v. 9, n. 4, p. 413-423, 1993.

NOLL, F. B. Behavioral phylogeny of corbiculate Apidae (Hymenoptera; Apinae), with special reference to social behavior. **Cladistics**, v. 18, n. 2, p. 137-153, 2002.

NOLL, F. B.; PIZARRO, L. C. Behavioral Phylogeny of corbiculate bees based on self cleaning. In: ANIMAL BEHAVIOR SOCIETY, 46, 2009, Pirenópolis, Brasil.

PLANT, J. D.; PAULUS, H. F. Comparative morphology of the postmentum of bees (Hymenoptera: Apoidea) with special remarks on the evolution of lorum. **Zool. Syst. Evol. Forsch.**, v. 25, n. 2, p. 81-103, 1987.

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Mol. Biol. Evol.**, v. 25, n. 7, p. 1253-1256, 2008.

PRENTICE, M. Morphological analysis of the tribes of Apidae. In: SMITH, D. R. (Ed.). **Diversity in the Genus *Apis.*** Boulder, CO: Western Press, 1991. p. 51-69.

PRUM, R. O. Phylogenetic analysis of the evolution of display behavior in the neotropical manikins (Aves: Pipridae). **Ethology**, v. 84, p. 202–231, 1990.

RAMÍREZ, S. R.; ROUBIK, D. W.; SKOV, C.; PIERCE, N. E. Phylogeny, diversification patterns and historicalvbiogeography of euglossine orchid bees (Hymenoptera: Apidae). **Biol. J. Linn. Soc.**, v. 100, n. 3, p. 552–572, 2010.

RASMUSSEN, C.; CAMERON, S. A. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. **Biol. J. Linn. Soc.**, v. 99, n. 1, p. 206–232, 2010.

REMANE, A. **Die Grundlagen des natürlichen Systems, der vergleichenden Anatomie und Phylogenetik:** theoretische Morphologie und Systematik I. Geest und Portig, Leipzig, 1956. 364 p.

RENDALL, D.; DI FIORE, A. Homoplasy, homology, and the perceived special status of behavior in evolution. **J. Hum. Evol.**, v. 52, n. 5, p. 504-521, 2007.

ROIG-ALSINA, A.; MICHENER, C. D. Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera, Apoidea). **Univ. Kansas Sci. Bull.**, v. 55, n. 4, p. 123-162, 1993.

ROUBIK, D. W. **Ecology and natural history of tropical bees.** New York, NY: Cambridge University Press. 1989. 514p.

SAKAGAMI, S. F.; MICHENER, D. D. Tribes of Xylocopinae and origin of the Apidae (Hymenoptera: Apoidea). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 80, n.3, p. 439–450, 1987.

SCHUH, R. T. **Biological systematics:** Principles and applications. Ithaca, NY: Cornell University Press. 2000. 236 p.

SCHULTZ, T. R.; ENGEL, M. S.; ASCHIER, J. S. Evidence for the Origin of Eusociality in the Corbiculate Bees (Hymenoptera: Apidae). **J. Kansas Entomol. Soc.**, v. 74, n. 1, p. 10-16, 2001.

SCHULTZ, T. R.; ENGEL, M. S.; PRENTICE, M. Resolving conflict between morphological and molecular evidence for the origin of eusociality in the "corbiculate" bees (Hymenoptera: Apidae): A hypothesis-testing approach. **Univ. Kansas Nat. Hist. Mus. Spec. Publ.**, v. 24, p. 125-138, 1999.

SCOTLAND, R. W.; PENNINGTON, T. **Homology and Systematics:** Coding Characters for Phylogenetic Analysis (Systematics Association Special Volume). Philadelphia, PA: Taylor and Francis, 2000. 232 p.

SERRÃO, J. E**. A comparative study of the proventricular structure in corbiculate apinae (Hymenoptera, Apidae). Micron.**, v. 32, n. 4, p. 379-385, 2000.

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

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas Brasileiras, Sistemática e Identificação.** Belo Horizonte, MG, 2002. 254 p.

SWOFFORD, D. L.; OLSEN, G. J.; WADDELL, P. J.; HILLIS, D. M. Phylogenetic inference. In: HILLIS, D. M.; MORTIZ, C. (Eds.). **Molecular Systematics.** Sunderland, MA: Sinauer, 1996. p. 407-514.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol. Biol. Evol.**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

THELEN, R.; FARISH, D. J. An analysis of the grooming behavior of wild and mutant strains of Bracon hebetor (Braconidae: Hymenoptera). **Behaviour**, v. 62, n. 1-2, p. 70–102, 1977.

TURILLAZZI, P. G.; ZAPPONI, G. A. Analysis of relationship between locomotion and grooming activity in cockroach (Periplaneta americana). **Fragm. Entomol.**, v. 16, p. 133–141, 1982.

VALENTINE, B. D. Grooming behaviour in Coleoptera. **Coleopt. Bull.**, v. 27, n. 2, p. 63–73, 1973.

VALENTINE, B. D.; GLORIOSO, M. J. Grooming behaviour in Diplura (Insecta: Apterygota). **Psyche**, v. 85, p. 191–200, 1978.

VARÓN, A.; VINH, L. S.; WHEELER, W. C. POY version 4: phylogenetic analysis using dynamic homologies**. Cladistics**, v. 26, n. 1, p. 72-85, 2010.

WCISLO, W. T. Are behavioral classifications blinders to studying natural variation? In: CHOE, J. C.; CRESPI, B. (Eds.). **The evolution of social behavior in insects and arachnids.** New York, NY: Cambridge University Press, 1997. p. 8-13.

WILSON, E. O. Behavior of Daceton armigerum (Latreille), with a classification of self-grooming movements in ants. **Bull. Mus. Comp. Zool.**, v. 127, n. 7, p. 401–422, 1962.

WINSTON, M. L.; MICHENER, C. D. Dual origin of highly social behavior among bees. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, n. 3, p. 1135-1137, 1977.

ZWICKL, D. J. **Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion.** 2006. Tese - The University of Texas at Austin, Austin, TX, USA.