

HUGO DE AZEVEDO WERNECK

**SISTEMÁTICA MOLECULAR E EVOLUÇÃO DO CLADO
PLEBEIA: ANÁLISES BASEADAS EM FILOGENIA E DATAÇÃO
MOLECULAR DA TRIBO MELIPONINI**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

W491s
2016

Werneck, Hugo de Azevedo, 1980-
Sistemática molecular e evolução do clado Plebeia :
análises baseadas em filogenia e datação molecular da tribo
Meliponini / Hugo de Azevedo Werneck. – Viçosa, MG, 2016.
x, 78f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Abelhas sem ferrão. 2. Biogeografia. 3. Filogenia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.

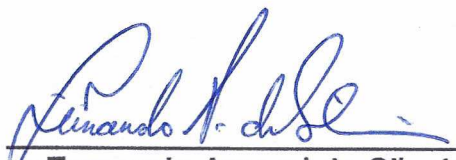
CDD 22 ed. 595.799

HUGO DE AZEVEDO WERNECK

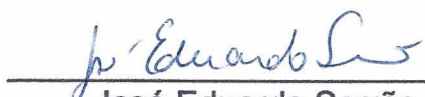
**SISTEMÁTICA MOLECULAR E EVOLUÇÃO DO CLADO
PLEBEIA: ANÁLISES BASEADAS EM FILOGENIA E DATAÇÃO
MOLECULAR DA TRIBO MELIPONINI**

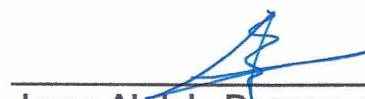
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

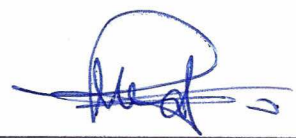
APROVADA: 03 de novembro de 2016.


Fernando Amaral da Silveira


Karla Suemy Clemente Yotoko


José Eduardo Serrão


Jorge Abdala Dergam dos Santos


Lucio Antonio de Oliveira Campos
(Orientador)

“...O viajante comoveu-se de pena da pequena raça humana, na qual percebeu contrastes tão espantosos.

- Já que vocês pertencem ao pequeno grupo dos sábios – disse ele a esses senhores – e que aparentemente não matam ninguém por dinheiro, digam-me por favor o que fazem.

- Nós dissecamos moscas - disse o filósofo -, medimos linhas, juntamos números; nós concordamos acerca de dois ou três pontos que entendemos e brigamos por dois ou três mil que não entendemos...”

Voltaire (1752). Micromegas: uma história filosófica.

Dedico a Aline, Isabela e Sandra

E em memória dos que deixaram ensinamentos e saudades eternas: Olavo, Ivo, Aurelina, Geraldo, Gina e Pedro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Lucio A. O. Campos pela confiança e orientação na condução deste estudo. Também sou grato por permitir utilizar sua sala para realizar meus estudos, o que foi crucial para minha formação. Além disso, serei sempre grato pela amizade e pelas discussões sadias sobre o mundo e sobre o ser humano. E, obviamente, não poderia deixar de agradecer pelos cafés e cervejas ao longo do meu mestrado e doutorado.

Sou grato ao Professor Gabriel A. R. Melo por aceitar me coorientar neste projeto. Sem o seu conhecimento sobre a sistemática e a taxonomia das abelhas sem ferrão, esse estudo não seria o mesmo.

Agradeço aos membros da banca examinadora, Professor Fernando Amaral da Silveira, Professora Karla Yotoko, Professor Jorge Dergam e Professor José E. Serrão, por aceitarem participar dessa etapa final do meu doutorado e de grande importância para minha formação.

Agradeço ao Prof Helder C. Resende por aceitar me coorientar e pelas ajudas com as primeiras extrações e amplificações de DNA.

Serei eternamente grato à toda minha família, em especial à minha mãe, Sandra, e à minha filha, Isabela. Obrigado a todos vocês pela paciência, apoio, compreensão e confiança.

Devo inúmeros agradecimentos especiais à minha esposa, Aline. Obrigado por todo o amor, paciência, companheirismo, apoio e pelas infindáveis leituras das versões iniciais da tese.

Aos companheiros de UFV: Carol, Renata, Natália, Tércia, João, Fernando, Mayla, Priscila, Camila, Rúdo, Kenner, Marina, Nathália, Jansen, Nicole... E todos os outros que de alguma forma fizeram parte dessa trajetória. Obrigado!

Faço um agradecimento especial ao Prof Weyder Santana, pelo seu hercúleo empenho em conseguir amostras com seus milhares de contatos por todo o Brasil, o que com certeza enriqueceu o estudo enormemente. Estendo esses agradecimentos, obviamente, às pessoas que enviaram as amostras para ele. Muito obrigado a todos.

Ao colega Sérgio Pinto por fornecer várias amostras de *Plebeia*, *Lestrimelitta* e *Friesella* do litoral do Rio de Janeiro.

Agradeço ao Sidnei Mateus (USP-Ribeirão Preto) pelo envio de várias amostras de *Plebeia* de seu acervo. Muito obrigado, sua ajuda foi muito importante.

Sou grato ao Professor Breno Freitas (Universidade Federal do Ceará) pelo envio de amostras de *Plebeia* do Ceará.

Agradeço ao Professor Murilo Drummond (Universidade Federal do Maranhão) pelo fornecimento de amostras de *Plebeia* do Maranhão.

Agradeço também ao David Nogueira (Universidade Federal do Amazonas) por fornecer amostras de *Plebeia* de Manaus.

Sou extremamente grato ao Leopoldo Álvarez pelo envio de amostras de *Plebeia* de Salta, na Argentina.

Agradecimentos também vão ao colega “Marcos Abelha”, de Salvador-BA, pelo fornecimento de amostras da BA.

Agradeço à Professora Ana Maria Waldschmidt e ao Professor Rogério Alves pelas várias amostras enviadas da Bahia.

Sou grato ao Prof Marcos Costa pelo envio de amostras de *Plebeia grapiuna* de Ilhéus.

Agradeço ao Prof Gabriel Melo e seus alunos pelo envio de amostras do México, Peru e da Amazônia brasileira.

Agradeço à Profa Denilce e ao Colega Ríudo pelas amostras de *Plebeia lucii* de Mutum-MG.

Sou grato a Monique Campos por fornecer amostras de *Plebeia* do MS.

Serei eternamente grato à Professora Ingrid Aguilar Monge e ao Eduardo Herrera, da Universidade da Costa Rica (UNA) e CINAT (Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales), por me receberem muito bem em Heredia enquanto estive lá, e pelas amostras cedidas para os meus estudos. Estendo meus agradecimentos aos meliponicultores que enviaram amostras pela Professora Ingrid.

Aos professores do curso Phylogenetic Systematic and Molecular Dating, em especial a Ole Seberg (Universidade de Copenhagen, Dinamarca), Alexandre Antonelli (Universidade de Gotemburgo, Suécia) e Johan Nylander (Universidade de Estocolmo, Suécia), pelos preciosos ensinamentos.

Agradeço a todos os pesquisadores que me enviaram informações pessoais sobre as espécies de *Plebeia*: Ingrid A. Monge (Costa Rica), Ricardo Ayala (México), MJ Sommeijer (sobre *Plebeia tobagoensis*) e Maria Bernasconi (Argentina).

A todas as pessoas que ajudaram durante as coletas: Vander Tosta, Íris Stanciola, Fernando Mendes, Ríudo, Paula, Tércia, Aline, Geraldo, Lucio, Weyder.

Agradeço a todos os professores da UFV que sempre estiveram de prontidão para sanar as mais diversas dúvidas que tive durante este trajeto.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade e por toda a infraestrutura disponível durante meu doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular pela oportunidade de trabalho e por todos os recursos cedidos para a execução deste projeto. Em especial à secretária Beth, por sua dedicação e competência.

À CAPES pela fornecimento da bolsa, a qual permitiu que eu me dedicasse exclusivamente à tese. E ao CNPq e FAPEMIG pelos recursos concedidos para o suporte deste estudo.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1: Filogenia molecular e sistemática do gênero de abelhas sem ferrão Plebeia (Apidae, Meliponini).....	16
Resumo.....	16
Introdução.....	16
Materiais e Métodos.....	20
Resultados e Discussão.....	26
Referências Bibliográficas.....	37
Anexos.....	42
CAPÍTULO 2: Tempos de divergência e biogeografia histórica do clado Plebeia (Hymenoptera: Apidae, Meliponini).....	52
Resumo.....	52
Introdução.....	52
Materiais e Métodos.....	55
Resultados e Discussão.....	60
Considerações Finais.....	69
Referências Bibliográficas.....	71
Anexos.....	76

RESUMO

WERNECK. Hugo de Azevedo. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2016. **Sistemática Molecular e Evolução do clado Plebeia: análises baseadas em filogenia e datação molecular da tribo Meliponini**. Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Coorientadores: Gabriel Augusto Rodrigues de Melo e Helder Canto Resende.

As abelhas sem ferrão são importantes polinizadores dos ecossistemas onde ocorrem. Atualmente, possuem distribuição pantropical com registros em algumas regiões subtropicais. Registros fósseis sugerem que Meliponini tenha ocupado as regiões Neártica, no final do Cretáceo, e Paleártica durante o Paleogeno e início do Neogeno. O início da diversificação de Meliponini ainda é controverso, embora estudos anteriores tenham estimado para o final do Cretáceo superior. O clado Plebeia é composto pelos gêneros Plebeia, Lestrimelitta e Friesella. Estudos baseados em morfologia sempre consideraram Plebeia como um gênero monofilético. No entanto, filogenias baseadas em sequências de DNA têm considerado Plebeia como polifilético. Sendo assim, a presente tese teve como objetivo utilizar um amplo conjunto de dados moleculares oriundo de sequências parciais de genes nucleares e mitocondriais, a fim de estudar a filogenia de Meliponini com ênfase no clado Plebeia, para que dessa forma fossem realizadas inferências a respeito da evolução dessas abelhas no espaço e no tempo. No Capítulo 1 nós testamos a monofilia de Plebeia a partir de uma ampla filogenia da tribo Meliponini baseada em genes nucleares (EF-1 α , ArgK, Opsin e 28S) e mitocondriais (CytB e 16S). Nossa amostragem abrange todas as regiões de ocorrência de Plebeia. Nós sequenciamos 76 terminais, incluindo 27 das 40 espécies descritas para Plebeia, cinco espécies de Lestrimelitta e cinco amostras de localidades diferentes do gênero monotípico Friesella. O conjunto de dados concatenado é composto por 4.112 pares de bases. Nossos resultados reforçam a polifilia de Plebeia e a monofilia de Lestrimelitta e Friesella. Foi possível reconhecer dois clados de Plebeia (I e II), com Lestrimelitta e Friesella entre eles (Plebeia I, (Friesella, (Lestrimelitta + Plebeia II))). As implicações dos nossos resultados para classificação do grupo aqui estudado foram discutidas. Por fim, foram feitos comentários sobre os grupos e as espécies de Plebeia. No Capítulo 2, nós utilizamos uma ampla filogenia da tribo Meliponini com datações moleculares utilizando fósseis como pontos de calibração, o que permitiu inferir sobre o início da história evolutiva de toda a tribo, além de reconstruir a história biogeográfica do clado Plebeia. Nossos resultados apontam a América do Sul como centro de origem das abelhas sem ferrão durante o Maastrichtiano no final do Cretáceo (ca 70 Ma). O clado

Plebeia se originou na sub-região Paranaense durante o Oligoceno (ca 28 Ma), com as primeiras dispersões para a Amazônia e México durante o início do Mioceno, e posteriores dispersões para a Amazônia, sub-região Chaquenha, Domínio do Pacífico e Mesoamericano durante o Tortoniano (ca 10 Ma). E, por fim, nossos dados também sugerem que elementos da fauna sul-americana de Meliponini se dispersaram da região Neotropical para a Neártica muito antes das datas estimadas para o fechamento do Istmo do Panamá, o que reforça a hipótese de rotas transoceânicas do início do Mioceno.

ABSTRACT

WERNECK. Hugo de Azevedo. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2016. **Molecular Systematics and Evolution of Plebeia clade: analysis based on phylogeny and molecular dating of the Meliponini tribe.** Advisor: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Co-advisors: Gabriel Augusto Rodrigues de Melo and Helder Canto Resende.

Stingless bees are important pollinators in tropical ecosystems. They are currently pantropical distributed, being also registered in some subtropical regions. Fossils records suggest that Meliponini have inhabited Nearctic region in the end of Cretaceous, and Palearctic region during Paleogene and the beginning of Neogene. The starting point of its diversification is still controversial, though previous studies have estimated it to the end of upper Cretaceous. Plebeia clade is composed of the genera Plebeia, Lestrimelitta and Friesella. Studies based on morphology have always considered Plebeia as a monophyletic genus. Phylogenies based on DNA sequences have, however, considered Plebeia as polyphyletic. Thus, the aim of this thesis was to use a wide set of molecular data from partial sequences of nuclear and mitochondrial genes to study Meliponini's phylogeny focusing on Plebeia clade, enabling inferences on their evolution through space and time. On Chapter 1, we tested the monophyly of Plebeia based on a broad phylogeny of Meliponini tribe set from nuclear (EF-1 α , ArgK, Opsin and 28S) and mitochondrial (CytB and 16S) genes. Our data set comprises all regions where Plebeia can be found. We have sequenced 76 terminals, including 27 from the 40 species described for Plebeia, five species of Lestrimelitta and five samples of the monotypic genus Friesella from different locations. The concatenated data set is composed of 4112 base pairs. Our results support the polyphyly of Plebeia and the monophyly of Lestrimelitta and Friesella. It was possible to recognize two clades of Plebeia (I and II), with Lestrimelitta and Friesella among them (Plebeia I, (Friesella, (Lestrimelitta + Plebeia II))). We have also discussed the implications of our results towards a classification of the group. On Chapter 2, we use a broad phylogeny of Meliponini tribe with molecular dating, and/or with fossils as calibrating points, enabling inferences on the beginning of its evolutionary history. It was also possible to reconstruct the biogeographical history of Plebeia clade. Our results suggest South America as the center of origin of stingless bees during the Maastrichtian in upper Cretaceous (~70 Ma). Plebeia clade has its origins in the Paranaense sub-region during the Oligocene (~28 Ma), with its first dispersions to the Amazon sub-region and Mexico

during the Miocene. The posterior dispersions were to the Chacoan sub-region, Pacific and the Mesoamerican Dominion during the Tortonian (~10 Ma). Finally, our data also suggest that elements from the South-American fauna of Meliponini have dispersed from the Neotropical region to the Nearctic long before the estimated date to the closing of Isthmus of Panama, endorsing the hypothesis of transoceanic routes in early Miocene.

INTRODUÇÃO GERAL

Todo conhecimento sobre a biodiversidade é importante nas tomadas de decisão que buscam a conservação das espécies. Para tanto, métodos para reconstruções filogenéticas que utilizam dados morfológicos, moleculares ou comportamentais, têm sido utilizados como ferramentas para a biologia da conservação em nível de populações, delimitação de espécies, sistemática e taxonomia (Sinclair et al. 2005; Lecocq et al. 2015; Schachat et al. 2016). Além disso, conhecer como a biodiversidade está organizada e como ela surgiu é de extrema importância, uma vez que assim podemos entender os processos que influenciaram os padrões atuais, além de inferir como alterações no ambiente podem atuar sobre os processos evolutivos (Purvis et al. 2005). Consequentemente, estudos filogenéticos baseados em dados moleculares, auxiliam na definição das iniciativas para a conservação da biodiversidade.

A presente tese tem como ponto central o estudo das relações evolutivas no clado *Plebeia* (sensu Melo 2016) com ênfase no gênero *Plebeia* Schwarz, 1938 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), a partir de métodos de reconstrução filogenética e datação molecular, utilizando-se sequências parciais de genes nucleares e mitocondriais. Essas abelhas exibem grande diversidade de características biológicas e comportamentais. Como resultado, há décadas inúmeras perguntas sobre sua biologia e comportamento vem sendo feitas (Bentham et al. 1995; Drumond et al. 2000; Hofstede & Sommeijer 2005; Roubik 2006; Hilário et al. 2012). Além disso, o pequeno tamanho dos indivíduos de algumas espécies e a distribuição do gênero por toda região Neotropical, inclusive com ampla distribuição de algumas espécies, como por exemplo, *P. droryana* (Friese, 1900), também são características que motivam estudos sobre sua diversidade genética (Francisco et al. 2011; Francisco et al. 2013), sistemática e taxonomia (Moure 1951; Michener 1990; Camargo & Pedro 1992, 2013; Ayala 1999, 2016; Melo 2016; Álvarez et al. 2016), história biogeográfica, filogenia, evolução e diversificação (Michener 1979; Camargo & Wittmann 1989; Costa et al. 2003; Rasmussen & Cameron 2010).

Na introdução geral farei uma breve revisão sobre a classificação, diversidade e importância das abelhas como um todo. Em seguida, será revisada, de um ponto de vista histórico, a sistemática de Meliponini. E por fim, a sistemática de *Plebeia* também é revisada. Em seguida, divido minha tese em dois capítulos, que juntos, buscam compreender a evolução do grupo aqui estudado no espaço e no tempo. O Capítulo 1 tratará da sistemática do clado *Plebeia* com ênfase no gênero *Plebeia*, discutindo os

padrões encontrados na filogenia do grupo, as propostas para sua classificação e as perspectivas futuras que surgiram a partir deste estudo. O Capítulo 2 busca estimar as datas de divergência entre os táxons do clado Plebeia e reconstruir sua história biogeográfica por meio de análises que permitem inferir as áreas ancestrais. Comentários sobre o início da história evolutiva de toda a tribo Meliponini também foram feitos.

Classificação das abelhas

As abelhas fazem parte de um grupo monofilético conhecido como Apoidea, que compõe o mesmo clado que Vespoidea, Chrysidoidea e Ichneumonoidea dentro de Hymenoptera (Sharkey 2007). Apoidea é composta pelas abelhas e pelas vespas Heterogynaidae, Crabronidae, Sphecidae e Ampulicidae (Melo 1999; Michener 2007). Todavia, há a hipótese de que Crabronidae seja a família de Apoidea mais proximamente relacionada com as abelhas, sendo suportada por vários estudos (Alexander, 1992; Melo, 1999; Ohl & Bleidorn 2006; Michener, 2007; Debevec et al. 2012).

Existem duas linhas de pensamento em relação à classificação das abelhas como um todo. Tradicionalmente, as abelhas são classificadas em sete famílias: Colletidae, Andrenidae, Halictidae, Apidae, Megachilidae, Stenotritidae e Melittidae (Michener 1944, 2007). Por outro lado, uma linha de pensamento que vem sendo discutida há mais de 30 anos sugere tratar todas as abelhas como uma única família, Apidae (ver Brothers 1999 e Melo 1999). Nela, propõe-se que as outras famílias da classificação tradicional sejam tratadas como subfamílias (Melo & Gonçalves 2005; Moure et al 2007). A proposta de englobar todas as abelhas em uma única família visa, principalmente, gerar um nome formal para todas as abelhas.

Importância das abelhas

Em um contexto ecológico global, as abelhas são os principais agentes polinizadores em todos os ecossistemas em que ocorrem. Isso se deve à alta dependência dos recursos florais para sua sobrevivência. Tem-se, então, relações que se baseiam em um sistema de dependência recíproca, no qual as plantas fornecem o alimento para as abelhas, principalmente pólen e néctar, e em troca recebem os benefícios da transferência dos grãos de pólen (Roubik 1989; Michener 2007). Devido a isso, esses insetos são peça chave na manutenção dos ecossistemas e na produção de

plantas cultivadas, sendo, portanto, importantes para a economia (Westerkamp & Gottsberger 2002; Drucker, 2004; Garófalo et al. 2012; Giannini et al. 2015). Segundo estimativas, o valor econômico da polinização no mundo supera 150 bilhões de euros (Gallai et al. 2008).

O declínio das populações de polinizadores é um dos maiores problemas da produção agrícola atual, uma vez que causa limitações na quantidade e qualidade dos frutos e no número de sementes (Roubik, 2002; De Marco & Coelho 2004; Messinger et al. 2016). Nesse sentido, estudos que buscam o conhecimento sobre a diversidade e biologia dos polinizadores tem sido uma preocupação a nível mundial, a fim de que decisões para a conservação das populações desses organismos sejam tomadas. Um fenômeno que envolve o desaparecimento das abelhas, conhecido por Colony Collapse Disorder (CCD), é o “episódio” mais recente desse processo mais geral. O declínio das populações de abelhas tem sido atribuído ao uso excessivo de defensivos agrícolas, ao desmatamento para a formação de pastagens, extração madeireira e ao crescimento das áreas urbanas (Mullin et al. 2010; Dennis & Kemp 2016).

A Tribo Meliponini

Dentre as cerca de 20.000 espécies de abelhas descritas no mundo (Michener 2007; Ascher & Pickering 2016), existe um grupo monofilético informalmente conhecido como “corbiculados” (Michener 2007; Martins et al. 2014), composto por quatro tribos de Apinae: Euglossini, constituída principalmente por espécies solitárias; Bombini, composta por espécies primitivamente eussociais; e as tribos compostas por espécies altamente eussociais, Meliponini e Apini (Michener 1974, 2007). Os corbiculados possuem como sinapomorfia a presença da corbícula, uma estrutura presente nas tíbias posteriores das fêmeas, que as utilizam para o transporte de recursos, principalmente o pólen (Michener 2007). Vários estudos tentaram inferir sobre as relações filogenéticas entre estas tribos utilizando dados morfológicos (Michener 1944; Winston & Michener 1977; Roig-Alsina & Michener 1993; Cardinal & Packer 2007), comportamentais (Noll 2000), moleculares (Madurlyn & Cameron 1999; Koulíanos et al. 1999) e dados combinados (Chavarría & Carpenter 1994). Todas as hipóteses filogenéticas baseadas em dados moleculares apontam Meliponini como grupo irmão de Bombini, apesar de haver algumas discordâncias quanto ao posicionamento de Euglossini e Apini (Danforth et al 2012; Cardinal & Packer 2007; Kawakita et al. 2008; Cardinal et al. 2010; Cardinal & Danforth 2011, 2013; Almeida & Porto 2014; Martins

et al. 2014). Em um estudo mais recente que utilizou análises filogenômicas, Euglossini aparece como grupo irmão dos demais corbiculados (Apini + (Meliponini + Bombini)), sugerindo uma única origem para a eussocialidade dentro do clado corbiculado (Romiguier et al. 2016).

As “abelhas indígenas sem ferrão” constituem o principal grupo de polinizadores em diversos ecossistemas em que ocorrem. As principais características que fazem destas abelhas polinizadores eficientes são o hábito generalista para a coleta de pólen, a constância floral, os ninhos perenes (Roubik 1989, 2006; Heard 1999), e a facilidade de domesticação, podendo ser utilizadas em cultivos abertos e, em alguns casos, em casas de vegetação (Witter et al. 2012; Bomfim et al. 2014; Giannini et al. 2015).

Todas as espécies de Meliponini são eussociais (Michener 1974, 2007). Essas abelhas podem variar muito em tamanho, podendo medir desde menos de 2 mm até pouco mais de 1 cm (Silveira et al. 2002). Algumas espécies nidificam em cavidades pré-existent e outras constroem ninhos expostos. A arquitetura interior dos ninhos varia, de forma que algumas espécies dispõem as células de cria como favos em discos regulares ou irregulares, e outras espécies que dispõem as células em cacho (Wille & Michener 1973; Roubik 1989, 2006; Michener 1961, 2007).

Meliponini tem distribuição pantropical, podendo ocorrer em algumas áreas subtropicais do Hemisfério Sul (Silveira et al. 2002; Michener 2007; Rasmussen & Cameron 2007, 2010). Segundo hipóteses recentes, Meliponini teria começado a se diversificar no Cretáceo superior, ainda que haja controvérsias entre as datações, que podem ser de cerca de 68 Ma (Martins & Melo 2016) ou entre 81 e 96 Ma (Rasmussen & Cameron 2010). Na região Neotropical são reconhecidas atualmente cerca de 420 espécies com nomes válidos, distribuídas em 32 gêneros (Camargo & Pedro 2013). Esse número foi ampliado para 33 com a descrição de *Plectoplebeia* por Melo (2016). No Brasil, somam cerca de 240 espécies com nomes válidos distribuídas em 29 gêneros (Camargo & Pedro 2013; Pedro 2014).

Sistemática de Meliponini

A sistemática de Meliponini vem sendo discutida há cerca de 70 anos na literatura, vários tratamentos foram propostos, inclusive formando táxons com representantes tanto na região Neotropical como na Afrotropical, Indo-Malaia e Austrália (Schwarz, 1948; Michener 1990, 2007; Camargo & Pedro 1992; Roig-Alsina & Michener 1993). Contudo, estudos baseados em dados moleculares nos mostram um

cenário diferente das hipóteses baseadas em caracteres morfológicos (Costa et al 2003; Rasmussen & Cameron 2007, 2010), nos quais aparece um clado composto por espécies Afrotropicais, Indo-Malaias e da Austrália (Clado do Velho Mundo), como irmão de um clado exclusivamente Neotropical (Clado do Novo Mundo). Consequentemente, houve reinterpretações sobre o posicionamento de vários gêneros, o que permitiu a sinonímia de grupos que antes estavam em posições controversas, uma vez que algumas características, principalmente as associadas à redução do tamanho, podem ser resultado de convergências evolutivas (Moure 1961).

Inicialmente, as abelhas sem ferrão foram incluídas dentro do gênero *Apis* Latreille 1802. Logo após, Latreille (1809) faz referência aos nomes *Melipona* Illiger, 1806 e *Trigona* Jurine, 1807, ainda que considerasse as abelhas sem ferrão proximamente relacionadas a *Apis*. Posteriormente, Lepeletier (1836) transferiu, pela primeira vez, as abelhas sem ferrão para um táxon à parte, que ele designou como tribo “Meliponites”. No início do século XX, foram propostas classificações em que as abelhas sem ferrão foram tratadas como uma subfamília (Meliponinae) dentro de Apidae (Buttel-Reepen 1903), ou uma família à parte (Schwarz 1938, 1948). Contudo, esses estudos foram baseados em poucos caracteres morfológicos, ou em dados biológicos. Michener (1944), em seu extenso estudo sobre a morfologia externa das abelhas, considerou a tribo Meliponini como composta por um gênero Neotropical, *Melipona*, e um gênero pantropical, *Trigona*, com o restante dos nomes disponíveis como subgênero do último. Pouco depois, Moure (1951) propôs a subfamília Meliponinae com as tribos Meliponini (gênero *Melipona*), Lestrimelittini (gênero *Lestrimelitta* Friese, 1903), e Trigonini composta pelos restante dos gêneros. Essa classificação foi alterada por Moure (1961) com a inclusão de *Lestrimelitta* na tribo Trigonini. Assim, a discussão sobre a questão de as abelhas sem ferrão constituírem uma tribo, uma subfamília ou uma família, seguiu-se até por volta do final do século XX (ver Schwarz 1938, 1948; Moure 1951, 1961; Michener 1944, 1990; Camargo & Pedro 1992).

Se olharmos a nível genérico, até a primeira metade do século XX considerava-se basicamente apenas dois gêneros para todos os Meliponini, *Melipona* e *Trigona*. Neles, vários nomes atualmente reconhecidos como gêneros, eram incluídos como subgêneros de *Trigona* (ver Schwarz, 1938, 1948), como por exemplo *Plebeia*. A partir dos trabalhos de Moure (1951, 1961), vários dos subgêneros de *Trigona* passaram ao status de gênero. Igualmente, Michener (1990) já considerou como gênero antigos

subgêneros de *Trigona*, como *Plebeia*, e manteve *Trigona* com distribuição pantropical. Em seguida, Camargo & Pedro (1992) revisaram a sistemática do grupo, e concordaram em grande parte com os estudos de Moure (1951, 1961). Por outro lado, os estudos baseados em dados moleculares permitiram reinterpretações sobre as relações dentro de Meliponini, principalmente no que se refere aos táxons até então considerados subgêneros de *Trigona* (Costa et al. 2003; Rasmussen & Cameron 2007, 2010). Consequentemente, várias relações a nível genérico propostas anteriormente, como *Nannotrigona*/*Scaptotrigona* (Moure 1951; Michener 1990), *Lisotrigona*/*Trigonisca* (Michener 1990), bem como as linhas filéticas *Tetragonisca*-*Tetragona*, *Hypotrigona* e *Plebeia* (Moure 1951; Camargo & Pedro 1992), também foram reconsideradas.

Indubitavelmente, dentre os táxons supra específicos de Meliponini, os que mais tiveram sua sistemática alterada foram aqueles da chamada linha *Plebeia* (sensu Camargo & Pedro 1992), principalmente por Moure (1951, 1961), Michener (1990, 2007) e Camargo & Pedro (1992). Por outro lado, embora Costa et al (2003) e Rasmussen & Cameron (2010) tenham nos mostrado evidências sobre o posicionamento de *Plebeia* em Meliponini, até o momento não há na literatura nenhum estudo que trate especificamente da sistemática dessas abelhas, nem tão pouco da antiga linha *Plebeia* tanto quanto do clado *Plebeia* (sensu Melo 2016).

O gênero *Plebeia* Schwarz, 1938

A taxonomia de *Plebeia* é incipiente, e as relações entre as espécies do gênero continuam incertas. Outros grupos de Meliponini atualmente reconhecidos como gêneros compartilham do mesmo problema, que é a falta de uma ampla revisão taxonômica e reconstrução das relações filogenéticas, principalmente utilizando outros caracteres que não os morfológicos, de forma a apoiar as decisões sobre a sistemática dos grupos. Por consequência desses problemas, me restrinjo neste tópico a escrever, de forma sucinta, sobre a história taxonômica de *Plebeia* de um ponto de vista cronológico, me baseando nas descrições dos autores que construíram o conhecimento sobre o gênero até os dias de hoje.

O nome *Plebeia* foi proposto por Schwarz (1938) como subgênero de *Trigona* Jurine, 1807. Schwarz (1938) comenta que esse nome teria sido escolhido, muitos anos antes, por F. E. Lutz, que não publicou seus dados. No entanto, ele não faz referências às datas, localidades dos espécimes utilizados e caracteres observados. Para a descrição de *Plebeia*, Schwarz (1938) se baseou em caracteres morfológicos dos basitarsos

posteriores e na pilosidade da tíbia posterior. Segundo o autor, esse subgênero seria composto por abelhas que possuem o basitarso posterior não tão largo como a tíbia, colocando, assim, as espécies que possuem o basitarso tão largo quanto ou mais largo que a tíbia dentro do gênero *Scaura* Schwarz, 1938. Ainda neste estudo, Schwarz transferiu *T. mosquito* Smith, 1863 e *T. minima* (Gribodo, 1893) para *Plebeia*, ficando *T. (Plebeia) mosquito* e *T. (Plebeia) minima* como as primeiras espécies incluídas neste táxon. Schwarz (1938) também comenta que, embora algumas espécies de *Plebeia* possuam integumento liso e brilhante, esta característica poderia variar dentro do subgênero, como por exemplo, em *Trigona schrottkyi* Friese, 1900, espécie que seria transferida posteriormente para *Friesella* por Moure (1946). O autor ainda discute que *Plebeia* se aproximaria de outros subgêneros que também possuem pontuação densa no integumento fosco, como *Paratrigona* Schwarz, 1938.

Plebeia foi mantido dentro de *Trigona* em outros estudos (Michener 1944; Schwarz; 1948, Wille 1979). Contudo, Moure (1951) propôs elevar seu status para gênero, colocando *Plebeia*, na ocasião, com três subgêneros: *Plebeia s. stricto*, *Friesella* e *Mourella* Schwarz, 1946. Para essa classificação, Moure se baseou nos seguintes caracteres: “rebordo pré-occipital às vezes vestigial ou faltando; célula marginal pouco alargada na base, quase fechada no ápice, ou mais ou menos aberta (*Friesella*); propódeo medianamente desenvolvido, com a área basal diferente nos três subgêneros; hâmulos, em média, 5 (*Plebeia* e *Friesella*) ou 7 (*Mourella*); a superfície bastante lisa, até mate-reticulada”. Ainda neste estudo, Moure comenta que *Plebeia* seria um grupo mais homogêneo do que *Scaura*, principalmente baseando-se nas tíbias e basitarsos posteriores. Ademais, Moure (1961) apresentou uma classificação para os Meliponini Neotropicais, na qual dividiu *Scaura* nos subgêneros *Scaura s. stricto* e *Schwarzula* Moure, 1946, e *Plebeia* em *Plebeia s. stricto*, *Friesella*, *Mourella* e *Schwarziana* Moure, 1943. Em um estudo posterior, Camargo & Moure (1988) consideraram em nível genérico, dentre outros táxons de Meliponini, *Scaura* e *Schwarzula*.

Michener (1990), em um extenso estudo sobre a classificação de Apidae, considerou *Plebeia* com quatro subgêneros (*Plebeia s. stricto*, *Scaura*, *Schwarziana* e *Nogueirapis* Moure, 1953). Dentre esses, *Nogueirapis* se destaca, pois não possui as principais características utilizadas para diagnóstico de *Plebeia*. Em *Plebeia*, a margem interna da tíbia posterior é glabra, estreita e claramente rebaixada em relação à área com quirotríquias, já em *Nogueirapis*, não há a depressão formando um degrau. Ainda que o autor tenha dito que um único caráter não deve ser utilizado para a tomada de decisões

sistemáticas, ele considera que o fato de Nogueirapis não possuir a depressão da face interna da tíbia posterior poderia ser contrastado com o estado intermediário observado em Scaura, postulando ainda que, em Nogueirapis, a ausência deste estado de carácter poderia ser uma reversão.

Logo após Michener (1990), Camargo & Pedro (1992) revisaram a sistemática de Meliponini, concordando em grande parte com Moure (1951, 1961), e reconheceram três linhas principais dentro da tribo: Tetragonisca-Tetragona, Hypotrigona e Plebeia. A linha Plebeia seria suportada novamente pelas características da borda posterior interna glabra das tíbias posteriores, formando um degrau em relação à área com quirotríquias.

Por conseguinte, a linha Plebeia ficou organizada da seguinte forma: região Neotropical - Plebeia s. stricto, Mourella, Friesella, Schwarziana, e gêneros associados, como Scaura, Melipona, Schwarzula, Partamona Schwarz 1939, Parapartamona Schwarz 1948, Nogueirapis, Nannotrigona Cockerell 1922, Scaptotrigona Moure 1942, Paratrigona Schwarz 1938 e Aparatrigona Moure 1951; e para as regiões Afrotropical, Indo-Malaia e Austrália - Meliponula Cockerell, 1934, Meliplebeia Moure, 1961, Plebeiella Moure, 1961, Apotrigona Moure, 1961, Axestotrigona Moure, 1961, Plebeina Moure, 1961 e Austroplebeia Moure 1961. Para detalhes destas relações em Plebeia e sobre as outras linhas consideradas para Meliponini, ver Camargo & Pedro (1992).

Atualmente, Plebeia (Plebeia s. stricto; ver Camargo & Pedro 1992) é um dos gêneros mais diversos entre as abelhas sem ferrão. Há 40 espécies descritas restritas à região Neotropical, com registros desde o Uruguai e Argentina até o México (Camargo & Pedro 2013). Todavia, Melo (2016) considerou Plebeia intermedia (Wille, 1960) como sinônimo júnior de Plectoplebeia nigrifacies (Friese, 1900). Além do mais, as características morfológicas de P. intermedia vêm sendo discutidas desde sua descrição (Wille 1960, 1979; Michener 1990), de forma que o nome intermedia faz referência às características intermediárias entre Plebeia e Schwarziana (Wille 1960). Contudo, Melo (2016) ressalta que ainda é necessária uma análise filogenética robusta para que a proposta do novo gênero seja reforçado, além de elucidar sobre seu posicionamento filogenético.

Os ninhos de Plebeia são construídos em cavidades pré-existent, geralmente em ocos de árvores. Algumas espécies, como P. lucii Moure, 2004, P. tica (Wille, 1969) e P. grapiuna Melo & Costa, 2009, constroem seus ninhos com as células de cria

dispostas em cacho, enquanto outras espécies, como *P. droryana* (Friesse, 1900) e *P. phrynostoma* Moure, 2004, dispõem as células de cria em favos organizados. As espécies que constroem ninhos em cacho ocupam, geralmente, cavidades menores e irregulares, enquanto as que constroem ninhos em favos ocupam cavidades maiores e frequentemente mais regulares. Em relação às espécies de *Lestrimelitta*, todas constroem ninhos com células de cria dispostas em favos regulares (Michener 2007), enquanto *Friesella* pode construir em favos regulares ou irregulares (LAO Campos, informação pessoal).

De acordo com Silveira et al (2002) e Michener (2007), as operárias de *Plebeia* podem ser caracterizadas da seguinte forma: abelhas pequenas com o integumento da cabeça e mesossoma liso e brilhante, com pontuação pilígera fina e praticamente sempre esparsa; frequentemente com áreas pigmentadas de amarelo, com algumas espécies, como por exemplo *P. grapiuna*, sem pigmentação amarela (Melo & Costa 2009); região lateral do mesepisterno com alguns pêlos simples e eretos, permeando a pilosidade plumosa; área interna da tíbia posterior com faixa marginal glabra, estreita e claramente rebaixada em relação à área com quirotríquias, o que forma um degrau ao longo da margem posterior da tíbia; margem posterior da tíbia com cerdas simples ou com poucos pêlos plumosos relativamente curtos, misturados às cerdas simples; penicilo presente; rastelo composto por cerdas rijas.

Parte das incertezas existentes no nosso conhecimento sobre a evolução do clado *Plebeia* começou a ser esclarecida por análises que utilizaram dados moleculares (Costa et al 2003; Rasmussen & Cameron 2010). Costa et al (2003) utilizaram apenas sequências parciais do gene mitocondrial 16S e já apresentaram evidências contrárias à existência da linha *Plebeia* (sensu Camargo & Pedro 1992), além de colocar *Lestrimelitta* Friese, 1903, um grupo composto por espécies cleptobiontes, como grupo irmão de *Plebeia*. Rasmussen & Cameron (2010) aumentaram o número de táxons e genes analisados e reconstruíram uma filogenia robusta para Meliponini. Nesse estudo, *Lestrimelitta* e *Friesella* Moure, 1946 aparecem entre dois clados independentes de *Plebeia*, o que caracteriza o gênero como polifilético. Todavia, tanto Costa et al (2003) quanto Rasmussen & Cameron (2010) utilizaram um número pequeno de espécies de *Plebeia* e *Lestrimelitta*, isso se considerarmos o número de espécies descritas e a área de distribuição desses gêneros.

Considerando as dúvidas acerca das relações filogenéticas dentro de *Plebeia* e gêneros relacionados, torna-se indispensável um estudo filogenético que envolva o

máximo de espécies descritas para o gênero, cobrindo toda sua área de distribuição, além dos gêneros que compõem o clado Plebeia. Dessa forma, será possível responder às questões relacionadas à evolução dessas abelhas no espaço e no tempo, além de permitir a discussão sobre uma classificação que reflita a evolução do grupo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, B.A. 1992. Na exploratory analysis of cladistic relationships within the superfamily Apoidea, with special reference to Sphecid wasps (Hymenoptera). *Journal of Hymenoptera Research*, 1(1): 25-61
- Almeida, E. A. B., Danforth, B. N. 2009. Phylogeny of Colletidae bees (Hymenoptera: Coletidae) inferred from four nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50: 290-309
- Almeida, E.A.B., Porto, D.S. 2014. Investigating eusociality in bees while trusting the uncertainty. *Sociobiology*, 61(4): 355-368
- Alvarez, L.J., Rasmussen, C., Abrahamovich, A.H. 2016. Nueva espécie de *Plebeia* Schwarz, clave para las espécies argentinas de *Plebeia* y comentários sobre *Plectoplebeia* em la Argentina (Hymenoptera: Meliponini). *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 18(1) 65-74
- Ascher J.S., Pickering J. 2016. Discover Life bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). Disponível em: <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Apoidea> (Acessado em 10/08/2016)
- Ayala, R. 1999. Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entomológica Mexicana*, 106: 1-123
- Ayala, R. 2016. Las abejas del género *Plebeia* Schwarz (Apidae: Meliponini) de Mexico. *Entomologia Mexicana*, 3: 937-942
- Bentham, F.D.J., Imperatriz-Fonseca, V.L., Velthuis, H.H.W. 1995. Biology of the stingless bee *Plebeia remota* (Holmberg). *Insectes Sociaux*, 42(1): 71-87
- Bomfim, I.G.A., Bezerra, A.D. de M., Nunes, A.C., Aragão, F.A.S., Freitas, B.M. 2014. Adaptive and foraging behavior of two stingless bee species (Apidae: Meliponini) in greenhouse mini watermelon pollination. *Sociobiology*, 61(4): 502-509
- Brothers, D.J. 1999. Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). *Zoologica Scripta*, 28(1): 233-249
- Buttel-Reepen, H.B. 1903. Die phylogenetische Entstehung des Bienenstaates, sowie Mitteilungen zur Biologie der solitaeren und sozialen Apiden. *Biologisches Centralblatt*, 23, 138 p
- Camargo, J. M. F., Moure, J. S., 1988. Notas sobre os Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) colecionados por Filippo Silvestri na Bacia do Rio da Prata. *Revista Brasileira de Entomologia*, 32(2): 293-314
- Camargo, J.M.F., Wittmann, D. 1989. Nest architecture and distribution of the primitive stingless bee, *Mourella caerullea* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae): Evidence for the origin of *Plebeia* (s. lat.) on the Gondwana continent. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 24(4): 213-229
- Camargo, J. M. F., Pedro, S. R. M., 1992. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponini (Hymenoptera, Apidae): a mini review. *Apidologie*. 23: 509-522
- Camargo, J. M. F., Pedro, S. R. M., 2007. Notas sobre a bionomia de *Trichotrigona extranea* Camargo & Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Revista Brasileira de Entomologia*, 51(1): 72-81
- Camargo, J. M. F., Pedro, S. R. M., 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D., Melo, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version*. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue> (Acessado em 10/09/2016)

- Cameron, S.A., Derr, J.N., Austin, A.D., Wooley, J.B., Wharton, R.A., 1992. The application of nucleotide sequence data to phylogeny of the Hymenoptera: a review. *Journal of Hymenoptera Research*, 1, 63–79.
- Cardinal, S., Packer, L., 2007. Phylogenetic analysis of the corbiculate Apinae based on morphology of the sting apparatus (Hymenoptera: Apidae). *Cladistics*, 23: 99–118
- Cardinal, S., Straka, J., Danforth, B. N. 2010. Comprehensive phylogeny of apid bees reveals the evolutionary origins and antiquity of the cleptoparasitism. *Proceedings of National Academy of Sciences*. 107(37): 16207-16211
- Cardinal, S., Danforth, B. N. 2011. The antiquity and evolutionary history of social behavior in bees. *PLoS ONE* 6, e21086
- Cardinal, S., Danforth, B. N. 2013. Bees diversified in the age of eudicots. *Proceedings of the Royal Society B*, 280: 20122686
- Chavarría, G., Carpenter, J. M., 1994. "Total evidence" and the evolution of highly social bees. *Cladistics*, 10: 229-259
- Costa M. A., Del Lama, M. A., Melo, G. A. R., Sheppard, W. S., 2003. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. *Apidologie*, **34**, 73-84.
- Danforth, B. N., Sipes, S., Fang, J., Brady, S. G., 2006. The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 103(41): 15118-15123
- Danforth, B. N., Cardinal, S., Praz, C., Almeida, E. A. B., Michez, D., 2012. The impact of molecular data on our understanding of bee phylogeny and evolution. *Annual Review of Entomology*, 58: 57-78
- Debevec, A.H., Cardinal, S., Danforth, B.N. 2012. Identifying the sister group to the bees: a molecular phylogeny of Aculeata with an emphasis on the superfamily Apoidea. *Zoologica Scripta*, 41(5): 527-535
- DeMarco J.P., Coelho, F.M. 2004. Services performed by the ecosystem: forest remnants influence agricultural culture's pollination and production. *Biodiversity and Conservation*, 13(7): 1245-1255
- Dennis, B., Kemp, W.P. 2016. How hives collapse: Allee effects, ecological resilience, and the honey bee. *PLoS ONE*, 11(2): e0150055
- Dowton, M., Austin, A.D., 1994. Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 9911–9915
- Drucker, A.G. 2004. Economic valuation of bee pollination services: implications for farm management and policy. p. 125-134. In: Freitas, B.M., Pereira, J.O. (Orgs). *Solitary bees: Conservation, Rearing and Management for Pollination*. Fortaleza: Imprensa Universitária, 285p
- Drumond, P.M., Zucchi, R., Oldroyd, B.P. 2000. Description of the cell provisioning and oviposition process of seven species of *Plebeia* Schwarz (Apidae, Meliponini), with note on their phylogeny and taxonomy. *Insectes Sociaux*, 47: 99-112
- Francisco, F.O., Arias, M.C. 2010. Inferences of evolutionary and ecological events that influenced the population structure of *Plebeia remota*, a stingless bee from Brazil. 2010. *Apidologie*, 41: 216-224
- Francisco, F.O., Santiago, L.R., Arias, M.C. 2013. Molecular genetic diversity in populations of the stingless bee *Plebeia remota*: A case study. *Genetic and Molecular Biology*, 36(1): 118-123

- Gallai, N., Salles, J.M., Settele, J., Vaissière, B.E. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68: 810-821
- Garófalo, C.A., Martins, C.F., Aguiar, C.M.L. Del Lama, M.A., Alves-dos-Santos, I., 2012. As abelhas solitárias e perspectivas para seu uso na polinização. P. 183-202. In: Imperatriz-Fonseca, V.L., Canhos, D.A.L., Alves, D.A., Saraiva, A.M. (Orgs). *Polinizadores do Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 488 p
- Giannini, T.C., Boff, S., Cordeiro, G.D., Cartolano Jr, E.A., Veiga, A.K., Imperatriz-Fonseca, V.L., Saraiva, A.M. 2015. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie*, 46: 209-223
- Heard, T.A. 1999. The role of stingless bees in crop pollination. *Annual Review of Entomology*, 44:183-206
- Hilário, S.D., Ribeiro, M.F., Imperatriz-Fonseca, V.L. 2012 Can climate shape flight activity patterns of *Plebeia remota* (Hymenoptera, Apidae)? *Iheringia*, 102(3): 269-276
- Hofstede, F.E., Sommeijer, M.J. 2006. Influence of environmental and colony factors on the initial commodity choice of foragers of the stingless bee *Plebeia tobagoensis* (Hymenoptera, Meliponini). *Insectes Sociaux*, 53: 258-264
- Kawakita, A., Ascher, J.S., Sota, T., Kato, M. 2008. Phylogenetic analysis of the corbiculate bee tribes based on 12 nuclear protein-coding genes (Hymenoptera: Apoidea: Apidae). *Apidologie*, 39: 163-175
- Koulianos, S., Schmid-Hempel, R., Roubik, D. W., Schmid-Hempel, P., 1999. Phylogenetic relationships within the corbiculate Apinae (Hymenoptera) and the evolution of eusociality. *Journal of Evolutionary Biology*, 12: 380-384
- Latreille, P.A. 1802. *Historie naturelle, générale et particuliere des crustacés et des insects*. Paris, 3: 467p
- Latreille, P.A. 1809. *Genera crustaceorum et insectorum: secundum ordinem naturalem in familias disposita, inconibus exemplisque plurimis explicata*. Paris, 4: 599 p
- Lecocq, T. et al. 2015. An integrative taxonomic approach to assess the status of Corsican bumblebees: implications for conservation. *Animal Conservation*, 18: 236-248
- Litman, J. R., Danforth, B. N., Eardley, C. D., Praz, C. J., 2001. Why do leafcutter bees cut leaves? New insights into the early evolution of bees. *Proceedings of the Royal Society B*, 278: 3593-3600
- Martins, A. C., Melo, G. A. R., Renner, S. S., 2014. The corbiculate bees arose from New World oil-collecting bees: Implications for the origin of pollen baskets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 80: 88-94
- Martins, A.C., Melo, G.A.R. 2016. The new world oil-collecting bees *Centris* and *Epicharis* (Hymenoptera, Apidae): molecular phylogeny and biogeographic history. *Zoologica Scripta*, 45: 22-33
- Melo, G.A.R. 1999. Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera), with emphasis on the Crabronid wasps. *Natural History Museum, University of Kansas Scientific Papers*, 14:1-55
- Melo, G.A.R., Gonçalves, R.B. Higher-level bee classifications (Hymenoptera, Apoidea, Apidae sensu lato). *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(1): 153-159
- Melo, G.A.R., Costa, M.A. 2009. A new cluster-brood building species of *Plebeia* (Hymenoptera, Apidae) from eastern Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 53(1): 77-81

- Melo, G.A.R. 2016. *Plectoplebeia*, a new Neotropical genus of stingless bees (Hymenoptera: Apidae). *Zoologia*, 33(1): e20150153
- Messinger, J., Martini, M.M., Rossi, G., Samuels, J., Lauerer, M. 2016. Successful pollination of the Neotropical crop *Solanum quitoense* by *Bombus terrestris*: behavior, efficiency and yield. *Journal of Applied Entomology*, 140: 124-134
- Michener, C. D. 1944. Comparative external morphology, phylogeny, and a classification of the bees. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 82: 151-326
- Michener, C.D. 1961. Observations on the nests and behavior of *Trigona* in Australia and New Guinea (Hymenoptera, Apidae). *American Museum Novitates*, 2026: 1-46
- Michener, C. D. 1974. *The Social behavior of the bees*. Cambridge, Harvard University Press. 404 p.
- Michener, C.D. 1979. Biogeography of the bees. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 66(3): 277-347
- Michener, C. D. 1990. Classification of the Apidae. *University of Kansas Science Bulletin*, 54: 75-153
- Michener, C. D. 2007. *The Bees of the World*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. 953 p.
- Moure, S. J. 1946. Contribuição para o conhecimento dos Meliponinae (Hymenoptera: Apoidea). *Revista Brasileira de Entomologia*, 17(3): 437-443
- Moure, J. S. 1951. Notas sobre Meliponinae (Hymenoptera - Apoidea). *Dusenía*, 2: 25-70
- Moure, J.S. 1961. A preliminary supra-specific classification of the world Meliponini bees (Hymenoptera, Apoidea). *Studia Entomologica*, 4(1-4): 181-242
- Moure, J.S. 1962. Três espécies novas de Plebeia (Plebeia) Schwarz, 1938. *Boletim da Universidade do Paraná*, 19: 1-12
- Moure, J.S., Urban, D., Melo, G.A.R. 2007. Catalogue of bees (Hymenoptera: Apidae) in the Neotropical region. Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia, xiv + 1058 p
- Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J., Ashcraft, S., Simonds, R., van Engelsdorp, D., Pettis, J.S. 2010. High levels of miticides and agrochemicals in north American apiaries: Implications for honey bee health. *PLoS ONE*, 5(3): e9754
- Noll, F. B. 2002. Behavioral phylogeny of corbiculate Apidae (Hymenoptera: Apinae), with a special reference to social behavior. *Cladistics*, 18: 137-153
- Ohl, M., Bleidorn, C. 2006. The phylogenetic position of the enigmatic wasp family Heterogynaidae based on molecular data, with description of a new, nocturnal species (Hymenoptera: Apidae). *Systematic Entomology*, 31: 321-337
- Pedro, S. 2014. The stingless bee fauna in Brazil. *Sociobiology*, 61(4): 348-354
- Purvis, A. Gittleman, J.L., Brooks, T. 2005. *Phylogeny and Conservation*. Cambridge University Press, 431p
- Rasmussen C., Cameron, S. A. 2007. A molecular phylogeny of the old world stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the non-monophyly of the large genus *Trigona*. *Systematic Entomology*, 32, 26-39.
- Rasmussen, C., Cameron, S. A. 2010. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99: 206-232
- Roig-Alsina, A., Michener, D. C. 1993. Studies of phylogeny and classification of long-tongued bees. *University of Kansas Science Bulletin*, 55: 124-162

- Romiguier, J., Cameron, S.A., Woodard, S.H., Fischman, Keller, L., Prazs, C.J. 2016. Phylogenomics controlling for base compositional bias reveals a single origin of eusociality in corbiculate bees. *Molecular Biology and Evolution*, 33(3): 670-678
- Roubik, D. W. 1989. *Ecology and Natural History of Tropical Bees*. Cambridge, University Press. 514p.
- Roubik, D.W. 2002. Feral African bees augment neotropical coffee yield. In: P. Kevan, and V. L. Imperatriz-Fonseca editors. *Pollinating Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature*. Ministry of Environment, Brasília. p. 255-266.
- Roubik, D. W. 2006. Stingless bee nesting biology. *Apidologie*, 37: 124-143
- Schachat, R.S. Mulcahy, D.G., Mendelson, J.R. 2016. Conservation threats and the phylogenetic utility of IUCN Red List ranking in *Incilus* toads. *Conservation Biology*, 30(1): 72-81
- Sharkey, M. 2007. Phylogeny and classification of Hymenoptera. *Zootaxa*, 1668: 521-548
- Schwarz, M. 1938. Stingless bees (Meliponidae) of British Guiana and some related forms. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 74: 437-508
- Schwarz, M. 1948. Stingless bees (Meliponidae) of the Western Hemisphere. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 90: 1-546
- Silveira, F.A., Melo, G.A.R. Almeida, E.A.B. 2002. *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. Belo Horizonte.
- Sinclair, E.A., Pérez-Losada, M., Crandall, K.A. 2005. Molecular phylogenetics for conservation biology. In: Purvis, A., Gittleman, J. L., Brooks, T. (Orgs). *Phylogeny and Conservation*. Cambridge University Press. 431 p
- Westerkamp, C., Gottsberger, G. 2002. The costly crop pollination crisis. pp. 57-62. In: Kevan, P.G & Imperatriz-Fonseca, V.L (Orgs). *Pollinating Bees: The Conservation Link Between Agriculture and Nature*. 336 p
- Wille, A. 1960. A new species of stingless bee (Meliponini) from Bolivia. *Revista de Biología Tropical*, 8(2): 219-223
- Wille, A., Michener, C.D. 1973. The nest architecture of stingless bees with special reference to those of Costa Rica (Hymenoptera, Apidae). *Revista de Biología Tropical*, 21: 1-278
- Wille, A. 1979. Phylogeny and relationship among the genera and subgenera of the stingless bees (Meliponinae) of the world. *Revista de Biología Tropical*, 27: 241-277
- Winston, M. L., Michener, C. D. 1977. Dual origin of highly social behavior among bees. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 74: 1135-1137
- Witter, S. Radin, B., Lisboa, B.B., Teixeira, J.S.G., Blochtein, B., Imperatriz-Fonseca, V.L. 2012. Desempenho de cultivares de morango submetidas a diferentes tipos de polinização em cultivo protegido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(1): 58-65

CAPÍTULO 1

Filogenia molecular e sistemática do gênero de abelhas sem ferrão *Plebeia* (Apidae, Meliponini)

Hugo A. Werneck

Resumo: O clado *Plebeia* é composto pelos gêneros *Plebeia*, *Lestrimelitta* e *Friesella*. Estudos baseados em morfologia consideraram *Plebeia* como um gênero monofilético. No entanto, filogenias baseadas em sequências de DNA têm considerado *Plebeia* como polifilético. No presente estudo nós testamos a monofilia de *Plebeia* a partir de uma ampla filogenia da tribo Meliponini baseada em genes nucleares (*EF-1 α* , *ArgK*, *Opsin* e *28S*) e mitocondriais (*CytB* e *16S*). Os resultados reforçam a polifilia de *Plebeia* e a monofilia de *Lestrimelitta* e *Friesella*. Foi possível reconhecer dois clados de *Plebeia* (I e II), com *Lestrimelitta* e *Friesella* entre eles (*Plebeia* I, (*Friesella*, (*Lestrimelitta* + *Plebeia* II))). As implicações para a classificação do grupo aqui estudado são discutidas. Por fim, foram feitos comentários sobre os grupos e as espécies de *Plebeia*.

INTRODUÇÃO

Meliponini é um grupo monofilético composto por espécies altamente eussociais (Michener 1974, 2007). Podem ser diferenciadas das outras abelhas corbiculadas pela redução das veias alares anteriores, ausência da aurícula, ferrão atrofiado, dentre outras características morfológicas e biológicas (Michener 1944, 1990, 2007; Wille 1983). As abelhas sem ferrão estão distribuídas em todas as áreas tropicais do mundo, com alguns registros em áreas subtropicais do Hemisfério Sul (Silveira et al. 2002; Michener 1979, 2007; Rasmussen & Cameron 2007, 2010). Na região Neotropical são reconhecidos 32 gêneros (Camargo & Pedro 2013), número que foi ampliado para 33 com a descrição de *Plectoplebeia* por Melo (2016). No Brasil, somam cerca de 240 espécies com nomes válidos, distribuídas em 29 gêneros (Camargo & Pedro 2013; Pedro 2014). Essas abelhas são importantes polinizadores nos diversos ecossistemas em que ocorrem, uma vez que possuem hábito generalista para a coleta de pólen e néctar, constância floral, ninhos perenes (Wille 1983; Roubik 1989, 2006; Heard 1999) e são fáceis de domesticar, o que permite que sejam utilizadas em cultivos abertos e em alguns casos em casas de vegetação (Witter et al. 2012; Bomfim et al. 2014; Giannini et al. 2015).

Neste capítulo nosso ponto central é o estudo das relações filogenéticas no clado *Plebeia* (sensu Melo 2016) com ênfase no gênero *Plebeia* Schwarz, 1938, a partir de sequências parciais de genes nucleares e mitocondriais. Essas abelhas exibem grande diversidade de características biológicas e comportamentais. Como resultado, há décadas inúmeras perguntas sobre sua biologia e comportamento (Bentham et al. 1995; Drummond et al. 2000; Hofstede & Sommeijer 2005; Roubik 2006; Hilário et al. 2012), e sistemática e taxonomia (Moure 1951; Michener 1990; Camargo & Pedro 1992, 2013; Ayala 1999, 2016; Melo 2016; Álvarez et al. 2016) vêm sendo feitas.

Plebeia foi inicialmente considerado como subgênero de *Trigona* Jurine, 1807 (Michener 1944; Schwarz; 1938, 1948), até Moure (1951) o considerar em nível genérico, composto por três subgêneros, *Plebeia* s. str, *Friesella* Moure 1946 e *Mourella* Schwarz, 1946. Entretanto, outros estudos baseados em caracteres morfológicos propuseram diferentes tratamentos para este táxon (Moure 1961; Michener 1990, 2007). Camargo & Pedro (1992) consideraram *Plebeia* como uma das três linhas filéticas de Meliponini (*Tetragonisca*-*Tetragona*, *Hypotrigona* e *Plebeia*), concordando em grande parte com Moure (1951, 1961). Por fim, Moure et al. (2007) deram o tratamento de gênero aos antigos subgêneros de *Plebeia*. Atualmente, esse é um dos táxons mais diversos entre as abelhas sem ferrão, com 40 espécies descritas restritas à região Neotropical (Camargo & Pedro 2013). As espécies de *Plebeia* são abelhas pequenas, o integumento da cabeça e mesossoma é liso e brilhante com pontuação pilígera fina e praticamente sempre esparsa, a maioria das espécies possuem áreas pigmentadas de amarelo, enquanto em algumas, como *P. grapiuna* Melo & Costa 2009, o integumento é escuro e sem pigmentação, a área interna da tíbia posterior possui faixa marginal glabra, estreita e claramente rebaixada em relação à área com quirotríquias, o que forma um degrau ao longo da margem posterior da tíbia, o penicilo está presente e o rastelo é composto por cerdas rijas (Michener 1990, 2007; Silveira et al. 2002).

Com o advento dos estudos filogenéticos baseados em dados moleculares, as interpretações sobre a história evolutiva das abelhas têm sido alteradas (Danforth et al. 2012). A partir disso, considerações sobre algumas relações entre gêneros de Meliponini propostas com base em dados morfológicos foram reconsideradas, como por exemplo, entre *Nannotrigona* Cockerell, 1922 e *Scaptotrigona* Moure, 1942 (Moure 1951; Michener 1990), *Lisotrigona* Moure, 1961 e *Trigonisca* Moure, 1950 (Michener 1990), bem como as linhas filéticas *Tetragonisca*-*Tetragona*, *Hypotrigona* e *Plebeia* (Moure

1951; Camargo & Pedro 1992). Não obstante, dados moleculares dão suporte de gênero para a maioria dos táxons propostos anteriormente, exceto no caso de *Plebeia*, *Scaura* Schwarz, 1938, *Leurotrigona* Moure, 1950 e *Trigona* (sensu Michener 1990, 2000), que aparecem como grupos polifiléticos ou parafiléticos (Costa et al. 2003; Rasmussen & Cameron 2007, 2010).

Costa et al. (2003) utilizaram sequências parciais do gene mitocondrial 16S, apresentando evidências contrárias à existência da linha *Plebeia* (sensu Moure 1951, 1961 e Camargo & Pedro 1992), e colocaram *Lestrimelitta* Friese, 1903, um gênero composto por espécies cleptobióticas (Sakagami et al. 1993), como grupo irmão de *Plebeia*. Posteriormente, Rasmussen & Cameron (2010) ampliaram o número de táxons e genes analisados e reconstruíram uma ampla filogenia para Meliponini. Nesse estudo, *Lestrimelitta* e *Friesella* aparecem entre dois clados independentes de *Plebeia*, o que caracteriza o gênero como polifilético. Ainda assim, tanto Costa et al. (2003) quanto Rasmussen & Cameron (2010) utilizaram um número pequeno de espécies de *Plebeia* e *Lestrimelitta*.

Apesar da antiga linha *Plebeia* (sensu Moure 1951, 1961 e Camargo & Pedro 1992) não ser suportada por dados moleculares, Melo (2016) sintetizou a linha e o clado *Plebeia* baseado em Rasmussen & Cameron (2010), de forma a facilitar a discussão sobre esse grupo (Figura 1). Contudo, até o momento, não há na literatura nenhum estudo que trate especificamente da filogenia e sistemática desse clado.

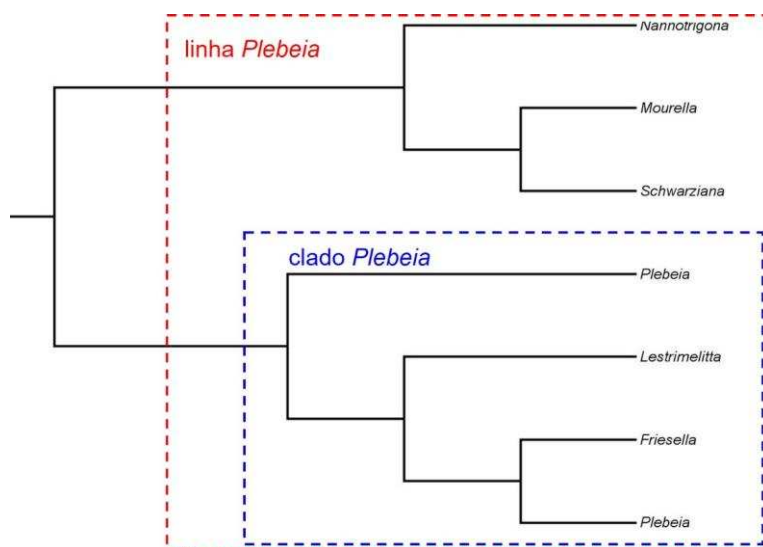


Figura 1: Linha e clado *Plebeia*. Modificado de Rasmussen & Cameron (2010) e Melo (2016).

Considerando as evidências de que *Plebeia* é um gênero polifilético ou parafilético e a falta de estudos filogenéticos específicos, no presente estudo nós testamos a monofilia de *Plebeia* a partir de uma ampla filogenia de Meliponini reconstruída baseada em genes nucleares e mitocondriais. Nós incluímos a maioria das espécies descritas para *Plebeia* cobrindo toda sua distribuição geográfica, além dos gêneros *Lestrimelitta* e *Friesella*, representando todo o clado *Plebeia*. Dessa forma foi possível confirmar *Plebeia* como um grupo não natural e discutir sobre sua sistemática.

MATERIAIS E MÉTODOS

O conjunto de dados é composto por 117 OTU's (Operational Taxonomic Unit). Nós sequenciamos 74 terminais, incluindo 28 das 40 espécies descritas para *Plebeia*, cinco espécies de *Lestrimelitta* e cinco amostras de localidades diferentes do gênero monotípico *Friesella*. Além disso, sequências depositadas no GenBank foram utilizadas para compor os grupos interno e externo (Anexo I). O grupo externo engloba 38 táxons, que juntos representam todos os grandes clados de Meliponini abrangendo toda sua distribuição geográfica (ver Costa et al. 2003; Rasmussen & Cameron 2010; Camargo & Pedro 2013). O nome de cada espécie do grupo interno incluída na matriz de dados e o local de origem de cada uma delas, são apresentados na Tabela I.

Os espécimes testemunho dos táxons que foram sequenciados no presente estudo estão depositados na Coleção Entomológica Pe. J. S. Moure do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná-UFPR e na coleção do Museu Regional de Entomologia do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa-UFV.

Tabela I: Referências acerca dos táxons terminais utilizados no grupo interno e suas respectivas localidades. *O terminal nomeado como *Plebeia pugnax* refere-se a um nomen nudum.

Voucher	Gênero	Espécie	País	Estado/Provincia	Local de coleta	Referência
143	Friesella	schrottkyi	Brasil	Minas Gerais	Viçosa	Presente estudo
158	Friesella	schrottkyi	Brasil	Paraná	Cerro Azul	Presente estudo
67	Friesella	schrottkyi	Brasil	Minas Gerais	Guimarãea	Presente estudo
147	Friesella	schrottkyi	Brasil	Espírito Santo	Santa Maria de Jetibá	Presente estudo
445	Friesella	schrottkyi	Brasil	São Paulo	-	Rasmussen & Cameron (2010)
142	Lestrimelitta	ehrharti	Brasil	Rio de Janeiro	Parque Nacional do Itatiaia	Presente estudo
141	Lestrimelitta	tropica	Brasil	Rio de Janeiro	Maria Paula – São Gonçalo	Presente estudo
144	Lestrimelitta	rufipes	Brasil	Minas Gerais	Januária	Presente estudo
40	Lestrimelitta	maracaia	Peru	San Martin	-	Rasmussen & Cameron (2010)
119	Lestrimelitta	aff. Limao	Peru	Madre de Dios	-	Rasmussen & Cameron (2010)
449	Lestrimelitta	limao	Brasil	São Paulo	-	Rasmussen & Cameron (2010)
62	Plebeia	aff. phrynostoma	Brasil	Espírito Santo	Conceição do Castelo	Presente estudo

88	Plebeia	alvarengai	Brasil	Pará	Altamira	Presente estudo
89	Plebeia	catamarcensis	Argentina	Jujuy	Parque Nacional de Calilegua	Presente estudo
90	Plebeia	cf. minima	Brasil	Rondônia	Flona do Jamari	Presente estudo
169	Plebeia	cf. minima	Brasil	Amazonas	Manaus	Presente estudo
181	Plebeia	cf. nigriceps	Brasil	Rio Grande do Sul	Canguçu	Presente estudo
73	Plebeia	cf. pugnax	Brasil	Bahia	Camacan	Presente estudo
91	Plebeia	cora	México	Jalisco	Carron de Peña	Presente estudo
09	Plebeia	droryana	Brasil	Rio de Janeiro	Silva Jardim	Presente estudo
65	Plebeia	droryana	Brasil	Minas Gerais	Guimarânea	Presente estudo
75	Plebeia	droryana	Brasil	São Paulo	Ribeirão Preto	Presente estudo
444	Plebeia	droryana	Brasil	São Paulo	-	Rasmussen & Cameron (2010)
157	Plebeia	emerina	EUA	Califórnia	-	Presente estudo
159	Plebeia	emerina	Brasil	Paraná	Lapa	Presente estudo
160	Plebeia	emerina	Brasil	Rio Grande do Sul	Porto Alegre	Presente estudo
101	Plebeia	franki	Panamá	-	-	Ramirez et al. (2010)
28	Plebeia	frontalis	Costa Rica	Heredia	San José	Presente estudo
339	Plebeia	frontalis	México	Puebla	-	Rasmussen & Cameron (2010)
92	Plebeia	frontalis	México	Chiapas	-	Presente estudo
176	Plebeia	grapiuna	Brasil	Bahia	Ilhéus	Presente estudo
36	Plebeia	jatiformis	Costa Rica	Puntaneras	-	Presente estudo
93	Plebeia	kerri	Brasil	Rondônia	Flona do Jamari	Presente estudo
86	Plebeia	lucii	Brasil	Minas Gerais	Viçosa	Presente estudo
10	Plebeia	lucii	Brasil	Rio de Janeiro	Maria Paula – São Gonçalo	Presente estudo
40	Plebeia	lucii	Brasil	Minas Gerais	Mutum	Presente estudo
146	Plebeia	lucii	Brasil	Espírito Santo	Santa Maria de Jetibá	Presente estudo
94	Plebeia	manantlensis	México	Jalisco	Talpa	Presente estudo
95	Plebeia	margaritae	Brasil	Rondônia	Flona do Jamari	Presente estudo
96	Plebeia	melanica	México	Chiapas	-	Presente estudo

81	Plebeia	minima	Brasil	Mato Grosso	Ribeirão Cascalheira	Presente estudo
086	Plebeia	minima	Peru	San Martín	-	Rasmussen & Cameron (2010)
97	Plebeia	molesta	Argentina	San Juan	-	Presente estudo
98	Plebeia	moreana	México	Colima	-	Presente estudo
99	Plebeia	moreana	México	Chiapas	-	Presente estudo
295	Plebeia	moreana	México	Chiapas	-	Rasmussen & Cameron (2010)
100	Plebeia	nigriceps	Brasil	Rio Grande do Sul	São Miguel das Missões	Presente estudo
101	Plebeia	peruvicola	Brasil	Rondônia	Flona do Jamari	Presente estudo
102	Plebeia	peruvicola	Brasil	Rondônia	Flona do Jamari	Presente estudo
103	Plebeia	peruvicola	Brasil	Acre	Serra do Divisor	Presente estudo
104	Plebeia	peruvicola	Bolívia	Santa Cruz	Buena Vista	Presente estudo
51	Plebeia	phrynostoma	Brasil	Minas Gerais	Viçosa	Presente estudo
119	Plebeia	poecilochroa	Brasil	Bahia	Salvador	Presente estudo
49	Plebeia	*pugnax	Brasil	São Paulo	São Paulo	Presente estudo
105	Plebeia	pulchra	México	Chiapas	-	Presente estudo
31	Plebeia	pulchra	Costa Rica	Esparza	Sabana Bonita	Presente estudo
54	Plebeia	remota	Brasil	Paraná	Prudentópolis	Presente estudo
56	Plebeia	remota	Brasil	Paraná	Curitiba	Presente estudo
151	Plebeia	remota	Brasil	Espírito Santo	Domingos Martins	Presente estudo
48	Plebeia	saiqui	Brasil	São Paulo	São Paulo	Presente estudo
108	Plebeia	sp.	Brasil	Ceará	Bela Cruz	Presente estudo
112	Plebeia	sp.	Brasil	Ceará	Fortaleza	Presente estudo
120	Plebeia	sp.	Brasil	Bahia	Cruz das Almas	Presente estudo
122	Plebeia	sp.	Brasil	Bahia	Presidente Tancredo Neves	Presente estudo
162	Plebeia	sp.	Brasil	Maranhão	Urbano Santos	Presente estudo
165	Plebeia	sp.	Brasil	Mato Grosso do Sul	Corumbá	Presente estudo
166	Plebeia	sp.	Brasil	Mato Grosso do Sul	Aquidauana	Presente estudo
167	Plebeia	sp.	Brasil	Mato Grosso do Sul	Aquidauana	Presente estudo
171	Plebeia	sp.	Brasil	Bahia	Itiúba	Presente estudo

173	Plebeia	sp.	Brasil	Pará	Belém	Presente estudo
155	Plebeia	sp.	Brasil	Minas Gerais	Lima Duarte	Presente estudo
577	Plebeia	sp. A	Equador	Cañar	-	Rasmussen & Cameron (2010)
43	Plebeia	sp. B	Peru	San Martín	-	Rasmussen & Cameron (2010)
104	Plebeia	sp. C	Peru	San Martín	-	Rasmussen & Cameron (2010)
179	Plebeia	sp.	Argentina	Salta	Baritú	Presente estudo
29	Plebeia	tica	Costa Rica	Santa Cruz	Centro	Presente estudo
001	Plebeia	tobagoensis	Trinidad	-	-	Rasmussen & Cameron (2010)
87	Plebeia	variicolor	Brasil	Rondônia	-	Presente estudo
180	Plebeia	wittmanni	Brasil	Rio Grande do Sul	Bento Gonçalves	Presente estudo

Extração de DNA, amplificação dos fragmentos gênicos e sequenciamento.

Todas as amostras foram conservadas em álcool absoluto e estocadas no Laboratório de Biologia Molecular de Insetos - UFV sob temperatura de -20°C. O DNA total de todas as amostras foi extraído com Kit de extração Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (cod. 69506), de acordo com o manual do fabricante.

Foram utilizados fragmentos de quatro genes nucleares (EF-1 α , ArgK, Opsin e 28S) e dois genes mitocondriais (16S e CytB). As sequências e referências bibliográficas de cada primer, bem como as condições específicas de PCR (Polymerase Chain Reaction), são apresentadas na Tabela II.

Tabela II: Sequência dos primers e condições de PCR dos fragmentos gênicos utilizados no presente estudo.

Gene	Primer	Sequência	Pareamento	Ciclos	Referência
EF-1 α	F2-ForH	5' GGRCAYAGAGATTTTCATCAAGAAC 3'	48-53°C	38	Hines et al (2006)
	F2-RevH2	5' TTGCAAAGCTTCRKGATGCATTT 3'			
ArgK	F2	5' GACAGCAARTCTCTGCTGAAGAA 3'	46-53°C	37	Kawakita et al (2008)
	R2	5' GGTYYTGGCATCGTTGTGGTAGATAC 3'			
Opsin	LWRhF	5'AATTGCTATTAYGARACNTGGGT 3'	51,9°C	35	Mardulyn & Cameron (1999)
	LWRhR	5' ATATGGAGTCCANGCCATRAACCA 3'			
28S	For28SVesp	5' AGAGAGAGTTCAAGAGTACGTG 3'	50°C	35	Hines et al (2007)
	Rev28SVesp	5' GGAACCAGCTACTAGATGG 3'			
16S	16SR1	5' TATAGATAGAAACCAATCTG 3'	56°C	35	Cameron et al (1992)
	16SWb	5' CACCTGTTTATCAAAAACAT 3'			Downton & Austin (1994)
CytB	mtD26	5' TATGTACTACCATGAGGACAAATATC 3'	54°C	35	Simon et al (1994)
	mtD28	5' ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT 3'			

Para as reações de PCR foi utilizado o Kit Invitrogen Platinum^R Taq DNA Polymerase. Todas as reações foram montadas com volume de 25 μ l para cada amostra com os seguintes reagentes e suas respectivas concentrações: 10X PCR Buffer (2,5 μ l), 10mM dNTP (0,8 μ l), 50 mM MgCl₂ (1,0 μ l), Primer 10 μ M (1,0 μ l), DNA (1 μ l com concentração de 50 ng/ μ l), Platinum Taq DNA Polymerase (0,1 μ l) e H₂O Milli-Q (19,6 μ l).

As reações de PCR iniciaram-se com um passo de desnaturação a 94°C por 1 minuto e 30 segundos, seguido de 35-38 ciclos repetitivos na seguinte ordem: desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento por 50 segundos a uma temperatura específica para cada par de iniciadores (Tabela II), alongamento das cadeias a 72°C por 1 minuto e 30 segundos e um passo final a 72°C por cinco minutos.

Para verificar a qualidade e o tamanho dos fragmentos amplificados, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a uma concentração de 1,4%, com tampão TBE 1X e corados com GelRed™ (10.000X). O marcador molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen) foi utilizado como parâmetro para verificar o tamanho dos fragmentos amplificados. Os produtos de PCR foram enviados para MacroGen Inc., Coréia do Sul para purificação e sequenciamento dos fragmentos gênicos.

Alinhamentos e análises filogenéticas

As sequências consenso das fitas forward e reverse de cada amostra foram montadas com o pacote CodonCode Aligner v.5 (Copyright 2002-2015 CodonCode Corporation). Todos os alinhamentos foram realizados no MAFFT v.7 (Kato & Standley 2013). Os fragmentos gênicos 16S, CytB, ArgK, EF-1 α e Opsin foram alinhados utilizando a estratégia G-INS-1 (Kato et al. 2005). Para o fragmento gênico 28S foi utilizada a estratégia Q-INS-i (Kato et al. 2005). Todos os alinhamentos foram avaliados visualmente e editados, quando necessário, no programa MEGA v.6 (Tamura et al. 2013).

Os conjuntos de dados foram particionados da seguinte forma: 16S, CytB e 28S foram considerados cada um como uma única partição, os fragmentos nucleares codificadores de proteínas (EF-1 α , ArgK e Opsin) foram divididos em exons e introns, de acordo com as recomendações de Tomita et al. (1996), Giribert & Wheeler (1999) e Kawakita et al. (2003). Em seguida, os dados foram concatenados em uma única matriz no programa SequenceMatrix (Vaidya et al. 2011) com a adequada delimitação das partições.

A Inferência Bayesiana (IB) foi realizada no programa MrBayes v.3.2.5 (Ronquist et al. 2012) com duas corridas independentes, cada uma com quatro cadeias. As reconstruções filogenéticas foram feitas tanto para os dados concatenados, como para cada gene individualmente. Para isso, foi implementado o modelo misto (Ronquist & Huelsenbeck 2003), com proporção de invariáveis e correção Gamma para todas as partições em todas as análises. Para as árvores geradas a partir de cada gene foram utilizadas 20.000.000 de gerações da Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC). Paralelamente, para o conjunto de dados concatenados foram utilizadas 30.000.000 de gerações. Em todas as análises as árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações da MCMC. A convergência das cadeias de Markov foi verificada no programa Tracer v.1.5 (Rambaut & Drummond, 2009), observando-se os valores finais de PSRF (Potential

Scale Reduction Factor = 1.00), que compara a variância entre as cadeias com a variância dentro de cada cadeia, além dos valores de ESS (Estimated Sample Size $\geq$ 200). Foram excluídas 25% das gerações iniciais de MCMC, o restante foi utilizado para calcular uma árvore consenso. A frequência de cada ramo no consenso de maioria representa o valor da probabilidade posterior (PP = posterior probability) da fórmula da Bayesiana. Todas as árvores foram editadas no programa FigTree v. 1.3.1 (Rambaut 2009).

Foi realizada uma análise de Máxima Verossimilhança (ML) apenas com a matriz concatenada. A reconstrução filogenética por ML foi executada no programa RAxML v8.2.7 (Stamatakis 2006), com 1.000 replicações de bootstrap (BS = bootstrap support). Os dados foram particionados da mesma forma como para a IB, com implementação do modelo GTR + G + I para todas as partições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conjunto de dados concatenado resultou em 4.112 pares de bases alinhados. O número de pares de base de cada fragmento gênico sequenciado e suas partições é apresentado na Tabela III. Nos alinhamentos dos genes EF-1 α , ArgK e Opsin as regiões de exons e introns foram identificadas e delimitadas (Tomita et al. 1996; Kawakita et al. 2003).

Tabela III: Número de pares de bases gerados para cada gene, partição e dados concatenados.

Gene	Táxons	Pares de base	Exon	Intron
EF-1 α	117	810	576	234
ArgK	115	716	557	159
Opsin	106	733	470	263
28S	117	856	-	-
16S	116	552	-	-
CytB	71	445	-	-
Dados concatenados	117	4112	-	-

Análises Filogenéticas

Todas as árvores geradas a partir dos dados concatenados, tanto por IB como por ML, recuperaram Meliponini com dois grandes clados monofiléticos com alta resolução e suporte, sendo um clado Neotropical irmão do clado do Velho Mundo (sensu Rasmussen & Cameron 2010). Trigonisca s. l. saiu como grupo irmão de todo o clado

Neotropical. O gênero *Plebeia* apareceu em dois clados independentes como um gênero polifilético (Figura 2; Anexos II e III). *Friesella* e *Lestrimelitta* foram recuperados como monofiléticos e aparecem entre os clados de *Plebeia* (Figura 2).

Foi possível identificar dois principais clados de *Plebeia*, denominados aqui como clados **I** e **II**, tanto pela IB quanto pela ML. O clado **I** é irmão de todos os outros clados que compõem o clado *Plebeia*. O clado **II** contém *Plebeia grapiuna* como irmão de dois clados menores de *Plebeia*. Dessa forma, é possível reconhecer quatro clados formando o clado *Plebeia* (*Plebeia I*, (*Friesella*, (*Lestrimelitta* + *Plebeia II*))) (Figura 2).

De forma geral, a árvore gerada por ML (Anexo III) apresenta topologia congruente com a árvore gerada por IB, o que reforça a polifilia de *Plebeia* e a monofilia de *Friesella* e *Lestrimelitta*, com alto suporte (PP = 1.00; BS $\geq$ 80). A principal diferença entre essas árvores é em relação ao posicionamento de *P. lucii* (BS = 33) e *P. emerina* (BS = 89) na árvore de ML. Além disso, as relações internas de *Lestrimelitta* (BS = 63, 91, 96, 99, 100) e o posicionamento de *P. molesta* (BS = 15) e *P. remota* (BS = 9), foram melhor resolvidos na ML. Consequentemente, devido aos baixos valores de BS na maioria dos nós da árvore de ML que discordam da IB, nós consideramos como hipótese filogenética a árvore gerada por IB com a implementação de modelo misto.

As árvores geradas para cada gene individualmente reforçam *Plebeia* como polifilético e a monofilia de *Lestrimelitta* e *Friesella*. No entanto, elas possuem uma resolução menor do que a dos dados concatenados. Apenas as árvores dos genes EF-1 α , ArgK e Opsin, recuperaram a maior parte da topologia da árvore concatenada (Anexos IV, V, VI, VII, VIII, IX).

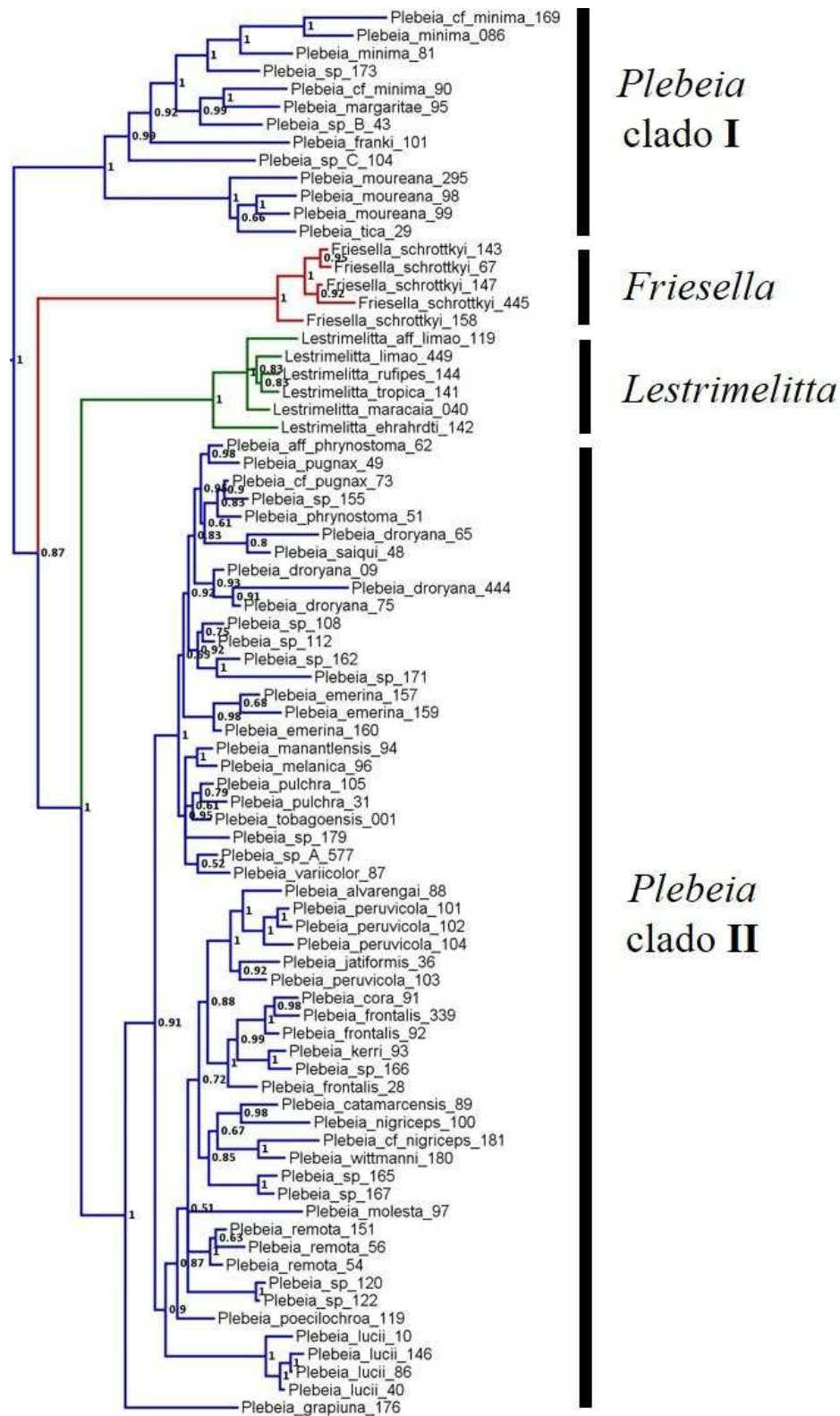


Figura 2: Inferência Bayesiana dos dados concatenados com implementação de modelos mistos. Os grupos externos foram retirados.

O entendimento sobre a filogenia e evolução das abelhas tem sido alterado ao longo dos anos com o avanço dos métodos de estudos sobre sistemática e taxonomia. Consequentemente, a partir da utilização de dados moleculares, considerações sobre a sistemática de alguns grupos de abelhas têm sido discutidas e alteradas (Almeida & Danforth 2009; Cardinal et al. 2010; Litman et al. 2011; Danforth et al. 2006; Martins et al. 2014; Martins & Melo 2016). Em Meliponini, as principais linhas filéticas (sensu Moure 1951, 1961; Camargo & Pedro 1992) foram reconsideradas, da mesma forma como os gêneros *Trigona*, *Leurotrigona*, *Scaura* e *Plebeia* foram considerados não monofiléticos em filogenias moleculares (Costa et al. 2003; Rasmussen & Cameron 2010).

O presente estudo é o primeiro a tratar especificamente das relações filogenéticas no clado *Plebeia* com ênfase no gênero *Plebeia*. Além disso, nosso conjunto de dados contém a maioria das espécies descritas para o gênero (~70%), abrange toda sua distribuição geográfica, além de ser composto por dados moleculares oriundos de genes nucleares e mitocondriais. Certamente, outros autores já salientaram o “problema *Plebeia*” e a necessidade de um estudo sobre sua sistemática (Moure 1951, 1961; Wille 1979; Michener 1990, 2007; Camargo & Pedro 1992; Costa et al. 2003; Rasmussen & Cameron 2010; Melo 2016). Dessa forma, nossos resultados contribuem para novas discussões a respeito da filogenia e evolução do clado *Plebeia*.

Implicações para a sistemática do clado *Plebeia*

As análises de IB dos dados concatenados conduzidas no presente estudo, sugerem alterações na classificação do grupo aqui estudado, diferem significativamente dos estudos baseados em caracteres morfológicos (Moure 1951, 1961; Wille 1979; Michener 1990, 2007; Camargo & Pedro 1992), e concordam, em parte, com outros estudos baseados em dados moleculares (Costa et al. 2003; Rasmussen & Cameron 2010).

A topologia geral de Meliponini foi recuperada de acordo com hipóteses baseadas em dados moleculares confirmando o posicionamento do clado *Plebeia* (Rasmussen & Cameron 2010; Melo 2016). As principais diferenças entre nossos dados e os de Rasmussen & Cameron (2010) são em relação ao posicionamento dos gêneros *Lestrimelitta* e *Friesella* e ao número de táxons e genes utilizados. Os resultados deles colocam o clado **I** de *Plebeia* como grupo irmão de *Lestrimelitta* e *Friesella* + clado **II**,

enquanto nossos dados mostram *Lestrimelitta* como grupo irmão do clado **II** (PP = 1.00; BS = 84).

Lestrimelitta foi recuperado como monofilético. Esse gênero é todo composto por espécies cleptobiontes (Sakagami et al. 1993; Michener 2007). Provavelmente, em decorrência do hábito parasítico, houve a perda da corbícula e de grande parte da pilosidade do corpo. O hábito cleptobionte em Meliponini é documentado apenas para o gênero *Lestrimelitta* da região Neotropical e para o gênero africano *Cleptotrigona* Moure, 1961 (Eardley 2004), embora Camargo & Pedro (2007) sugeriram que *Trichotrigona extranea* Camargo & Moure, 1983 possivelmente seja parasita social de *Frieselomelitta* Ihering, 1912. Apesar de haver grande diferença entre a morfologia e o comportamento de *Lestrimelitta* e das outras espécies do clado *Plebeia*, existe suporte morfológico, como a borda posterior interna das tíbias posteriores das operárias (ver Costa et al. 2003: 81). Aqui nós ampliamos o número de espécies de *Lestrimelitta* e *Plebeia*, o que permitiu reforçar esta relação filogenética. Marchi & Melo (2006) revisaram as espécies brasileiras de *Lestrimelitta* e apresentaram uma chave taxonômica para o gênero.

Friesella também foi recuperado como monofilético. Esse gênero se distingue de *Plebeia* pela pontuação do tórax e cabeça, veias das asas, entre outros caracteres (Moure 1946). No entanto, nossa topologia apresenta dois clados (PP = 1.00; BS = 98), sendo um formado por *F. schrottkyi* 143 (Viçosa, MG) e *F. schrottkyi* (Guimarânea, MG), e outro clado formado por *F. schro+...66ttkyi* (Santa Maria de Jetibá, ES) e *F. schrottkyi* 445 (São Paulo, SP), além de *F. schrottkyi* 158 (Cerro Azul, PR) que é irmão dos dois primeiros clados mencionados (PP = 1.00; BS = 100). Baseado no tamanho dos ramos e o alto suporte dos nós que dividem esses terminais, fica evidente a necessidade de uma revisão morfológica bem como um estudo filogeográfico que amostrasse um maior número de espécimes de distintas populações, para que dessa forma sejam elucidadas as relações evolutivas entre as populações desse gênero monotípico.

A partir dos nossos resultados e de estudos anteriores (Costa et al. 2003; Rasmussen & Cameron 2010), podemos concluir que os caracteres morfológicos antes considerados como sinapomorfias de *Plebeia*, principalmente por Moure (1951, 1961), Silveira et al. (2002) e Michener (1990, 2007), não são congruentes com as hipóteses filogenéticas baseadas em dados moleculares, o que demanda uma ampla revisão taxonômica que inclua *Plebeia*, *Lestrimelitta* e *Friesella*.

Existem alternativas para a classificação do clado *Plebeia*?

Plebeia não é um gênero monofilético e a necessidade de mudanças na sua classificação fica evidente. Sendo assim, mesmo que nós não tenhamos proposto caracteres morfológicos que diferenciem os clados **I** e **II**, é possível que já se sugira um cenário alternativo para a classificação do gênero.

A espécie tipo de *Plebeia*, *P. mosquito* (Smith, 1863), não está incluída em nossa matriz. Esta espécie é da região sudeste do Brasil, seu tipo ainda não foi reestudado e vários espécimes distintos têm sido identificados sob este nome (Camargo & Pedro 2013). No entanto, o terminal aqui identificado como *Plebeia pugnax* nom. nud., provavelmente corresponde a *P. mosquito* (GAR Melo, informação pessoal). Por outro lado, todas as espécies dos grupos *minima* e *moireana* (clado **I**) ocorrem no bioma amazônico, na América Central e no México. Dessa forma, nós consideramos que o clado **II** contém os táxons que correspondem à descrição original de *Plebeia*.

A primeira alternativa para a classificação do gênero seria que, todo o clado **I** fosse transferido para um novo nome a nível genérico. Isso baseado, principalmente, na hipótese de que a espécie tipo pertença ao clado **II**. Uma conveniência dessa alternativa é que manteríamos *Lestrimelitta* e *Friesella* com status de gênero, evitando transtornos em relação aos nomes atribuídos a táxons que possuem morfologia e biologia tão distintas.

A segunda alternativa seria sinonimizar *Lestrimelitta* e *Friesella* como subgêneros de *Plebeia*. Contudo, devido às características biológicas e morfológicas específicas de *Lestrimelitta* (Sakagami et al. 1993; Michener 1990, 2007), essa última alternativa não é considerada conveniente.

Portanto, ainda são necessários estudos que revisem a morfologia de todo o grupo aqui estudado, com o objetivo de propor caracteres que permitam a diferenciação entre os clados **I** e **II** de *Plebeia*, principalmente utilizando técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), além de dissecções e clareamento do exoesqueleto para análises da morfologia interna (Porto et al. 2016).

Comentários sobre as espécies de *Plebeia*

Com exceção de *Plebeia grapiuna*, *P. lucii*, *P. poecilochroa*, *P. molesta* e *P. remota*, que saem em politomia, o gênero *Plebeia* pode ser dividido em seis grupos monofiléticos (Figura 3). Dessa maneira, podemos discutir esses grupos separadamente, fornecendo informações sobre as espécies que os compõe.

Clado I

grupo **minima**

Em nossa topologia esse grupo é formado por *P. minima*, *P. margaritae*, *P. franki* e três terminais ainda não identificados. Espécies distintas têm sido identificadas sob o nome *P. minima* (Camargo & Pedro 2013). Provavelmente, esse grupo é amplamente distribuído no bioma amazônico, podendo algumas espécies, como *P. franki*, chegar até ao sul da América Central. *Plebeia minima* e *P. franki* constroem as células de cria em cacho. Aspectos biológicos de *P. margaritae* ainda são desconhecidos, porém, essa espécie pode ser diferenciada de *P. minima* pelo tamanho discretamente menor, área malar linear e manchas amarelas reduzidas (Moure 1962).

grupo **moureana**

No presente estudo é composto por *P. moureana* e *P. tica*. Ocorre da Costa Rica ao México. Os terminais desse grupo são do México, de Colima e Chiapas (*P. moureana*), e de Santa Cruz na Costa Rica (*P. tica*). *Plebeia moureana* é a menor espécie de *Plebeia* do México e se destaca das outras por possuir o integumento finamente granuloso, ao contrário de liso como na maioria das espécies de *Plebeia* (Ayala 1999, 2016). *Plebeia tica* é facilmente diferenciada de outras espécies pelo seu tamanho e marcas esbranquiçadas, principalmente nas axilas (Wille 1969). As duas espécies constroem suas células de cria em cacho (*P. tica*, IA Monge, informação pessoal; *P. moureana*, R Ayala, informação pessoal).

Clado II

grupo **droryana**

É composto no presente estudo por *P. droryana*, *P. phrynostoma*, *P. saiqui*, *P. pugnax*, *P. emerina* e sete terminais com identificação ainda não confirmada. *Plebeia pugnax*, como mencionado anteriormente, é um nome não descrito formalmente (*nomen nudum*) e provavelmente corresponde a *P. mosquito* (GAR Melo, informação pessoal). Todas as espécies conhecidas desse grupo constroem suas células de cria em favo.

Vários espécimes têm sido identificados como *P. droryana*. Inclusive, em nossa árvore, os quatro terminais identificados como *P. droryana* saem em posições distintas, principalmente *P. droryana* 65 (Guimarães, MG). *Plebeia phrynostoma* e *P. saiqui* são espécies facilmente distinguidas do que é considerado como *P. droryana* e das outras espécies desse grupo. *Plebeia phrynostoma* foi descrita do ES, são abelhas pequenas e se destacam da maioria das espécies de *Plebeia* pela agressividade das operárias campeiras (Moure 2004). *Plebeia saiqui*, juntamente com *P. malaris* Moure, 1962, possui a área malar bem desenvolvida em relação às outras espécies de *Plebeia* (Moure 1962).

Dos três terminais de *Plebeia emerina* dois são do sul do Brasil, Paraná (cód. 159) e Rio Grande do Sul (cód. 160). O terminal *P. emerina* 157 é proveniente de indivíduos coletados em um ninho localizado na Califórnia-EUA, que provavelmente é descendente de alguma colônia que foi levada para aquele país, não constituindo uma espécie natural de lá.

grupo **variicolor**

Grupo aqui formado por *P. variicolor*, *P. manantlensis*, *P. melanica*, *P. pulchra*, *P. tobagoensis* e dois terminais ainda não identificados. Suas espécies ocorrem no México (*P. pulchra*, *P. manantlensis* e *P. melanica*), na Amazônia (*P. variicolor*, Brasil e Peru), Equador (*Plebeia* sp. A 577), no norte da Argentina (*Plebeia* sp. 179) e em Trinidad e Tobago (*P. tobagoensis*). Ayala (2016) considera *P. manantlensis* e *P. melanica* proximamente relacionadas a *P. fulvopilosa* Ayala, 1999. No entanto, Ayala não discute o posicionamento de *P. pulchra* e *P. variicolor*. Dados sobre a biologia e os ninhos destas espécies ainda são escassos na literatura. Com exceção de *P. variicolor*, que não há informações sobre a arquitetura dos ninhos, todas as outras espécies constroem as células de cria em favos (*P. manantlensis*, *P. melanica*, *P. pulchra*: R Ayala, informação pessoal; *P. tobagoensis*: MJ Sommeijer, informação pessoal).

grupo **nigriceps**

Composto por três espécies descritas (*P. catamarcensis*, *P. nigriceps* e *P. wittmanni*) e dois terminais ainda não identificados. Este grupo é restrito ao sul da região Neotropical (Argentina, sul do Brasil e Mato Grosso do Sul). *Plebeia nigriceps*, *P. wittmanni* e *P. julianii* Moure, 1962, também aparecem proximamente relacionadas no estudo de Costa et al. (2003). Para Camargo & Moure (1988), provavelmente *P. julianii* corresponde a *P. nigriceps*. Todas as espécies conhecidas deste grupo constroem as células de cria em favos (*P. nigriceps* e *P. julianii*: Witter et al. 2007; *P. wittmanni*:

Wittmann 1989; *P. catamarcensis*: M Bernasconi, informação pessoal). *Plebeia nigriceps* e *P. julianii* constroem seus ninhos em cavidades pré-existentes, como em moirões de cerca ou ocos em árvores, enquanto *P. wittmanni* nidifica em espaços entre rochas (Wittmann 1989).

grupo **frontalis**

Esse grupo é formado no presente estudo por cinco espécies descritas: *P. frontalis*, *P. jatiformis*, *P. kerri*, *P. peruvicola* e *P. alvarengai*, e um terminal ainda não identificado, *P. sp.* 166. A distribuição geográfica desse grupo provavelmente se estende do bioma Amazônico até a Costa Rica e México. Duas das espécies descritas aparecem em mais de uma posição em nossa topologia, *P. frontalis* e *P. peruvicola*. Os terminais de *P. peruvicola* (códigos 101, 102 e 104) saíram muito proximamente relacionados à espécie do norte brasileiro (Pará), *P. alvarengai*. Essa proximidade filogenética já foi considerada por Moure (1994) quando descreveu *peruvicola* como subespécie de *P. alvarengai*, que foi considerada como uma espécie distinta por Moure et al. (2007). A biologia e arquitetura dos ninhos das espécies desse grupo ainda são desconhecidas. As informações existentes são apenas para *P. jatiformis* e *P. frontalis*, que constroem as células de cria dispostas em favos (IA Monge, informação pessoal).

Plebeia grapiuna

Melo & Costa (2009) descreveram esta espécie a partir de quatro ninhos, dois encontrados no campus da Universidade Estadual de Santa Cruz em Ilhéus e dois em Camacan, Bahia. Todos os quatro ninhos foram encontrados estabelecidos em *Samanea inopinata* (Mimosaceae). Essas abelhas constroem as células de cria em cacho e dados sobre sua biologia ainda são escassos na literatura. Não há registros dessa espécie fora das áreas descritas no estudo de Melo & Costa (2009).

Plebeia lucii

Plebeia lucii foi descrita por Moure (2004) a partir de colônias mantidas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa-UFV. Essas abelhas eram identificadas, como várias outras espécies de *Plebeia* de pequeno tamanho e que constroem suas células de cria em cacho, como *P. minima* (LAO Campos, informação pessoal). O nome *lucii* é em homenagem ao Professor Lucio A. O. Campos (UFV), quem forneceu o material para o Pe. JS Moure estudar. O conhecimento sobre a biologia destas abelhas ainda é escasso na literatura.

Plebeia molesta

Plebeia molesta é descrita da Argentina. Moure & Camargo (1989) a consideraram proximamente relacionada a *P. wittimanni*, embora eles tenham discutido que *P. molesta* seja mais densamente branco pilosa, os ocelos posteriores sejam mais separados entre si e o clipeo mais liso e brilhante. Aspectos biológicos de *P. molesta* ainda são desconhecidos, as informações disponíveis são apenas sobre a disposição das células de cria em favos (M Bernasconi, informação pessoal).

Plebeia poecilochroa

Plebeia poecilochroa Moure & Camargo 1993 é descrita de Guarapari, Espírito Santo e no presente estudo foi coletada em Salvador-BA. É uma abelha de maior tamanho e constrói suas células de cria em favos organizados ou em espiral, outros dados biológicos são apresentados por Drumond et al. (1995).

Plebeia remota

Plebeia remota é representada aqui por três terminais coletados em Prudentópolis (PR), Curitiba (PR) e Domingos Martins (ES). A distribuição de *P. remota* abrange o sul e sudeste do Brasil, Bolívia (Camargo & Pedro 2013), e recentemente foi registrada para a província de Misiones na Argentina (Alvarez et al. 2016).

Baseado em nossos resultados, este grupo necessita de revisão taxonômica, o que é reforçado por análises realizadas com marcadores moleculares, hidrocarbonetos cuticulares e morfometria (Francisco et al. 2008). O terminal coletado em Prudentópolis aparece com alto suporte (PP = 1.00; BS = 98) como grupo irmão dos demais terminais. Estudos anteriores já salientaram essa distância entre populações de *P. remota* de Prudentópolis e de Curitiba (Francisco & Arias 2010; Francisco et al. 2013). Dados sobre a biologia de *P. remota* é apresentado em Benthem et al. (1995)

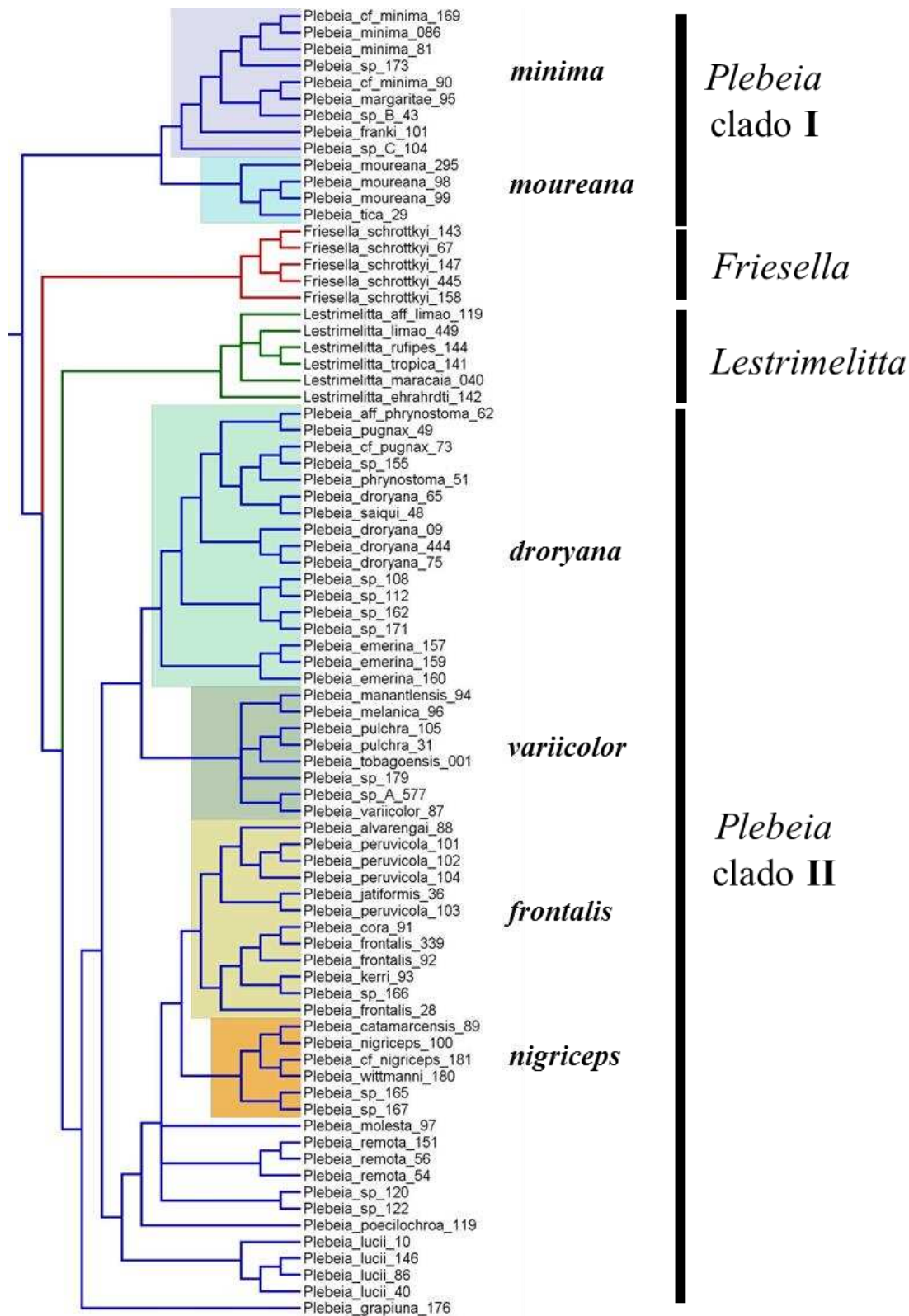


Figura 3: Resumo das relações filogenéticas do clado *Plebeia* com a delimitação dos grupos considerados no presente estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, E.A.B., Danforth, B.N., 2009. Phylogeny of Colletidae bees (Hymenoptera: Coletidae) inferred from four nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50: 290-309
- Alvarez, L.J., Rasmussen, C., Abrahamovich, A.H., 2016. Nueva espécie de *Plebeia* Schwarz, clave para las espécies argentinas de *Plebeia* y comentários sobre *Plectoplebeia* em la Argentina (Hymenoptera: Meliponini). *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 18(1) 65-74
- Ayala, R., 1999. Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entomológica Mexicana*, 106: 1-123
- Ayala, R., 2016. Las abejas del género *Plebeia* Schwarz (Apidae: Meliponini) de Mexico. *Entomologia Mexicana*, 3: 937-942
- Bentham, F.D.J., Imperatriz-Fonseca, V.L., Velthuis, H.H.W., 1995. Biology of the stingless bee *Plebeia remota* (Holmberg). *Insectes Sociaux*, 42(1): 71-87
- Bomfim, I.G.A., Bezerra, A.D. de M., Nunes, A.C., Aragão, F.A.S., Freitas, B.M., 2014. Adaptive and foraging behavior of two stingless bee species (Apidae: Meliponini) in greenhouse mini watermelon pollination. *Sociobiology*, 61(4): 502-509
- Camargo, J.M.F., Moure, J.S., 1988. Notas sobre os Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) colecionados por Filippo Silvestri na Bacia do Rio da Prata. *Revista Brasileira de Entomologia*, 32(2): 293-314
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M., 1992. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponini (Hymenoptera, Apidae): a mini review. *Apidologie*. 23: 509-522
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M., 2007. Notas sobre a bionomia de *Trichotrigona extranea* Camargo & Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Revista Brasileira de Entomologia*, 51(1): 72-81
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M., 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D., Melo, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version*. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acessado em 02/09/2016
- Cameron, S.A., Derr, J.N., Austin, A.D., Wooley, J.B., Wharton, R.A., 1992. The application of nucleotide sequence data to phylogeny of the Hymenoptera: a review. *Journal of Hymenoptera Research*, 1, 63–79
- Cardinal, S., Straka, J., Danforth, B. N., 2010. Comprehensive phylogeny of apid bees reveals the evolutionary origins and antiquity of the cleptoparasitism. *Proceedings of National Academy of Sciences*. 107(37): 16207-16211
- Costa M.A., Del Lama, M.A., Melo, G.A.R., Sheppard, W.S., 2003. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Melipononi) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. *Apidologie*., 34, 73-84
- Danforth, B.N., Sipes, S., Fang, J., Brady, S.G., 2006. The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *Proceedings of National Academy of Sciences*. 103(41): 15118-15123
- Danforth, B. N., Cardinal, S., Praz, C., Almeida, E. A. B., Michez, D., 2012. The impact of molecular data on our understanding of bee phylogeny and evolution. *Annual Review of Entomology*, 58: 57-78
- Dowton, M., Austin, A.D., 1994. Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 9911–9915

- Drumond, P.M., Zucchi, R., Oldroyd, B.P., 2000. Description of the cell provisioning and oviposition process of seven species of *Plebeia* Schwarz (Apidae, Meliponini), with note on their phylogeny and taxonomy. *Insectes Sociaux*, 47: 99-112
- Eardley, C.D., 2004. Taxonomic revision of the African stingless bees (Apoidea: Apidae: Apinae: Meliponini). *African Plant Protection*, 10: 63-96
- Giannini, T.C., Boff, S., Cordeiro, G.D., Cartolano Jr, E.A., Veiga, A.K., Imperatriz-Fonseca, V.L., Saraiva, A.M. 2015. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie*, 46: 209-223
- Giribert, G., Wheeler, W.C., 1999. On gaps. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13(1): 132-143
- Heard, T.A., 1999. The role of stingless bees in crop pollination. *Annual Review of Entomology*, 44:183-206
- Hilario, S.D., Ribeiro, M.F., Imperatriz-Fonseca, V.L., 2012 Can climate shape flight activity patterns of *Plebeia remota* (Hymenoptera, Apidae)? *Iheringia*, 102(3): 269-276
- Hines, H.M., Cameron, S.A., Williams, P.H., 2006. Molecular phylogeny of the bumblebee subgenus *Pyrobombus* (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*) with insights into gene utility for lower-level analysis. *Invertebrate Systematics*, 20: 289-303
- Hines, H.M., Hunt, J.H., O'Connor, T.K., Gillespie, J.J., Cameron, S.A., 2007. Multigene phylogeny reveals eusociality evolved twice in vespid wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 3295-3299
- Hofstede, F.E., Sommeijer, M.J., 2006. Influence of environmental and colony factors on the initial commodity choice of foragers of the stingless bee *Plebeia tobagoensis* (Hymenoptera, Meliponini). *Insectes Sociaux*, 53: 258-264
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., Miyata, T., 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, 33:511–518
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, Advance Acces, 1-9
- Kawakita, A., Sota, T., Ascher, J.S., Ito, M., Tanaka, H., Kato, M., 2003. Evolution and phylogenetics utility of alignment gaps within intron sequences of three nuclear genes in bumble bees (*Bombus*). *Molecular Biology and Evolution*, 20(1): 87-92
- Kawakita, A., Ascher, J.S., Sota, T., Kato, M., Roubik, D.W., 2008. Phylogenetics analysis of the corbiculate bee tribes based on 12 nuclear protein-coding genes (Hymenoptera: Apoidea: Apidae). *Apidologie*, 39: 163-175
- Litman, J.R., Danforth, B.N., Eardley, C.D., Praz, C.J., 2011. Why do leafcutter bees cut leaves? New insights into the early evolution of bees. *Proceedings of the Royal Society B*, 278: 3593-3600
- Madurlyn, P., Cameron, S.A., 1999. The major Opsin in bees (Insecta: Hymenoptera): A promising nuclear gene for higher level phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12(2): 168-176
- Marchi, P., Melo, G.A.R., 2006. Revisão taxonômica das espécies brasileiras de abelhas do gênero *Lestrimelitta* Friese (Hymenoptera, Apidae, Meliponina). *Revista Brasileira de Entomologia*, 50(1): 6-30
- Martins, A.C., Melo, G.A.R., Renner, S.S., 2014. The corbiculate bees arose from New World oil-collecting bees: Implications for the origin of pollen baskets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 80: 88-94

- Martins, A.C., Melo, G.A.R. 2016. The New World oil-collecting bees *Centris* and *Epicharis* (Hymenoptera, Apidae): molecular phylogeny and biogeographic history. *Zoologica Scripta*, 45: 22-33
- Mayr, E., 1969. Principles of systematic zoology. McGraw-Hill, 428 p
- Melo, G.A.R., Gonçalves, R.B., 2005. Higher-level bee classifications (Hymenoptera, Apoidea, Apidae sensu lato). *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(1): 153-159
- Melo, G.A.R. Costa, M.A., 2009. A new cluster-brood building species of *Plebeia* (Hymenoptera, Apidae) from eastern Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 53(1): 77-81
- Melo, G.A.R., 2016. *Plectoplebeia*, a new Neotropical genus of stingless bees (Hymenoptera: Apidae). *Zoologia*, 33(1): e20150153
- Michener, C.D., 1944. Comparative external morphology, phylogeny, and a classification of the bees. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 82: 151-326
- Michener, C.D., 1974. The Social behavior of the bees. Cambridge, Harvard University Press. 404 p
- Michener, C.D., 1979. Biogeography of the bees. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 66(3): 277-347
- Michener, C.D., 1990. Classification of the Apidae. *University of Kansas Science Bulletin*, 54: 75-153
- Michener, C.D., 2007. The Bees of the World. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. 953 p
- Moure, S.J., 1946. Contribuição para o conhecimento dos Meliponinae (Hymenoptera: Apoidea). *Revista Brasileira de Entomologia*, 17(3): 437-443
- Moure, J.S., 1951. Notas sobre Meliponinae (Hymenoptera - Apoidea). *Dusenya*, 2: 25-70
- Moure, J.S., 1961. A preliminary supra-specific classification of the world Meliponini bees (Hymenoptera, Apoidea). *Studia Entomologica*, 4(1-4): 181-242
- Moure, J.S., 1962. Três espécies novas de *Plebeia* (*Plebeia*) Schwarz, 1938. *Boletim da Universidade do Paraná*, 19: 1-12
- Moure, J.S., Camargo, J.M.F., 1989. *Plebeia wittmanni*, uma nova espécie de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 24(1): 15-16
- Moure, J.S., 1994. Uma espécie e uma subespécie novas de Trigonini do oeste da Amazônia (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 11(2): 257-259
- Moure, J.S., Urban, D., Melo, G.A.R., 2007. Catalogue of bees (Hymenoptera: Apidae) in the Neotropical region. Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia, xiv + 1058 p
- Noll, F.B., 2002. Behavioral phylogeny of corbiculate Apidae (Hymenoptera: Apinae), with a special reference to social behavior. *Cladistics*, 18: 137-153
- Pedro, S., 2014. The stingless bee fauna in Brazil. *Sociobiology*, 61(4): 348-354
- Porto, D.S., Melo, G.A.R., Almeida, E.A.B., 2016. Clearing and dissecting insects for internal skeletal morphological research with particular reference to bees. *Revista Brasileira de Entomologia*, 60:109-113
- Rambaut, A., 2009. FigTree, Version 1.3.1. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rambaut, A., Drummond, A., 2009. Tracer, Version 1.5. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>

- Ramirez, S.R., Nieh, J.C., Quental, T.B., Roubik, D.W., Imperatriz-Fonseca, V.L.I., Pierce, N.E., 2010. A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56: 519-525
- Rasmusen C., Cameron, S.A., 2007. A molecular phylogeny of the old world stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the non-monophyly of the large genus *Trigona*. *Systematic Entomology*, 32, 26-39
- Rasmussen, C., Cameron, S.A., 2010. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99: 206-232
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12): 1572-1574
- Ronquist, F., et al., 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. *Systematic Biology*, 16: 1-4
- Roubik, D.W., 1989. *Ecology and Natural History of Tropical Bees*. Cambridge, University Press. 514p
- Roubik, D.W., 2006. Stingless bee nesting biology. *Apidologie*, 37: 124-143
- Sakagami, S.F., Roubik, D.W., Zucchi, R., 1993. Ethology of the robber stingless bee, *Lestrimelitta limao* (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 21(3): 237-277
- Schwarz, M., 1938. Stingless bees (Meliponidae) of British Guiana and some related forms. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 74: 437-508
- Schwarz, M., 1948. Stingless bees (Meliponidae) of the Western Hemisphere. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 90: 1-546
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H.L., Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reactions primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6): 651-701
- Silveira F.A., Melo, G.A.R., Almeida, E.A.B., 2002. *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. Belo Horizonte
- Stamatakis, A., 2006. RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22: 2688-2690
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729
- Tomita, M., Shimizu, N., Brutlag, D.L., 1996. Introns and Reading frames: correlation between splicing sites and their codon positions. *Molecular Biology and Evolution*, 13(9): 1219-1223
- Vaidya, G., Lohman, D.J., Meier, R., 2011. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, 27: 171-180
- Wille, A., 1969. A new species of stingless bee *Trigona* (Plebeia) from Costa Rica, with descriptions of its general behavior and cluster-type nest. *Revista de Biología Tropical*, 15(2): 299-313
- Wille, A., 1979. Phylogeny and relationship among the genera and subgenera of the stingless bees (Meliponinae) of the world. *Revista de Biología Tropical*, 27: 241-277
- Wille, A., 1983. Biology of stingless bees. *Annual Review of Entomology*, 28:41-64
- Witter, S., Blochtein, B., Andrade, F., Wolff, L.F., Imperatriz-Fonseca, V.L., 2007. *Meliponicultura no Rio Grande do Sul: contribuição sobre a biologia e*

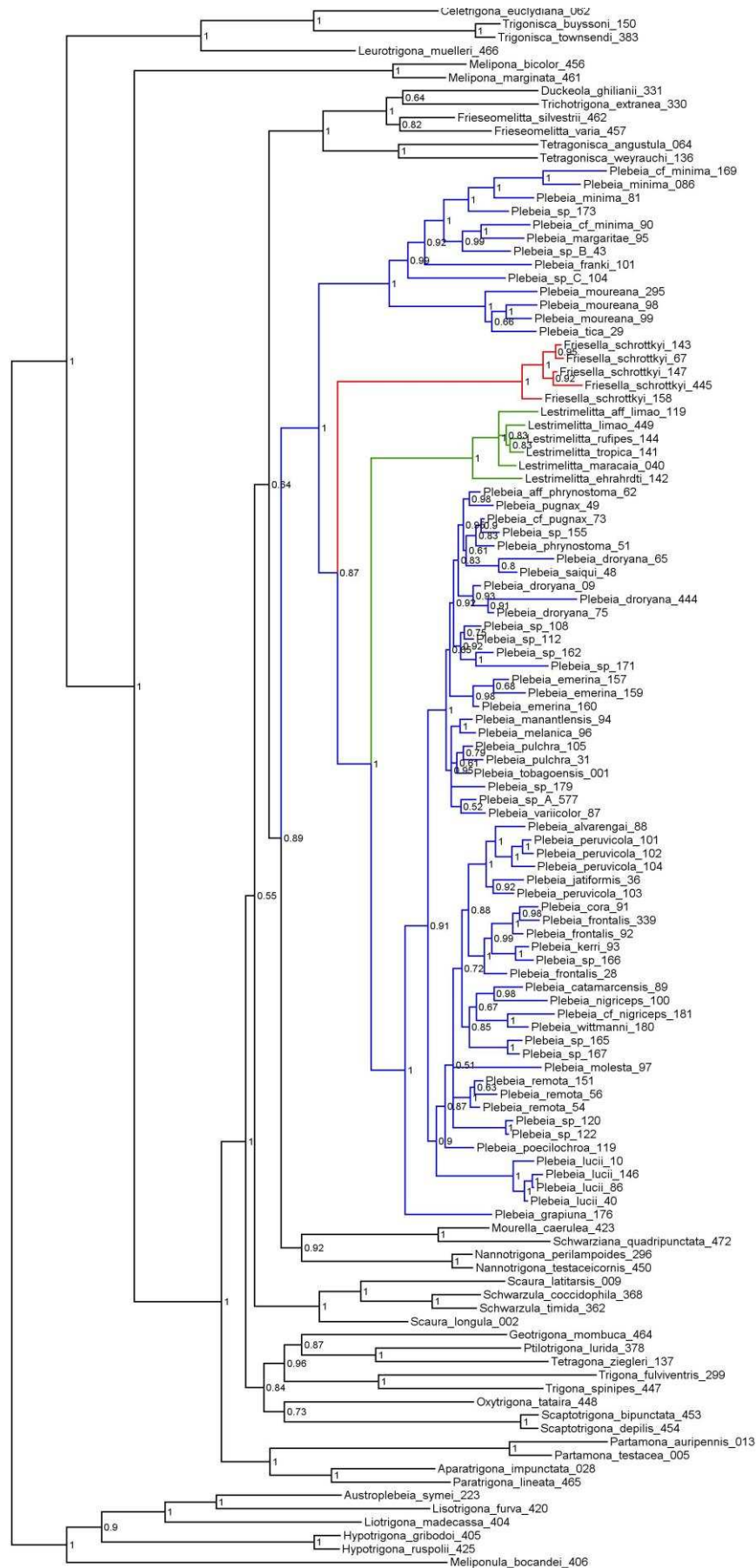
- conservação de *Plebeia nigriceps* (Friese 1901) (Apidae, Meliponini). *Bioscience Journal*, 23(1): 134-140
- Witter, S. Radin, B., Lisboa, B.B., Teixeira, J.S.G., Blochtein, B., Imperatriz-Fonseca, V.L., 2012. Desempenho de cultivares de morango submetidas a diferentes tipos de polinização em cultivo protegido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(1): 58-65
- Wittmann, D., 1989. Nest architecture, nest site preferences and distribution of *Plebeia wittmanni* (Moure & Camargo, 1989) in Rio Grande do Sul, Brazil (Apidae: Meliponinae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 24(1): 17-23

ANEXOS

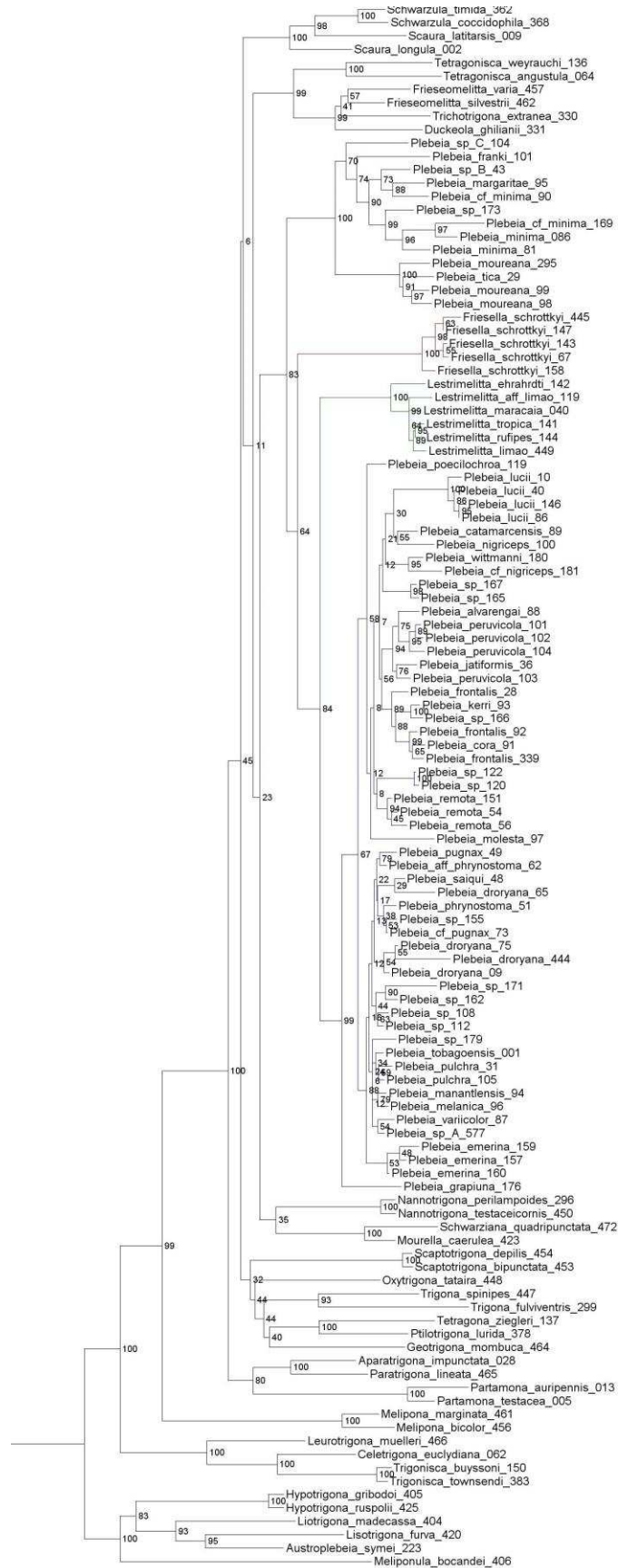
Anexo I: Espécies que tiveram sequências baixadas do Genbank com o local de origem de cada uma delas.

Espécie	Local de origem	Referência
Grupo interno		
<i>Friesella schorotkyi</i>	Brasil, São Paulo	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Lestrimelitta aff. limao</i>	Peru, Madre de Díos	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Lestrimelitta limao</i>	Brasil, São Paulo	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Lestrimelitta maracaia</i>	Peru, San Martín	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Plebeia droryana</i>	Brasil São Paulo	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Plebeia franki</i>	Panamá	Ramírez et al. (2010)
<i>Plebeia frontalis</i>	México, Puebla	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Plebeia minima</i>	Peru, San Martín	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Plebeia moureana</i>	México, Chiapas	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Plebeia sp. A</i>	Equador, Cañar	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Plebeia sp. B</i>	Peru, San Martín	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Plebeia sp. C</i>	Peru, San Martín	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Plebeia tobagoensis</i>	Trinidade e Tobago	Rasmussen & Camron (2010)
Grupo externo		
<i>Aparatrigona impuctata</i>	Peru, San Martín	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Austroplebeia symei</i>	Austrália, QLD	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Celetrigona euclydiana</i>	Peru, San Martín	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Duckeola ghilianii</i>	Brasil, Amazonas	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Frieseomelitta silvestri</i>	Brasil, São Paulo	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Frieseomelitta varia</i>	Brasil, São Paulo	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Geotrigona mombuca</i>	Brasil, São Paulo	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Hypotrigona gribodoi</i>	Uganda, Bwindi	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Hypotrigona ruspoli</i>	Camarões, Yaoundé	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Leurotrigona muelleri</i>	Brasil, São Paulo	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Liotrigona madecasa</i>	Madagascar, Mahajanga	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Lisotrigona furva</i>	Tailândia, Pathum Thani	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Melipona bicolor</i>	Brasil, Minas Gerais	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Melipona marginata</i>	Brasil, São Paulo	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Meliponula bocandei</i>	Uganda, Bwindi	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Mourella caerulea</i>	Brasil, Rio Grande do Sul	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Nannotrigona perilamboides</i>	México, Chiapas	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	Brasil, São Paulo	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Oxytrigona tataira</i>	Brasil, São Paulo	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Paratrigona lineata</i>	Brasil, São Paulo	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Partamona auripennis</i>	Peru, San Martin	Rasmussen & Camron (2010)

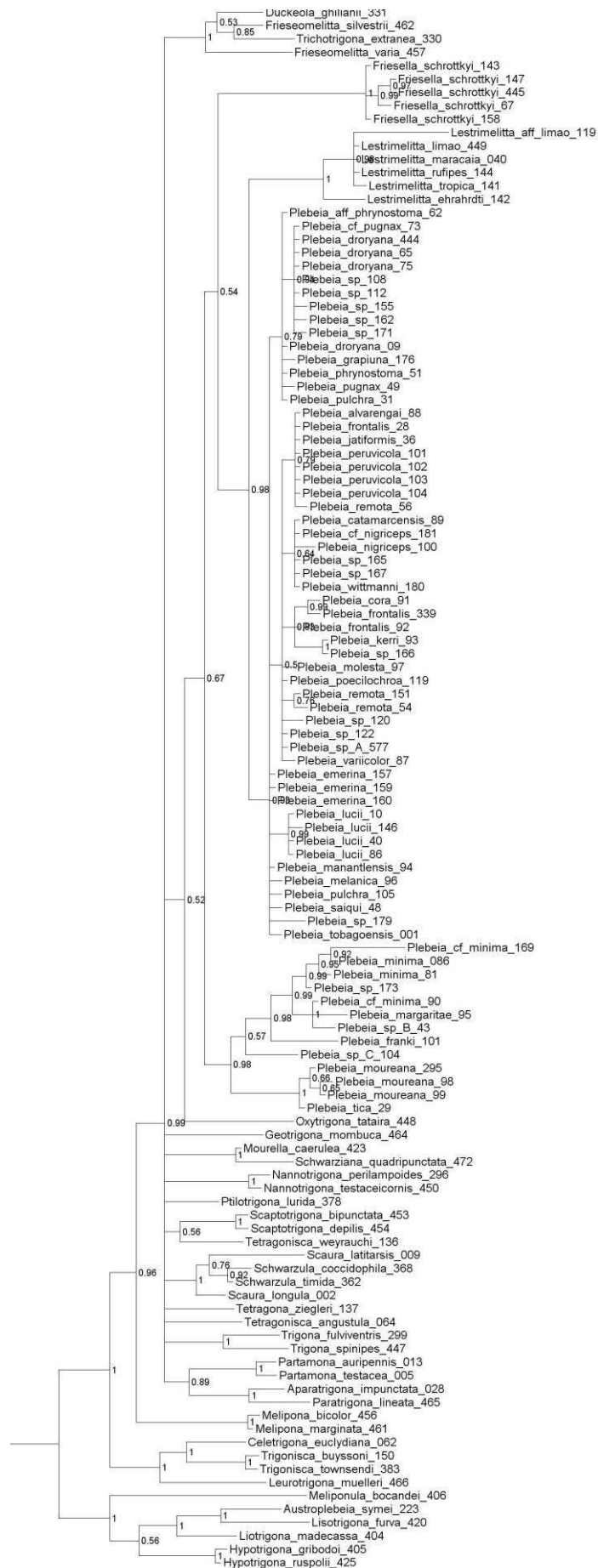
<i>Partamona testacea</i>	Peru, San Martin	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Ptilotrigona lurida</i>	Peru, San Martin	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Brasil, São Paulo	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Scaptotrigona depillis</i>	Brasil, São Paulo	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Scaura longula</i>	Peru, San Martin	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Scaura latitarsis</i>	Peru, San Martin	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Schwarzula coccidophila</i>	Peru, San Martin	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Schwarzula timida</i>	Peru, San Martin	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	Brasil, São Paulo	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Tetragona zieglei</i>	Costa Rica, Guanacaste	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Tetragonisca angustula</i>	Peru, San Martin	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Tetragonisca weyrauchi</i>	Peru, Madre de Dios	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Trichotrigona extranea</i>	Brasil, Amazonas	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Trigona fulviventris</i>	México, Chiapas	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Trigona spinipes</i>	Brasil, São Paulo	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Trigonisca buyssoni</i>	Costa Rica, Guanacaste	Rasmussen & Camron (2010)
<i>Trigonisca townsendi</i>	Peru, Tumbes	Rasmussen & Camron (2010)



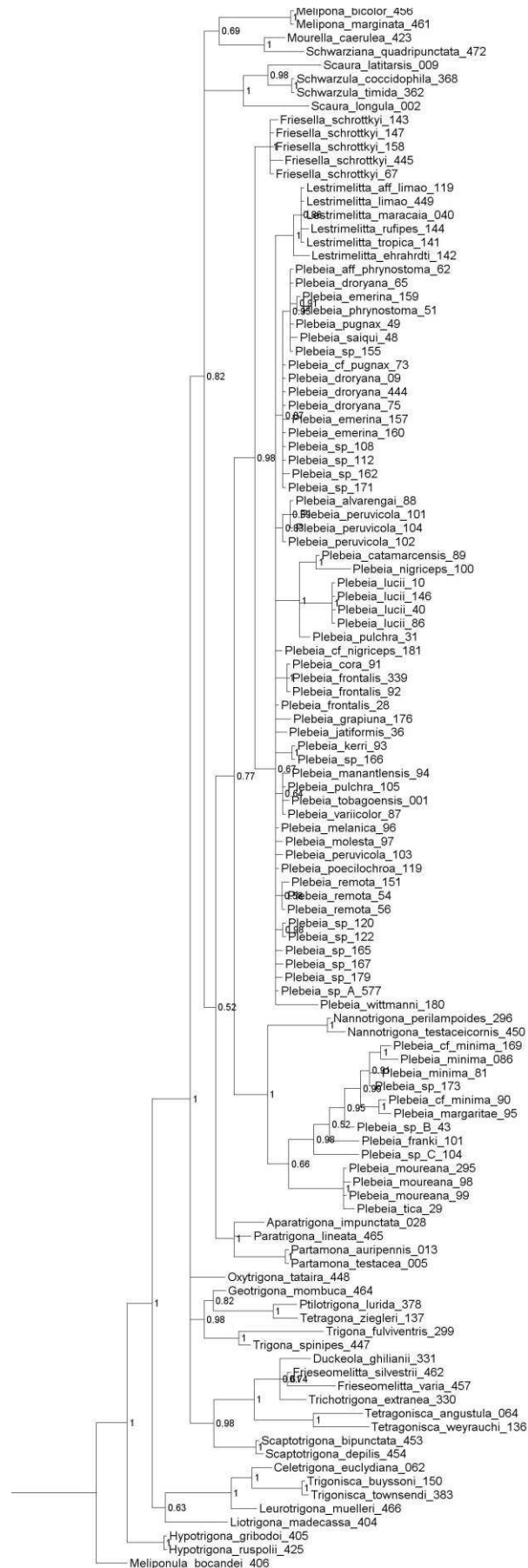
Anexo II: Inferência Bayesiana dos dados concatenados com implementação de modelos mistos.



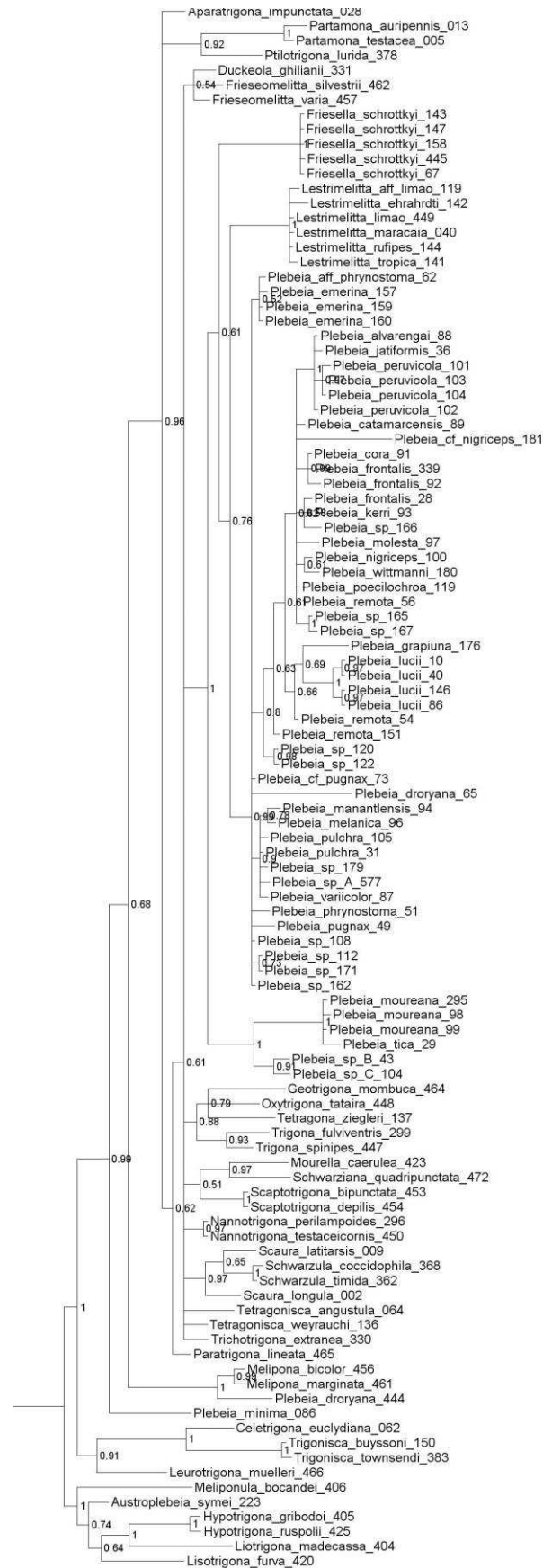
Anexo III: Máxima Verossimilhança dos dados concatenados com 1.000 replicações de Bootstrap.



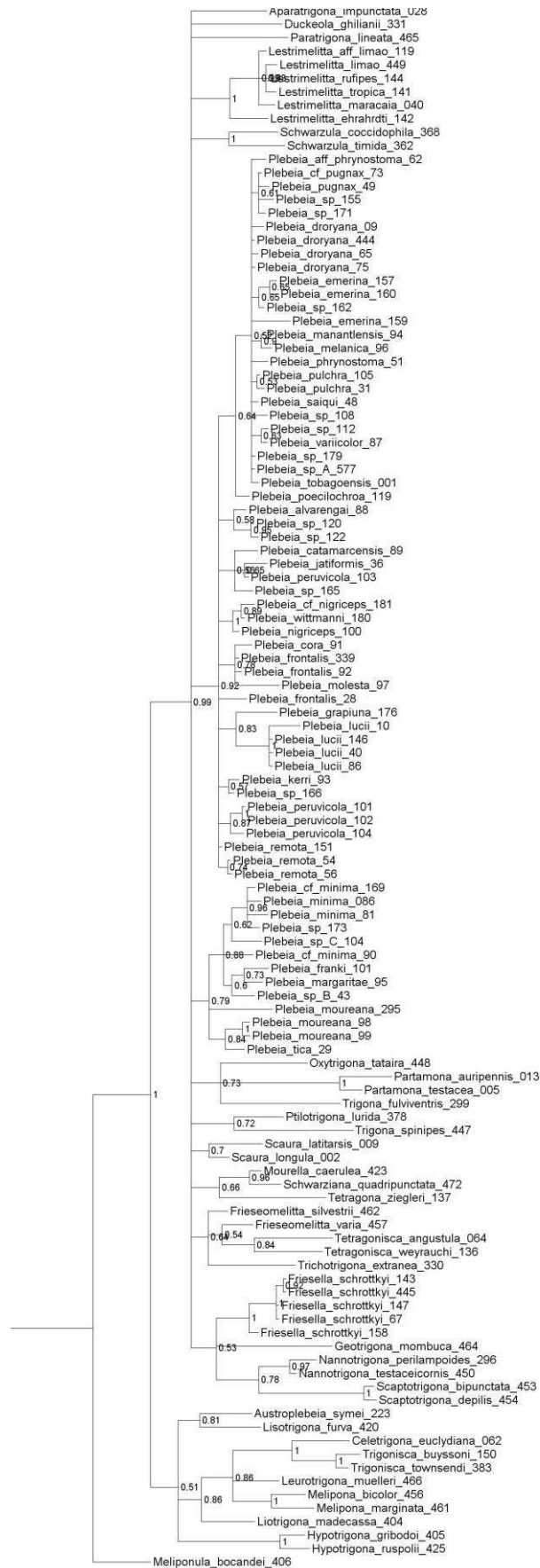
Anexo IV: Inferência Bayesiana do fragmento gênico EF-1 α .



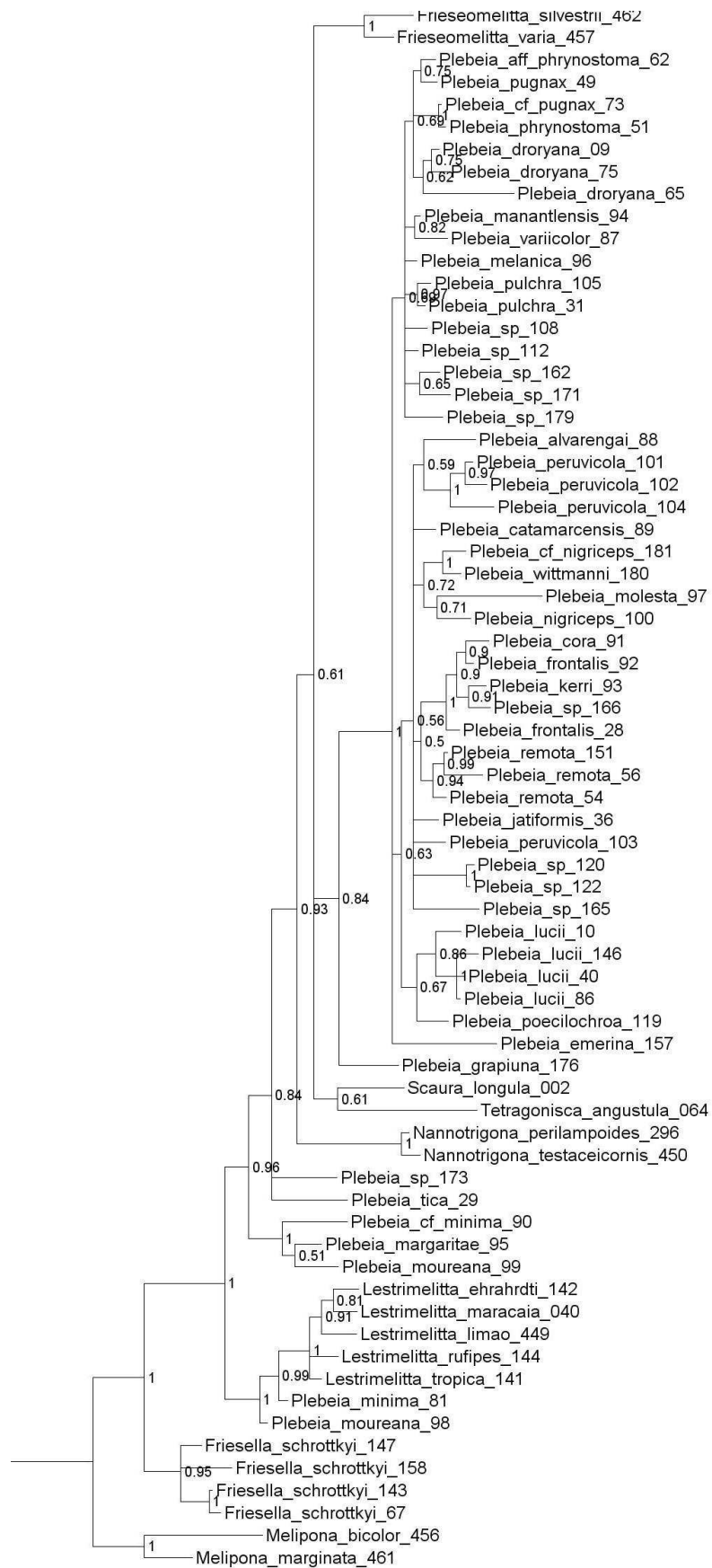
Anexo V: Inferência Bayesiana do fragmento gênico ArgK.



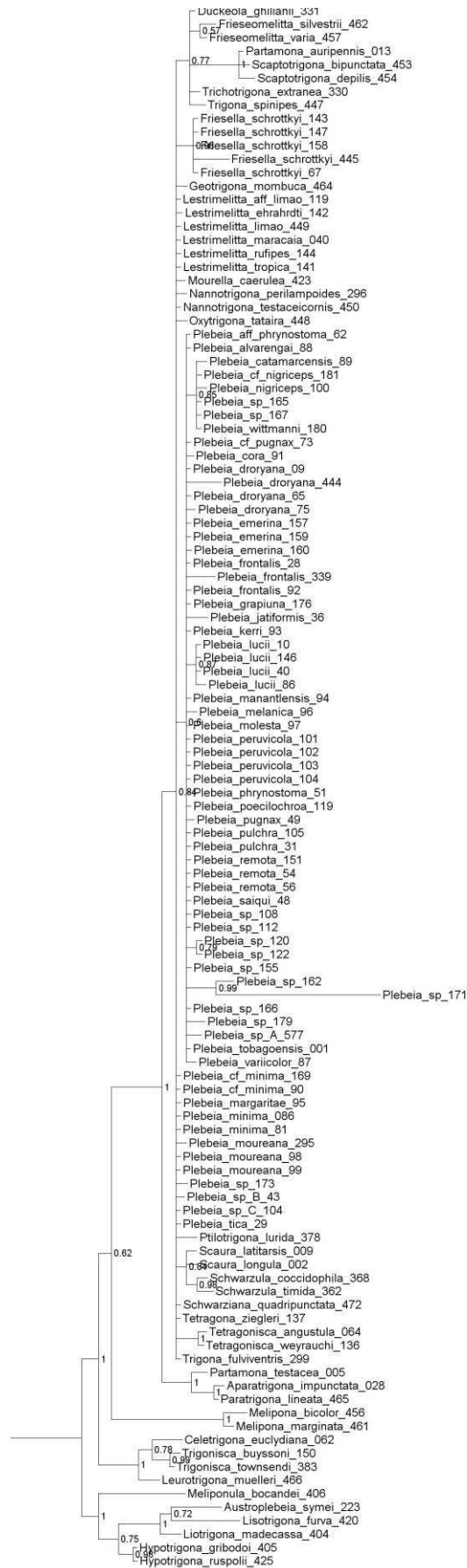
Anexo VI: Inferência Bayesiana do fragmento gênico Opsin.



Anexo VII: Inferência Bayesiana do fragmento gênico 16S.



Anexo VIII: Inferência Bayesiana do fragmento gênico CytB.



Anexo IX: Inferência Bayesiana do fragmento gênico 28S.

CAPÍTULO 2

Tempos de divergência e biogeografia histórica do clado Plebeia (Hymenoptera: Apidae, Meliponini)

Hugo A. Werneck

Resumo: Meliponini são abelhas altamente eussociais e importantes polinizadores dos ecossistemas onde ocorrem. Atualmente, possuem distribuição pantropical com registros em algumas regiões subtropicais. Registros fósseis sugerem que Meliponini tenha ocupado as regiões Neártica, no final do Cretáceo, e Paleártica durante o Paleogeno e início do Neogeno. O início da diversificação de Meliponini ainda é controverso, embora estudos anteriores tenham estimado para o final do Cretáceo superior. No presente estudo, nós utilizamos uma ampla filogenia da tribo Meliponini com datações moleculares utilizando fósseis como pontos de calibração, o que permitiu inferir sobre o início da história evolutiva de toda a tribo, além de reconstruir a história biogeográfica do clado Plebeia. Nossos resultados apontam a América do Sul como centro de origem das abelhas sem ferrão durante o Maastrichtiano no final do Cretáceo (ca 70 Ma). O clado Plebeia se originou na sub-região Paranaense durante o Oligoceno (ca 28 Ma), com as primeiras dispersões para a Amazônia e México durante o início do Mioceno, e posteriores dispersões para a Amazônia, sub-região Chaquenha, Domínio do Pacífico e Mesoamericano durante o Tortoniano (ca 10 Ma). E, por fim, nossos dados também sugerem que elementos da fauna sul-americana de Meliponini se dispersaram da região Neotropical para a Neártica muito antes das datas estimadas para o fechamento do Istmo do Panamá, o que reforça a hipótese de rotas transoceânicas do início do Mioceno.

INTRODUÇÃO

Meliponini são abelhas altamente eussociais, com colônias perenes construídas em cavidades pré-existentes ou expostas (Michener 1974, 2007; Wille 1983). O processo de enxameação é gradual e demorado, o que limita a capacidade de dispersão no espaço e no tempo (Wille & Orozco 1974; Wille 1983). Essas abelhas constituem um importante componente da fauna de onde ocorrem por serem polinizadores da maioria

das angiospermas (Heard 1999). Atualmente, as abelhas sem ferrão possuem distribuição pantropical com algumas ocorrências nas áreas subtropicais (Silveira et al. 2002; Michener 1979, 2007; Rasmussen & Cameron 2010). No entanto, registros fósseis sugerem que Meliponini tenha ocupado as regiões Neártica, no final do Cretáceo, e Paleártica durante o Paleogeno e início do Neogeno (Engel & Michener 2013a, b). Na região Neotropical são reconhecidos 32 gêneros vivos com cerca de 420 espécies descritas (Camargo & Pedro 2013), enquanto no Brasil são descritos 29 gêneros com 240 espécies com nomes válidos (Camargo & Pedro 2013; Pedro 2014).

A história evolutiva de Meliponini é discutida desde a metade do século XX e ainda é controversa. Uma das primeiras hipóteses sugeriu que essas abelhas teriam surgido na América do Sul, provavelmente no final do Paleoceno (Kerr & Maule 1964). Em seguida, Wille (1979) propôs que Meliponini teria surgido na África, entre o final do Cretáceo e início do Paleogeno. Camargo & Wittmann (1989) propuseram uma origem no Gondwana, no início do Cretáceo. No entanto, esses primeiros estudos foram baseados em caracteres morfológicos e no registro fóssil, e não dispunham de uma filogenia robusta com densa amostragem dos táxons em todas as regiões de ocorrência de Meliponini.

Com o advento do uso de sequências de DNA para as reconstruções filogenéticas, foi possível avançar nos estudos das relações evolutivas entre as abelhas (Danforth et al. 2012). Sendo assim, datações moleculares recentes baseadas em filogenias robustas com abordagem Bayesiana, estimaram que o início da diversificação de Meliponini ocorreu após a separação do Gondwana no final do Cretáceo, há cerca de 70 Ma (Martins & Melo 2016), ou no Gondwana, enquanto os continentes africano e sul-americano ainda estavam conectados, no início do Cretáceo superior entre 81 e 95 Ma (Rasmussen & Cameron 2010). Contudo, ainda há lacunas sobre o início da história evolutiva dessa tribo.

Embora haja uma ampla filogenia para as abelhas sem ferrão no nível de tribo, estudos infragenéricos ainda são escassos. Os gêneros mais bem estudados nesse sentido são *Geotrigona* (Camargo & Moure 1996), *Partamona* (Camargo & Pedro 2003; Pedro & Camargo 2003), *Ptilotrigona* (Camargo & Pedro 2004), *Trigona* (Rasmussen & Cameron 2007; Rasmussen & Camargo 2008), *Melipona* (Ramirez et al. 2010) e *Plebeia* (Capítulo 1). Entretanto, com exceção de *Plebeia*, *Trigona* e *Melipona*, todos os outros estudos citados foram baseados em dados morfológicos e carecem de datações moleculares para estimar as datas de divergência entre as espécies.

Registro fóssil para Meliponini

Na literatura são descritos cerca de 190 fósseis de abelhas, desde o Cretáceo até o Mioceno (Michez et al. 2012). Para Meliponini são conhecidas 11 espécies fósseis distribuídas em seis gêneros extintos: *Cretotrigona* Engel, 2000 do Cretáceo; *Kelneriapis* Sakagami, 1978, *Liotrigonopsis* Engel, 2001 e *Exebotrigona* Engel & Michener, 2013 do Eoceno; além de *Proplebeia* Michener, 1982 e *Meliponorytes* Tosi, 1896 do Mioceno (Engel 2001; Engel & Michener 2013a). Surpreendentemente, *Cretotrigona prisca* (Michener & Grimaldi, 1998) é o fóssil de corbiculado mais antigo e mais completo conhecido até o momento (Engel 2000). O fóssil de abelha mais comum e melhor estudado é *Proplebeia dominicana* (Wille & Chandler, 1964), do âmbar da República Dominicana.

Ainda que haja relativa abundância nos registros fósseis existentes para Meliponini, o posicionamento de muitos deles ainda é incerto, o que restringe o uso da maioria como pontos de calibração para datações moleculares. Os fósseis mais comumente utilizados são *Proplebeia dominicana*, *Kelneriapis eocenica* (Kelner-Pillault, 1970) e *Cretotrigona prisca* (Rasmussen & Cameron 2007, 2010; Cardinal et al. 2010; Cardinal & Danforth 2011; Martins & Melo 2016). Comentários sobre os fósseis utilizados como pontos de calibração no presente estudo são apresentados na seção de Materiais e Métodos.

O clado Plebeia (sensu Capítulo 1)

Esse é um grupo interessante do ponto de vista evolutivo, composto pelo gênero polifilético *Plebeia* e pelos gêneros monofiléticos *Friesella* e *Lestrimelitta* (Capítulo 1). De acordo com os estudos que incluíram espécies desse clado em sua matriz, este clado teria cerca de 28 Ma e a linha *Plebeia* (sensu Melo 2016) cerca de 32 Ma (Rasmussen & Cameron 2010). *Proplebeia dominicana* tem sido utilizado para calibrar o clado *Plebeia* (Rasmussen & Cameron 2010) e clados que contêm Meliponini Neotropicais (Cardinal et al. 2010; Ramirez et al. 2010; Martins et al. 2014; Martins & Melo 2016).

O gênero *Plebeia* está amplamente distribuído na região Neotropical. Uma hipótese filogenética para esse gênero é apresentada pela primeira vez no Capítulo 1, que considera dois clados (**I** e **II**) para *Plebeia*, com *Friesella* e *Lestrimelitta* entre eles. Os grupos *minima* e *moireana* não são considerados como pertencentes ao gênero *Plebeia* e um estudo sobre a taxonomia deles está em andamento (Werneck HA & Melo GAR, dados não publicados; Capítulo 1). Dados sobre as espécies e a distribuição

geográfica de cada grupo desses clados são apresentados no Capítulo 1. *Lestrimelitta* está amplamente distribuído na região Neotropical, composto por 23 espécies cleptobióticas (Camargo & Pedro 2013; Marchi & Melo 2006) e seu posicionamento como grupo irmão do clado **II** de *Plebeia* é discutido no Capítulo 1. *Friesella* é um gênero monotípico restrito ao estado do Paraná e à região sudeste do Brasil (Camargo & Pedro 2013).

No presente estudo nós apresentamos uma ampla filogenia datada da tribo Meliponini e uma reconstrução de sua história biogeográfica, de forma que foram feitas inferências sobre quando e onde a evolução dessa tribo teve início. Em seguida, nós demos maior ênfase às datas de divergência e à história biogeográfica do clado *Plebeia*. Nossos resultados reforçam a necessidade de uma nova classificação para o gênero *Plebeia* e contribuem para o entendimento da evolução de todo o grupo aqui estudado. Consequentemente, o presente estudo constitui a primeira tentativa de reconstruir a história evolutiva do clado *Plebeia* no espaço e no tempo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Análises filogenéticas

Para as reconstruções filogenéticas foi utilizado o mesmo conjunto de dados concatenados do Capítulo 1. Os alinhamentos das sequências e as partições dos dados seguem como no Capítulo 1. A Inferência Bayesiana foi realizada no servidor CIPRES Science Gateway online (Miller et al. 2010) com o programa MrBayes v.3.2.1 (Ronquist et al. 2012). Nós utilizamos duas corridas independentes, cada uma com quatro replicações das Cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC). Foram utilizadas 30.000.000 de gerações da MCMC, com as árvores sendo amostradas a cada 1.000 gerações. A convergência das cadeias de MCMC foi verificada no programa Tracer v.1.5 (Rambaut & Drummond, 2009). Foram excluídas 25% das gerações iniciais de MCMC e o restante foi utilizado para calcular uma árvore consenso. A frequência de cada ramo no consenso de maioria representa o valor da probabilidade posterior (PP = posterior probability) da inferência Bayesiana. Todas as árvores foram editadas no programa FigTree v. 1.3.1 (Rambaut 2009).

Datação molecular

Os tempos de divergência foram estimados utilizando o mesmo conjunto de dados concatenados, tendo sido particionados da mesma forma como na inferência Bayesiana. As análises foram realizadas com abordagem Bayesiana como implementado no programa BEAST 2.4.0 (Bouckaert et al. 2014) no servidor CIPRES Science Gateway online (Miller et al. 2010). Para todas as análises, nós utilizamos o modelo de relógio molecular Relaxed Clock Log Normal, o qual permite que as taxas de evolução variem entre os vários ramos da árvore (Drummond et al. 2006). O modelo de substituição de nucleotídeos foi GTR+G+I para todas as partições, além do processo de Yule como probabilidade a priori para as árvores, que é um modelo de especiação mais apropriado para filogenias entre espécies (Drummond & Rambaut 2007).

Nós realizamos uma série de análises preliminares com o aumento progressivo das gerações da MCMC, entre 60.000.000 e 240.000.000, com as calibrações feitas por meio de registro fóssil (ver descrição abaixo). A partir dos resultados preliminares, nós percebemos que havia algumas inconsistências quanto às datas estimadas para o ponto calibrado com *Proplebeia dominicana*. Dessa forma, buscando avaliar a precisão das estimativas e minimizar as incertezas quanto à idade desse nó, foram realizadas duas análises, uma utilizando distribuição LogNormal e outra utilizando distribuição Normal para esse ponto de calibração. A distribuição LogNormal restringe fortemente uma idade mínima para o ponto calibrado, o que é dado a partir da idade estimada para o fóssil, além de permitir uma incerteza unidirecional nos tempos de divergência (Ho & Phillips 2009). Nessa primeira análise (D1), o nó calibrado com *P. dominicana* foi estimado com uma idade muito mais antiga (31.9 Ma, 95% HPD = 24.9-39.1 Ma) do que a idade estimada para o fóssil (15-20 Ma), isso em comparação com os outros pontos de calibração utilizados. Assim, nós realizamos uma segunda análise (D2), na qual a única diferença da D1 foi a utilização de uma distribuição Normal como probabilidade a priori para este ponto de calibração. A distribuição normal é simétrica, com a maior densidade de probabilidades concentrada em torno da média, o que permite uma incerteza bidirecional para a estimativa dos tempos de divergência (Ho & Phillips 2009). A justificativa e comentários sobre cada fóssil utilizado como ponto de calibração no presente estudo é feita a seguir.

Tendo os dois esquemas (D1 e D2) estabelecidos, nós realizamos as análises finais da seguinte forma: foram utilizadas duas corridas paralelas, sendo uma com 240.000.000 de gerações da MCMC e a outra com 120.000.000. As duas corridas foram

combinadas no pacote LogCombiner, como implementado no BEAST, totalizando 360.000.000 de gerações da MCMC utilizadas para o presente estudo. Os valores de ESS e dos demais parâmetros estimados nas análises foram verificados no programa Tracer v.1.5 (Rambaut & Drummond, 2009). Por fim, foi construída uma árvore com a máxima credibilidade dos cladogramas (maximum clade credibility tree) com o pacote TreeAnnotator, como implementado no BEAST, com a exclusão de 25% das gerações iniciais.

Pontos de calibração com fósseis

Embora existam 11 fósseis de Meliponini descritos na literatura (Engel & Michener 2013a, b), nós decidimos utilizar três, com base na confiabilidade das inferências taxonômicas e filogenéticas para as relações com espécies viventes e nas datações dos estratos estratigráficos atribuídas a cada um deles.

Calibração 1

Cretotrigona prisca (Michener & Grimaldi 1988): Uma única operária foi encontrada em âmbar produzido por espécie extinta de Taxodiaceae de Kinkora, Nova Jersey, Estados Unidos (Michener & Grimaldi 1988a, b; Engel 2000; Michener & Engel 2013a). Esse fóssil foi inicialmente atribuído ao gênero *Trigona*, baseado na presença da área sedosa na superfície interna do basitarso posterior, entre outros caracteres (Michener & Grimaldi 1988a). Engel (2000) transferiu *T. prisca* para o novo gênero *Cretotrigona* e o considerou filogeneticamente próximo ao gênero africano *Dactylurina*. Michener & Grimaldi (1988b) consideraram *C. prisca* como sendo do Campaniano (ca 80 Ma), baseado em análises químicas comparadas com outros âmbares do mesmo local. Grimaldi (1999) fornece evidências de que *C. prisca* é do final do Cretáceo, idade que corresponde ao Maastrichtiano (66-72.1 Ma).

A posição filogenética de *C. prisca* e sua idade ainda são discutidas na literatura. Nós consideramos esse fóssil como sendo do Maastrichtiano, no final do Cretáceo, baseado em Grimaldi (1999), Engel (2000) e Engel & Michener (2013a, b). Em relação à posição filogenética de *C. prisca*, nós consideramos que esse fóssil só pode ser colocado no nó ancestral de todos os Meliponini viventes, o que segue a posição de Rasmussen & Cameron (2010), Cardinal et al. (2010) e Cardinal & Danforth (2011). Uma distribuição LogNormal, com Mean = 1.5, Stdev = 0.7 e offset = 66.0, foi aplicada para as análises D1 e D2.

Calibração 2

Kelneriapis eocenica (Kelper-Pillault, 1969): Esse fóssil foi descrito do âmbar Báltico, datado do Lutetiano do Eoceno (44.1 ± 1.1 Ma). Kelper-Pillault descreveu *Hypotrigona eocenica* em 1969 (ver Engel 2001), que foi transferida para *Kelneriapis* como subgênero de *Tetragonula* por Sakagami (1978). O nome *Kelneriapis* foi usado no nível de gênero pela primeira vez por Michener (1990), no entanto, o autor não fez associação com a espécie tipo, sendo Engel (2001) o primeiro a usar esta combinação.

Entre as espécies viventes de Meliponini, *Kelneriapis* se aproxima mais de *Hypotrigona* da África, principalmente por ambos possuírem a parte posterior da tibia posterior arredondada, porém diferem devido ao fato de *Kelneriapis* possuir o escutelo projetado sobre o metanoto e propódeo, a ausência de dentes na mandíbula e propódeo curto e em declive (Engel, 2001). No presente estudo, esse fóssil foi utilizado para calibrar o clado do Velho Mundo. Uma distribuição LogNormal, com Mean = 1.47, Stdev = 0.75 e offset = 45.0, foi utilizada nas análises D1 e D2.

Calibração 3

Proplebeia dominicana (Wille & Chandler 1964): Descrito originalmente como *Trigona dominicana*, foi o quinto fóssil de Meliponini descrito e o primeiro do âmbar Dominicano (Wille 1977). Inicialmente, foi filogeneticamente relacionado ao gênero africano *Liotrigona* Moure, 1961. Moure & Camargo (1978) transferiram *T. dominicana* para o gênero vivente *Plebeia*, baseando-se principalmente nas manchas amarelas do clipeo e área supra-clipear, mandíbulas, labro, e área malar menor do que o diâmetro do flagelo, além de características das asas. Michener (1982), após examinar 44 peças de âmbar de Santo Domingo na República Dominicana e comparar com espécies viventes de *Liotrigona* e *Plebeia*, propôs *Proplebeia* (como subgênero) para acomodar os fósseis descritos originalmente como *T. dominicana*. *Proplebeia* foi elevado ao nível de gênero baseado, principalmente, na margem posterior da superfície interna da tibia posterior, rastelo, penicilo e veia M da asa anterior (Michener 1990). O status de gênero ainda é mantido (Camargo & Pedro 2013).

A idade do âmbar Dominicano foi durante muito tempo interpretada de forma controversa. Sanderson & Farr (1960) inicialmente consideraram como sendo do Oligoceno. No entanto, análises estratigráficas dataram entre o início e o meio do Mioceno (15-20 Ma) (Iturralde-Vinent & MacPhee 1996). Sendo assim, essa é a idade considerada no presente estudo para *Proplebeia dominicana*.

As datações moleculares que utilizaram *P. dominicana* como calibração têm normalmente colocado esse fóssil como ancestral da linha Plebeia (Rasmussen & Cameron 2010) e gêneros relacionados (Ramirez et al. 2010). De acordo com as características específicas de *P. dominicana*, é mais provável que seja mais proximamente relacionado ao clado Plebeia (sensu Melo 2016 e Capítulo 1), excluindo os gêneros *Nannotrigona*, *Schwarziana* e *Mourella*. Contudo, o presente estudo utilizou *P. dominicana* para calibrar o clado Plebeia. Uma distribuição LogNormal, com Mean = 1.5, Stdev = 0.7 e offset = 15.0, foi utilizada na análise D1. Para a análise D2, foi utilizada uma distribuição Normal com Mean = 0, Sigma = 5 e offset = 15.0.

Inferências Biogeográficas

Como conjunto de dados, inicialmente nós utilizamos a matriz completa, como nas análises filogenéticas e no BEAST e codificamos a distribuição de cada terminal da seguinte forma: A) América do Sul, B) América Central e México; representando o clado do Novo Mundo (sensu Rasmussen & Cameron 2010); e C) Velho Mundo (sensu Rasmussen & Cameron 2010), representando as espécies que ocorrem nas regiões Indo-Malaia, Australásia e Afro-tropical. Dessa maneira, foi possível estimar a área ancestral para todos os grandes clados de Meliponini. Em seguida, nós codificamos a distribuição dos terminais apenas para o clado Plebeia, baseado nas regionalizações biogeográficas para a região Neotropical de Morrone (2010, 2014), da seguinte forma: A) Domínio do Pacífico, B) Sub-região Amazônica, C) Sub-região Chaquenha, D) Sub-região Paranaense, E) Zona de transição Sul-Americana, e F) Domínio Mesoamericano. Apenas o terminal *Plebeia_emerina_157* foi considerado como sem informação, devido à incerteza do local de origem da colônia coletada (ver Capítulo 1). As inferências biogeográficas foram realizadas no programa RASP v3.2 (Yu et al. 2015), com o método BBM (Bayesian Binary MCMC), a partir do conjunto de 1.000 árvores extraídas das análises do BEAST. O método BBM permite inferir a área ancestral de cada nó da árvore por meio de abordagem Bayesiana com o uso da MCMC (Yu et al. 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises filogenéticas

A árvore gerada nas análises de Inferência Bayesiana é apresentada no Anexo I. Todos os grandes clados de Meliponini foram recuperados no presente estudo como em hipóteses anteriores para a tribo (Costa et al. 2003; Rasmussen & Cameron 2007, 2010). O clado Neotropical é monofilético (PP = 1.00) e apareceu como grupo irmão do clado do Velho Mundo, formado por espécies das regiões Afro-tropical, Australásia e Indo-Malaia (PP = 1.00). A maioria dos gêneros foi recuperada como monofilético, com exceção de *Plebeia*, *Scaura* e *Trigonisca*, como confirmado por estudos anteriores (Rasmussen & Cameron 2010; Capítulo 1).

O clado *Plebeia*, recuperado como monofilético, é composto pelos gêneros monofiléticos *Friesella* e *Lestrimelitta* e pelo polifilético *Plebeia*. A única diferença entre a filogenia Bayesiana e o cronograma gerado no BEAST foi quanto ao posicionamento de *Plebeia emerina*, que no Capítulo 1 foi incluída no grupo *droryana*. No nosso cronograma, *P. emerina* saiu como grupo irmão dos grupos *droryana* e *variicolor*, com alto suporte (PP = 1.00; Figura 1 e Anexo I). Os outros grupos considerados no Capítulo 1 se mantiveram consistentes. Os grupos *minima* e *moureana* não são considerados como pertencentes ao gênero *Plebeia* e um estudo sobre sua sistemática e taxonomia está em andamento (Werneck HA & Melo GAR, dados não publicados; Capítulo 1). Uma discussão sobre o status atual da sistemática do clado *Plebeia* é feita no Capítulo 1.

Datação molecular

Comparação entre as análises D1 e D2 para as datas estimadas para o ponto calibrado com *Proplebeia dominicana*:

Os dois esquemas de datação (D1 e D2) resultaram em topologias idênticas. As datas estimadas foram semelhantes para os pontos de calibração (Figura 1; Anexo II), com diferenças entre os intervalos de confiança (95% HPD) (Tabela I). Apenas o ponto calibrado com *K. eocenica* se comportou de forma idêntica nas duas análises. Esse fóssil tem sido usado com frequência em datações que incluíram Meliponini (Cardinal et al. 2010; Rasmussen & Cameron 2010; Ramirez et al. 2010; Cardinal & Danforth 2013; Martins et al. 2014; Martins & Melo 2016). A análise com distribuição Normal (D2)

estimou uma idade mais recente para o ponto calibrado com a idade mínima de *P. dominicana* do que a análise com distribuição LogNormal (D1), além de possuir intervalos de confiança (95% HPD) menores (Tabela I). No entanto, ambas estimaram o início da diversificação do clado *Plebeia* para o início do Oligoceno, provavelmente no Rupeliano (Figura 1). Consequentemente, nós consideramos que D2 é a hipótese mais confiável, baseado nos intervalos de confiança e nos valores de ESS (Ho & Phillips 2009; Sauquet 2013; Drummond & Bouckaert 2015), de forma que essa será a análise utilizada no presente estudo.

Tabela I: Comparação entre as datas de divergência estimadas nas duas análises realizadas no presente estudo (D1 e D2).

	mrcatime prisca	Cretotrigona	mrcatime eocenica	Kelneriapis	mrcatime dominicana	Proplebeia
Análises	D1	D2	D1	D2	D1	D2
Média da idade estimada (milhões de anos)	71.2	70.0	48.2	48.2	32.0	28.5
Intervalo 95% HPD (milhões de anos)	66.6-78.0	66.6-74.9	45.4-52.1	45.4-52.1	24.9-39.1	23.4-33.5
ESS	12187.4633	15116.4705	15256.0051	13455.2932	4640.8393	6254.3804
Desvio padrão	3.4	2.5	1.9	1.9	3.6	2.6
Erro padrão	0.03	0.02	0.01	0.01	0.05	0.03

Datas de divergências na tribo *Meliponini*

A idade da raiz de *Meliponini*, calibrada com *Cretotrigona prisca* (66 Ma), foi estimada em 70 Ma (95% HPD = 66.6-74.9 Ma) pela D2, o que correspondente ao final do Cretáceo superior (Figura 1). Essa data implica em um cenário alternativo ao colocado por Rasmussen & Cameron (2010), que estimaram entre 81 e 95 Ma. Todavia, estudos baseados em fósseis (Engel & Michener 2013a) e em dados moleculares (Martins & Melo 2016) estimaram o início da diversificação de *Meliponini* para a transição entre o Campaniano e o Maastrichtiano (ca 68 Ma) do final do Cretáceo, o que reforça a hipótese proposta aqui. Essas diferenças geram impacto nas interpretações sobre a história evolutiva da tribo e serão discutidas a seguir. A base do clado Neotropical foi estimada em 66.4 Ma (95% HPD = 54.5-72.5 Ma), enquanto a base do clado do Velho Mundo foi estimada em 54 Ma (95% HPD = 48-61 Ma). Ambas estimativas diferem das inferidas por Rasmussen & Cameron (2010), que apontaram

datas mais antigas do que as aqui estimadas. Porém, os autores não indicaram os intervalos de confiança (95% HPD), o que impede uma comparação mais precisa (Sauquet 2013).

O fato da raiz de Meliponini ser estimada em 70 Ma e o clado do Novo Mundo ter uma data de início de diversificação mais antiga do que o clado do Velho Mundo, sugere que as abelhas sem ferrão tiveram o início de sua história evolutiva na região Neotropical. Esses resultados trazem à tona discussões sobre hipóteses sugeridas anteriormente, por estudos baseados na comparação da diversidade de espécies entre as áreas de ocorrência, dados citogenéticos, morfologia e registro fóssil (Kerr & Maule 1964). No entanto, nós discordamos de Kerr & Maule (1964) quanto à data de Meliponini, que, para eles, seria no início do Eoceno (ca 58 Ma). Mais recentemente, Martins & Melo (2016) utilizaram uma ampla filogenia molecular para Apinae e apontaram o início da diversificação dos corbiculados na América do Sul, no final do Cretáceo. Portanto, nossos dados reforçam a hipótese de que Meliponini começou a se diversificar na região Neotropical durante o Maastrichtiano, no final do Cretáceo (ca 70 Ma).

Datas de divergências no clado Plebeia

Nossos resultados estimaram a idade do ancestral comum mais recente da linha Plebeia em 35 Ma (95% HPD = 28-41 Ma), o que corresponde ao Priaboniano, no final do Eoceno. A linhagem de *Nannotrigona* divergiu da linhagem ancestral de *Mourella* + *Schwarziana* há 31 Ma (95% HPD = 22-45 Ma). Nosso cronograma aponta o ancestral comum mais recente do clado Plebeia com 28.5 Ma (95% HPD = 23.5-34 Ma). O único estudo que nos permite uma comparação direta com nossos dados é o de Rasmussen & Cameron (2010), que obteve uma estimativa semelhante à nossa. Em ambos os estudos, o início da diversificação desse clado se deu no Rupeliano do Oligoceno.

Os terminais do gênero monotípico *Friesella* inseridos em nossas análises têm seu ancestral comum mais recente estimado em 5.8 Ma (95% HPD = 3.5-8.9 Ma) e sua linhagem ancestral divergiu da linhagem de *Lestrimelitta* + clado II de Plebeia há cerca de 26.5 Ma (95% HPD = 21-31.5 Ma). *Friesella* foi descrito por Moure (1946) e posteriormente considerado como subgênero de Plebeia (Moure 1951, 1961), ou até mesmo como uma espécie de Plebeia (Michener 1990), até Camargo & Pedro (1992) considerarem o status de gênero novamente, o que é confirmado por dados moleculares (Costa et al. 2003; Rasmussen & Cameron 2010; Capítulo 1).

O ancestral comum mais recente entre o gênero cleptobiótico *Lestrimelitta* e o clado **II** de *Plebeia* foi estimado em 21.5 Ma (17-26 Ma), o que corresponde ao início do Mioceno. Nossos resultados indicam que esse comportamento surgiu apenas uma vez no clado *Plebeia*. O outro gênero cleptobiótico é *Cleptotrigona* da África (Michener 1979; Eardley 2004; Roubik 2006), que provavelmente utiliza espécies de *Hypotrigona* e *Liotrigona* como hospedeiros (Michener 2007; Eardley 2004). De acordo com Camargo & Pedro (2007), *Trichotrigona extranea* não constrói potes de alimento e nem estoca alimento, as operárias têm livre acesso às colônias hospedeiras, que provavelmente são espécies de *Frieseomelitta* que ocorrem na mesma área. Dessa forma esses autores consideram *T. extranea* parasita social de *Frieseomelitta*, e não uma cleptobiótica. Embora *Cleptotrigona* não esteja incluído no presente estudo e em estudos anteriores (Costa et al. 2003; Rasmussen & Cameron 2007, 2010; Ramírez 2010), tudo indica que o hábito cleptobiótico evoluiu mais de uma vez na tribo, e a ausência da maioria dos pêlos do corpo e das corbículas, como em *Lestrimelitta* e *Cleptotrigona*, seja resultado de convergência evolutiva.

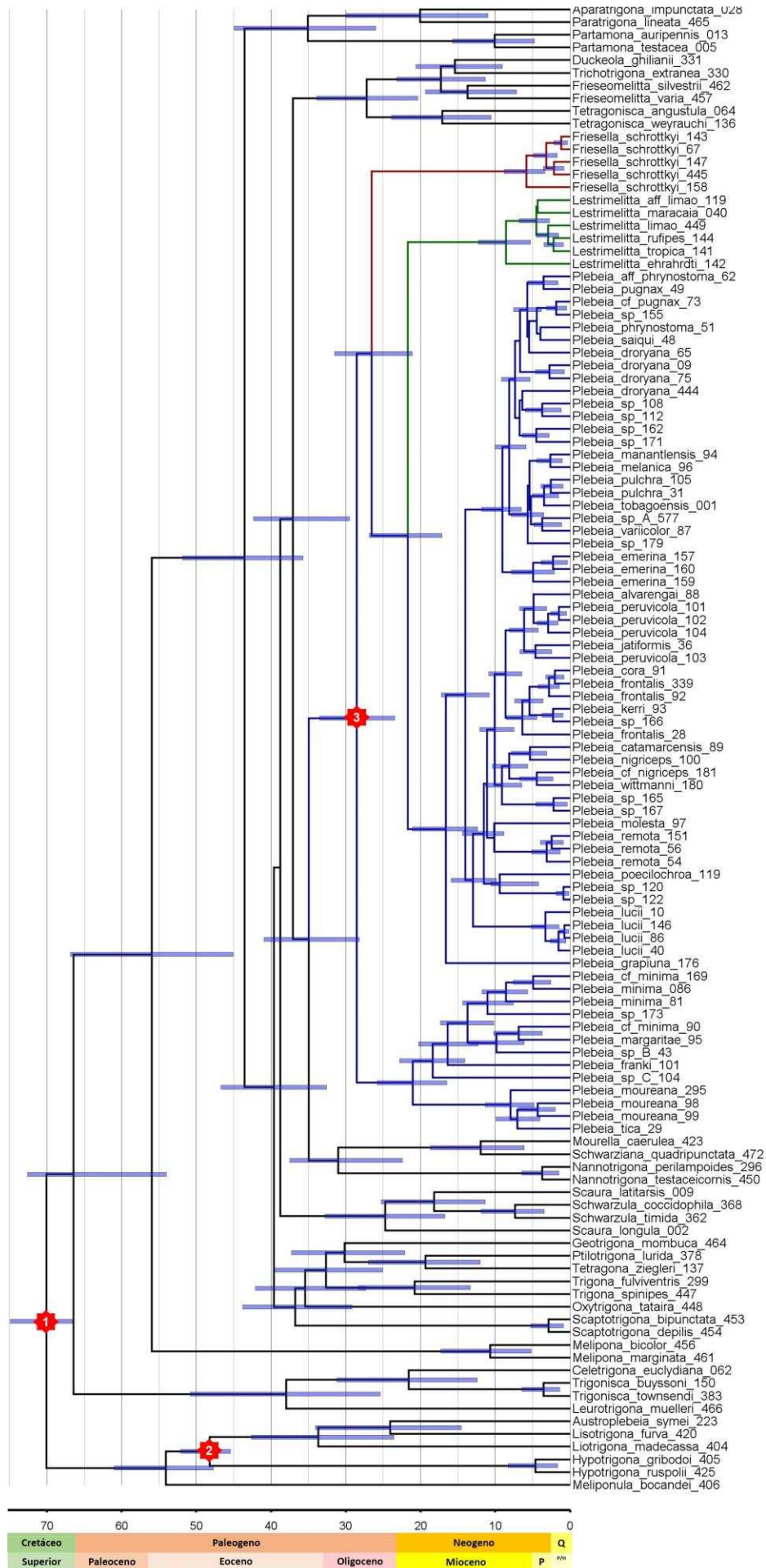


Figura 1: Cronograma da Tribo Meliponini baseado na inferência Bayesiana com implementação do relógio molecular relaxado (Relaxed Molecular Clock) na análise D2. Os números indicam os pontos de calibração com fósseis utilizados no presente estudo: 1) Cretotrigona prisca, com idade mínima restringida a 66 Ma com distribuição LogNormal; 2) Kelneriapis eocenica, com idade mínima restringida a 45 Ma com distribuição LogNormal e 3) Proplebeia dominicana, com idade estimada em 15 Ma com distribuição Normal. As barras azuis sobre os nós representam os intervalos de confiança com 95% HPD (High Posterior Density).

Biogeografia

Os resultados das análises de BBM no RASP para a tribo Meliponini, com o primeiro esquema de codificação de áreas, estão sumarizados na Figura 2. Os resultados para o clado Plebeia, com as codificações de áreas da região Neotropical baseado em Morrone (2010, 2014), estão sumarizados na Figura 3.

Quando e onde a história evolutiva de Meliponini teve início?

As reconstruções biogeográficas do presente estudo suportam um cenário para o início da diversificação de Meliponini na América do Sul (62%) mais provável do que no Velho Mundo (38%). Nossos resultados também suportam um evento de dispersão há cerca de 70 Ma (95% HPD = 66.6-74.9 Ma) como o principal evento do início da história evolutiva das abelhas sem ferrão. Estudos anteriores apontaram uma origem no continente Gondwana com um evento de vicariância responsável pelo início da evolução dos Meliponini (Michener 1979; Camargo & Wittmann 1989; Rasmussen & Cameron 2010). Entretanto, para uma origem gondwânica, seria necessário que houvesse ligação entre os continentes sul-americano e africano até pelo menos no Campaniano do Cretáceo (ca 70-83 Ma), o que remonta à data estimada por Rasmussen & Cameron (2010) para a tribo. No entanto, estudos recentes sugerem que os continentes africano e sul-americano já estavam totalmente separados no final do Cenomaniano, início do Cretáceo superior (ca 100 Ma) (Jokat et al. 2003; Upchurch 2008; Wilf et al. 2013; Scotese 2016).

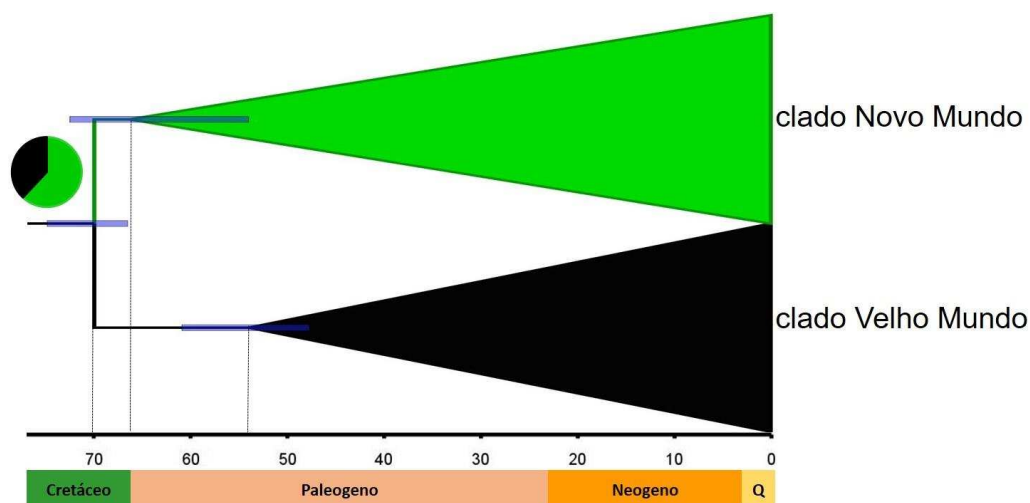


Figura 2: Cronograma da tribo Meliponini com o resultado da análise BBM (Bayesian binary MCMC) implementada no RASP. O gráfico em pizza mostra a probabilidade do ancestral comum mais recente de Meliponini ter ocupado a América do Sul (62%, em verde) ou o Velho Mundo (38%, em preto). Os dois grandes clados foram colapsados para facilitar a visualização. As linhas tracejadas indicam as datas estimadas para a base de Meliponini (70 Ma), clado Novo Mundo (66 Ma) e clado Velho Mundo (54 Ma).

A hipótese de que as abelhas sem ferrão iniciaram sua diversificação na América do Sul já foi proposta anteriormente (Kerr & Maule 1964). Estudos recentes sobre Apinae, baseados em dados moleculares, apontam que o início da diversificação dos corbiculados se deu na América do Sul (Hedtke et al. 2013; Martins et al. 2014; Martins & Melo 2016). Embora esses estudos não tenham feito uma ampla discussão sobre Meliponini, eles nos indicam uma origem sul-americana para as abelhas sem ferrão. Esse cenário demanda uma explicação de como Meliponini ocupou as regiões Afrotropical, Australásia e Indo-Malaia, chegando a uma distribuição pantropical como nos dias de hoje. A primeira possibilidade seria a existência de uma rota de dispersão pela América do Norte via Atlântico Norte, o que já foi proposto para abelhas para o final do Cretáceo (Martins & Melo 2016) e início do Eoceno (Praz & Packer 2014), bem como para outros organismos, como primatas (Smith et al. 2006), durante o Eoceno. Uma outra possibilidade é a rota via Estreito de Bering, que esteve disponível até por volta do Lutetiano do Eoceno (ca 47 Ma) (Sanmartín et al. 2001) e foi documentada como rota para outros táxons de abelhas (Hines 2008; Rehan et al. 2010; Sedivy et al. 2013; Praz & Packer 2014), bem como para vertebrados (Guo et al. 2012; Li et al. 2015) e angiospermas (Donogue et al. 2001).

Evidências do registro fóssil fornecem pistas sobre a paleodistribuição de elementos da fauna extinta de Meliponini, o que auxilia nas inferências do início da diversificação da tribo. O fóssil mais antigo das abelhas sem ferrão, *Cretotrigona prisca*, do âmbar de Nova Jersey, é datado do final do Cretáceo (ca 66 Ma) (Michener & Grimaldi 1988a, b; Engel 2000), idade semelhante ao estimado por nós para o início da diversificação do clado Neotropical. Provavelmente, elementos da linhagem Neotropical também ocupavam a região Neártica na transição do Cretáceo para o Paleogeno. Além disso, a presença de *Kelneriapis eocenia* (Engel 2001; Engel & Michener 2013a, b), do âmbar Báltico (ca 45 Ma), e de *Exebotrigona velteni* Michener & Engel, 2013, do âmbar de Lioning na China (Michener & Engel 2013b), datado do Ypresiano do Eoceno (50-53 Ma) (Wang et al. 2014), são fortes evidências de que Meliponini ocupava grande parte da região Paleártica. Uma distribuição tão ampla em regiões de média latitude pode ter sido favorecida pelo Máximo Termal do Eoceno (ca 55 Ma), que é associado com rápidas mudanças da fauna em todo o mundo (Blois et al. 2013). *Meliponorytes*, no âmbar da Sicília, Itália, datado do Mioceno, também reforça a paleodistribuição de Meliponini. O fato de haver um fóssil na Itália apenas do Mioceno é devido ao fato de que essa região esteve alagada até pelo menos o Oligoceno (ca 23-34 Ma) (Scotese 2016).

Portanto, baseado em nossas datações moleculares e reconstruções das áreas ancestrais, foi possível inferir sobre os padrões biogeográficos de Meliponini. Nossos dados não suportam a hipótese de Meliponini ter começado sua história evolutiva ainda no Gondwana. Os registros fósseis constituem outra evidência contra a hipótese gondwânica, principalmente por ser menos parcimonioso explicar a ocorrência de *C. prisca* no âmbar de Nova Jersey há cerca de 66 Ma. A questão sobre Meliponini ter se dispersado via Estreito de Bering ou via Atlântico Norte ainda continua em aberto. No entanto, a descoberta de novos fósseis pode auxiliar em novas elucidções sobre a história evolutiva das abelhas sem ferrão.

Por onde andou o clado Plebeia nos últimos 28 milhões de anos?

Nossos resultados do BBM indicam alta probabilidade (81%) para o início da diversificação do clado Plebeia na sub-região Paranaense, que corresponde atualmente a grande parte do bioma Mata Atlântica, para o final do Paleogeno (28.5 Ma) (Figura 3). Igualmente, os gêneros *Friesella* e *Lestrimelitta* também possuem sua área ancestral inferida para a sub-região Paranaense (100%). De acordo com nossos resultados,

Friesella permaneceu na sub-região Paranaense com dispersões recentes para a sub-região Chaquenha. Embora nossos resultados indiquem que *Lestrimelitta* começou a se diversificar na sub-região Paranaense, nossa amostragem não permite uma ampla discussão sobre sua história biogeográfica. No entanto, informações sobre a taxonomia e distribuição geográfica das espécies brasileiras podem ser encontradas em Marchi & Melo (2006).

O clado **I** de *Plebeia*, composto pelos grupos *minima* e *moireana* (Capítulo 1), tem o início de sua história evolutiva ainda incerto. De acordo com nossas análises, o ancestral comum mais recente desses grupos pode ter ocupado a sub-região Amazônica (46%) ou o Domínio Mesoamericano (44%) há cerca de 21 Ma (95% HPD = 16-25.5 Ma), o que corresponde ao início do Mioceno na idade Aquitaniana. Entretanto, o evento de cladogênese mais antigo do clado **I** (ca 18 Ma) ocorreu no grupo *minima* na sub-região Amazônica (100%) (Figura 3). Esses dados sugerem que a linhagem ancestral desse clado ocupava a área norte da América do Sul na transição Oligoceno-Mioceno antes da existência de grandes zonas húmidas com lagos rasos e pântanos desenvolvidos, principalmente no oeste amazônico (Webb 1995; Hoorn et al. 2010).

Dispersões de elementos da fauna sul-americana para a América Central e México já no Mioceno só pode ser explicada com a presença de rotas de dispersão entre essas áreas mais antigas do que o estimado anteriormente. A ligação entre a América do Sul e América do Norte, conhecida como Istmo do Panamá, foi inicialmente datada com cerca de 3 Ma (Marshall 1988), data que ainda é considerada por alguns autores (Leigh et al. 2014; O’Dea et al. 2016). No entanto, estudos que utilizaram dados moleculares, fósseis e geológicos forneceram evidências de que corredores transoceânicos já existiam desde o limite entre o Oligoceno e Mioceno (ca 23 Ma) (Hoorn & Flantua 2015). Bacon et al. (2015) propuseram que pontes terrestres já estavam disponíveis no início do Mioceno e que o fechamento definitivo do Istmo se deu entre 6 e 10 Ma. Montes et al. (2015) indicaram que grande parte da ligação entre os oceanos Atlântico e Pacífico desapareceu entre 13 e 15 Ma. Além disso, trocas de elementos da fauna de abelhas entre as regiões Neotropical e Neártica, anteriores a 3 Ma, são documentadas por outros estudos (Praz & Packer 2014; Martins et al. 2014; Martins & Melo 2016) e reforçam nossos resultados.

O clado **II** de *Plebeia* começou a se diversificar na sub-região Paranaense na metade do Mioceno há cerca de 16 Ma (95% HPD = 12-22 Ma). Suas linhagens ancestrais permaneceram nessa sub-região até pelo menos 10 Ma. Dispersões para a

sub-região Amazônica e Chaquenha ocorreram no final do Mioceno (ca 8 Ma). As ocupações dos domínios Mesoamericano e Pacífico se deram nos últimos 3 Ma, o que coincide com o fechamento definitivo do Istmo do Panamá (Leigh et al. 2014; Bacon et al. 2015; Montes et al. 2015; O'Dea et al. 2016). Além da conexão física estabelecida entre os continentes Sul e Norte Americano, durante a última glaciação do Quaternário (ca 3 Ma), o nível dos oceanos baixou drasticamente, ampliando as porções de terra emergentes no Panamá e criando um corredor de clima árido parecido com as savanas atuais, o que pode ter favorecido o grande intercâmbio entre as biotas da América do Norte e do Sul, conhecido como GABI (Global American Biotic Interchange) (Webb 1991; Woodborne 2010; Bacon et al. 2016). As dispersões da sub-região Chaquenha para o domínio do Pacífico pode ter ocorrido via corredor dos Andes ou costa do Atlântico, pois essas áreas eram compostas por savanas (Silva & Bates 2002; Zanella 2010) e podem ter servido de corredores de acesso às regiões áridas recém emergidas do Panamá no início do Pleistoceno.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos dados sugerem que elementos da fauna sul-americana de Meliponini se dispersaram da região Neotropical para a porção norte da região Neotropical muito antes das datas estimadas para o fechamento do Istmo do Panamá, o que reforça a hipótese de rotas transoceânicas do início do Mioceno (ver Bacon et al. 2015 e Montes et al. 2015). No entanto, as dispersões do final do Neogeno e início do Quaternário (ca 3 Ma) estão de acordo com as hipóteses que relacionam a última glaciação ao GABI (ver Bacon et al. 2016). Além disso, nossos resultados sugerem que a origem de Meliponini se deu na América do Sul, após a separação dos continentes sul-americano e africano. E, por fim, o clado Plebeia se originou na sub-região Paranaense durante o Oligoceno (ca 28 Ma), com dispersões para a Amazônia e México durante o início do Mioceno, e posteriores dispersões para a Amazônia, sub-região Chaquenha, Domínio do Pacífico e Mesoamericano durante o Tortoniano (ca 10 Ma).

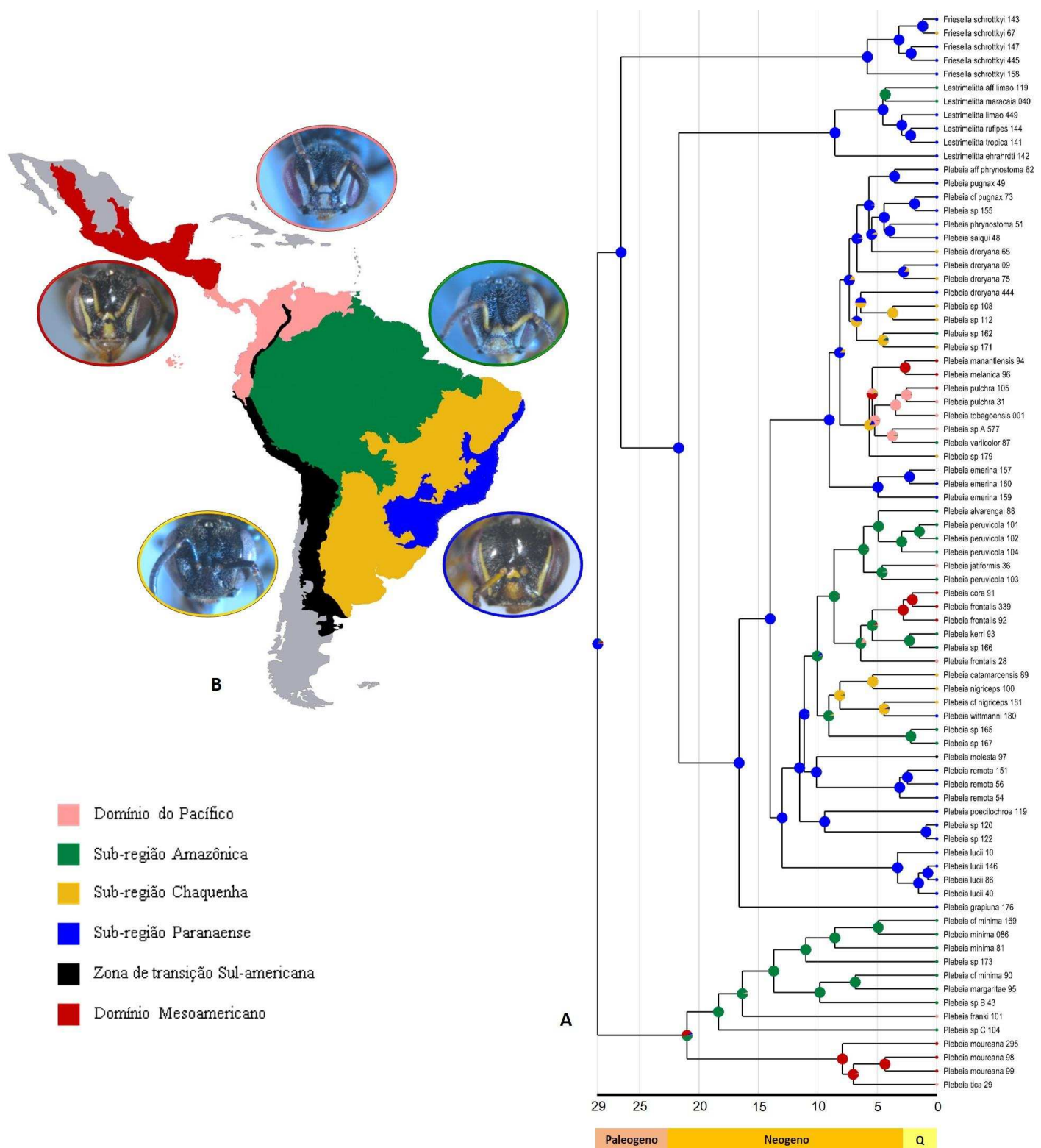


Figura 3: A) Cronograma do clado *Plebeia* resultante da análise BBM (Bayesian binary MCMC) implementada no RASP. Os gráficos em pizza mostram a probabilidade da área ancestral de cada nó da árvore. B) Mapa com as regiões para região Neotropical propostas por Morrone (2010, 2014) e vista frontal da cabeça de exemplares representando cada região do mapa. *Plebeia tica* da Costa Rica (salmão); *Plebeia minima* (verde); *Plebeia droryana* (azul); *Plebeia frontalis* (vermelho); e *Plebeia sp.* 179 (amarelo).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bacon, C.D., Silvestro, D., Jaramillo, C., Smith, B.T., Chakrabarty, P., Antonelli, A., 2015. Biological evidence supports an early and complex emergence of the Sthmus of Panama. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 112(19): 6110-6115
- Bacon, C.D., Molnar, P., Antonelli, A., Crawford, A.J., Montes, C., Vallejo-Pareja, M.C., 2016. Quaternary glaciation and the Great American Biotic Interchange. *Geology*, DOI: 10.1130/G37624.1
- Blois, J.L., Zarnestke, P.L., Fitzpatrick, M.C., Finnegan, S., 2013. Climate change and the past, present, and future of biotic interactions. *Science*, 341: 499-504
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C-H., Xie, D., Suchard, MA., Rambaut, A., & Drummond, A. J. 2014. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology*, 10(4), e1003537. doi:10.1371/journal.pcbi.1003537
- Camargo, J.M.F., Wittmann, D., 1989. Nest architecture and distribution of the primitive stingless bee, *Mourella caerulea* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae): Evidence for the origino f *Plebeia* (s. lat.) on the Gondwana continent. *Studies on Neotropical Fauna and Environmental*, 24(4): 213-229
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M., 1992. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponini (Hymenoptera, Apidae): a mini review. *Apidologie*. 23: 509-522
- Camargo, J.M.F., Moure, J.S., 1996. Meliponini Neotropicais: o gênero *Geotrigona* Moure, 1943 (Apinae, Apidae, Hymenoptera), com especial referência à filogenia e biogeografia. *Arquivos de Zoologia*, 33(3): 95-161
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M., 2003. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae) – bionomia e biogeografia. *Revista Brasileira de Entomologia*, 47(3): 311-372
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M., 2004. Meliponini neotropicais: o gênero *Ptilotrigona* Moure (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 48(3): 353-377
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M., 2007. Notas sobre a bionomia de *Trichotrigona extranea* Camargo & Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Revista Brasileira de Entomologia*, 51(1): 72-81
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M., 2013. Meliponini Lapeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D., Melo, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees* (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acessado em 05/09/2016
- Cardinal, S., Straka, J., Danforth, B.N., 2010. Comprehensive phylogeny of apid bees reveals the evolutionary origins and antiquity of the cleptoparasitism. *Proceedings of National Academy of Sciences*. 107(37): 16207-16211
- Cardinal, S., Danforth, B.N., 2011. Tha antiquity and evolutionary history of social behavior in bees. *Plos ONE*, 6(6): 1-9
- Cardinal, S., Danforth, B.N., 2013. Bees diversified in the age of eudicots. *Proceedings of the Royal Society, B*, 280: 20122686

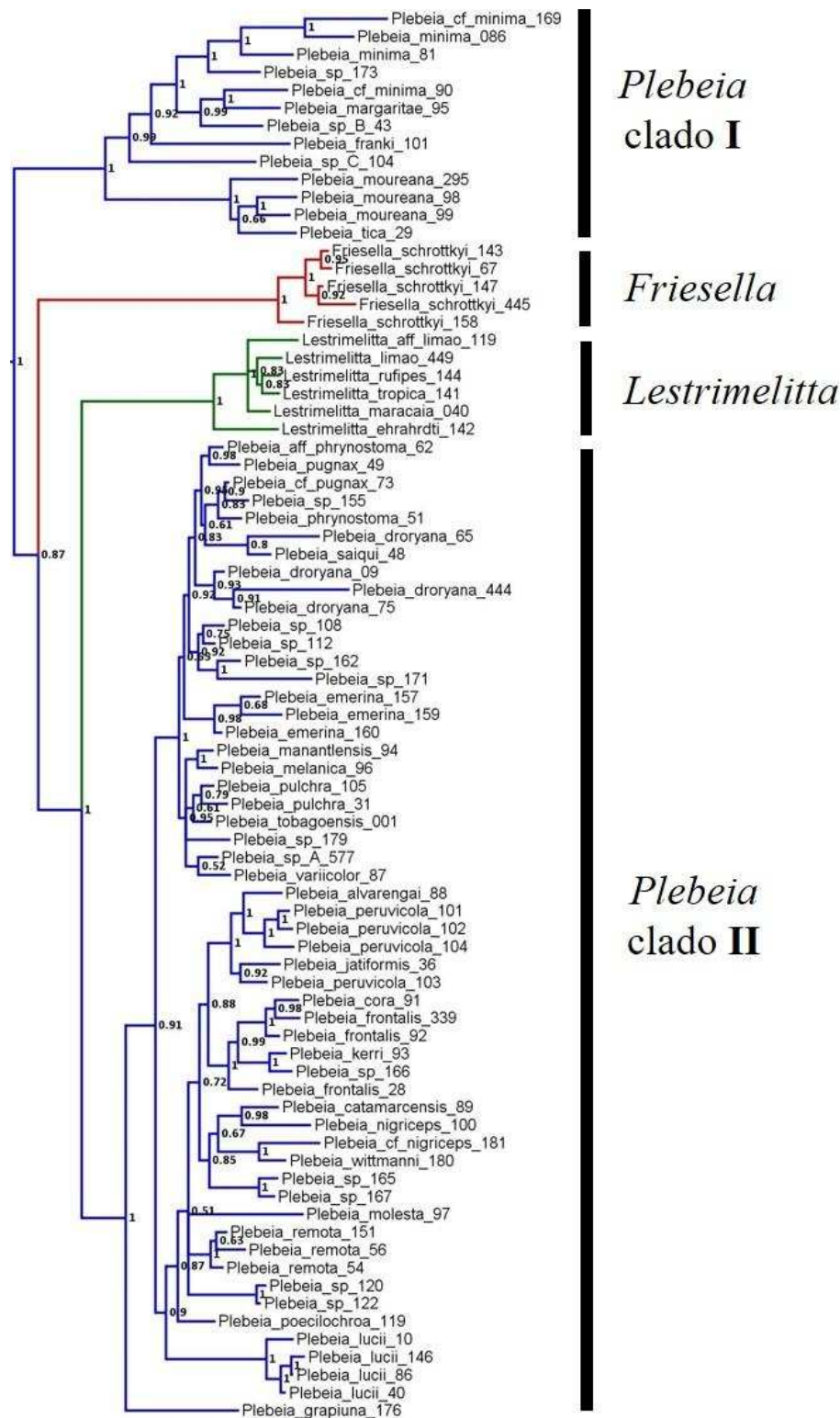
- Costa M.A., Del Lama, M.A., Melo, G.A.R., Sheppard, W.S., 2003. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. *Apidologie*, 34, 73-84
- Danforth, B.N., Cardinal, S., Praz, C., Almeida, E.A.B., Michez, D., 2012. The impact of molecular data on our understanding of bee phylogeny and evolution. *Annual Review of Entomology*, 58: 57-78
- Donoghue, M.J., Bell, C.D., Lit, J. 2001. Phylogenetic patterns in northern hemisphere plant geography. *International Journal Plant Science*, 162(6 Suppl.): S41-S52
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *Plos Biology*, 4(5): 699-710
- Drummond, A.J., Bouckaert, R.R., 2015. Bayesian evolutionary analysis with BEAST. Cambridge University Press, United Kingdom. 249 pp.
- Eardley, C.D., 2004. Taxonomic revision of the African stingless bees (Apoidea: Apidae: Apinae: Meliponini). *African Plant Protection*, 10: 63-96
- Engel, M.S. 2000. A new interpretation of the oldest fossil bee (Hymenoptera). *American Museum Novitates*, 3296: 1-11
- Engel, M.S., 2001. A monograph of the Baltic amber bees and evolution of the Apoidea (Hymenoptera). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 259: 192 pp.
- Engel, M.S., Michener, C.D., 2013a. Geological history of the stingless bees (Apidae: Meliponini). In Vit, P., Roubik, D. W. (Eds). *Stingless bees process honey and pollen in cerumen pots*. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes; Mérida, Venezuela. Disponível em: <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/35292>. Acessado em 02/08/2016
- Engel, M.S., Michener, C.D., 2013b. A minute stingless bee in Eocene Fushan amber from northeastern China (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Melittology*, 14: 1-10
- Grimaldi, D.A., 1999. The co-radiation of pollinating insects and angiosperm in the Cretaceous. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 86: 373-406
- Guo, P., Liu, Q., Xu, Y., Jiang, K, Hou, M., Ding, L., Pyron, R.A., Burbrink, F.T., 2012. Out of Asia: Natricine snakes support the Cenozoic beringia dispersal hypothesis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63: 825-833
- Heard, T.A., 1999. The role of stingless bees in crop pollination. *Annual Review of Entomology*, 44:183-206
- Hedtke, S.M., Patiny, S., Danforth, B.N., 2013. The bee tree of life: a supermatrix approach to apoid phylogeny and biogeography. *BMC Evolutionary Biology*, 13: 138
- Hines, H., 2008. Historical biogeographic, divergence times, and diversification patterns of bumble bees (Hymenoptera: Apida: Bombus). *Systematic Biology*, 57(1): 58-75
- Ho, S.Y., Phillips., 2009. Accounting for calibration uncertainty in phylogenetic estimation of evolutionary divergence times. *Systematic Biology*, 58(3): 367-380
- Hoorn, C., et al., 2010. Amazonian through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science*, 330: 927-931
- Hoorn, C., Flantua, S., 2015. An early start for the Panama land bridge. *Science*, 348(6231): 186-187
- Iturralde-Vinent, M.A., MacPhee, R.D.E. Age and paleogeographical origin of Dominican amber. *Science*, 273: 1850-1852

- Jokat, W., Boebel, T., König, M., Meyer, U., 2003. Timing and geometry of early Gondwana breakup. *Journal of Geophysical Research*, 108(2428): 1-15
- Kerr, W.E., Maule, V., 1964. Distribution of stingless bees and its implications (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the New York Entomological Society*, 72(1): 2-18
- Leigh, E.G., O'Dea, A., Vermij, G.J., 2014. Historical biogeography of the Isthmus of Panama. *Biological Review*, 89: 148-172
- Marchi, P., Melo, G.A.R., 2006. Revisão taxonômica das espécies brasileiras de abelhas do gênero *Lestrimelitta* Friese (Hymenoptera, Apidae, Meliponina). *Revista Brasileira de Entomologia*. 50(1): 6-30
- Marshall, L.G., 1988. Land mammals and the Great American Interchange. *American Scientist*, 76: 380-388
- Martins, A.C., Melo, G.A.R., Renner, S.S., 2014. The corbiculate bees arose from New World oil-collecting bees: Implications for the origin of pollen baskets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 80: 88-94
- Martins, A.C., Melo, G.A.R. 2016. The New World oil-collecting bees *Centris* and *Epicharis* (Hymenoptera, Apidae): molecular phylogeny and biogeographic history. *Zoologica Scripta*, 45: 22-33
- Melo, G.A.R., 2016. *Plectoplebeia*, a new Neotropical genus of stingless bees (Hymenoptera: Apidae). *Zoologia*, 33(1): e20150153
- Michener, C.D., 1974. *The Social behavior of the bees*. Cambridge, Harvard University Press. 404 p
- Michener, C.D., 1979. Biogeography of the bees. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 66(3): 277-347
- Michener, C.D., 1982. A new interpretation of fossil social bees from the Dominican Republic. *Sociobiology*, 7(1): 37-45
- Michener, C.D., Grimaldi, D.A., 1988a. A *Trigona* from late cretaceous amber of New Jersey (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *American Museum Novitates*, 2917: 1-10
- Michener, C.D., Grimaldi, D.A., 1988b. The oldest fossil bee: Apoid history, evolutionary stasis, and antiquity of social behavior. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 85: 6424-6426
- Michener, C.D., 1990. Classification of the Apidae. *University of Kansas Science Bulletin*, 54: 75-153
- Michener, C.D., 2007. *The Bees of the World*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. 953 p
- Michez, D., Vanderplanck, M., Engel, M.S. 2012. Fossil bees and their plant associates. In: Patiny, S. (Ed) *Evolution of plant-pollinator relationships*. Cambridge University Press, Cambridge, 103-164.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees". In: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1 - 8.
- Montes, C., Cardona, A., Jaramillo, C., Pardo, A., Silva J.C., Valencia, V., Ayala, C., Pérez-Angel, L.C., Rodríguez-Parra, L.A., Ramirez, V., Niño, H., 2015. Middle Miocene closure of the Central America seaway. *Science*, 348(6231): 226-229
- Morrone, J.J., 2010. América do Sul e geografia da vida: Comparação de algumas propostas de regionalização. In: *Biogeografia da América do Sul: Padrões & Processos*, São Paulo: Editora Roca. 306 pp

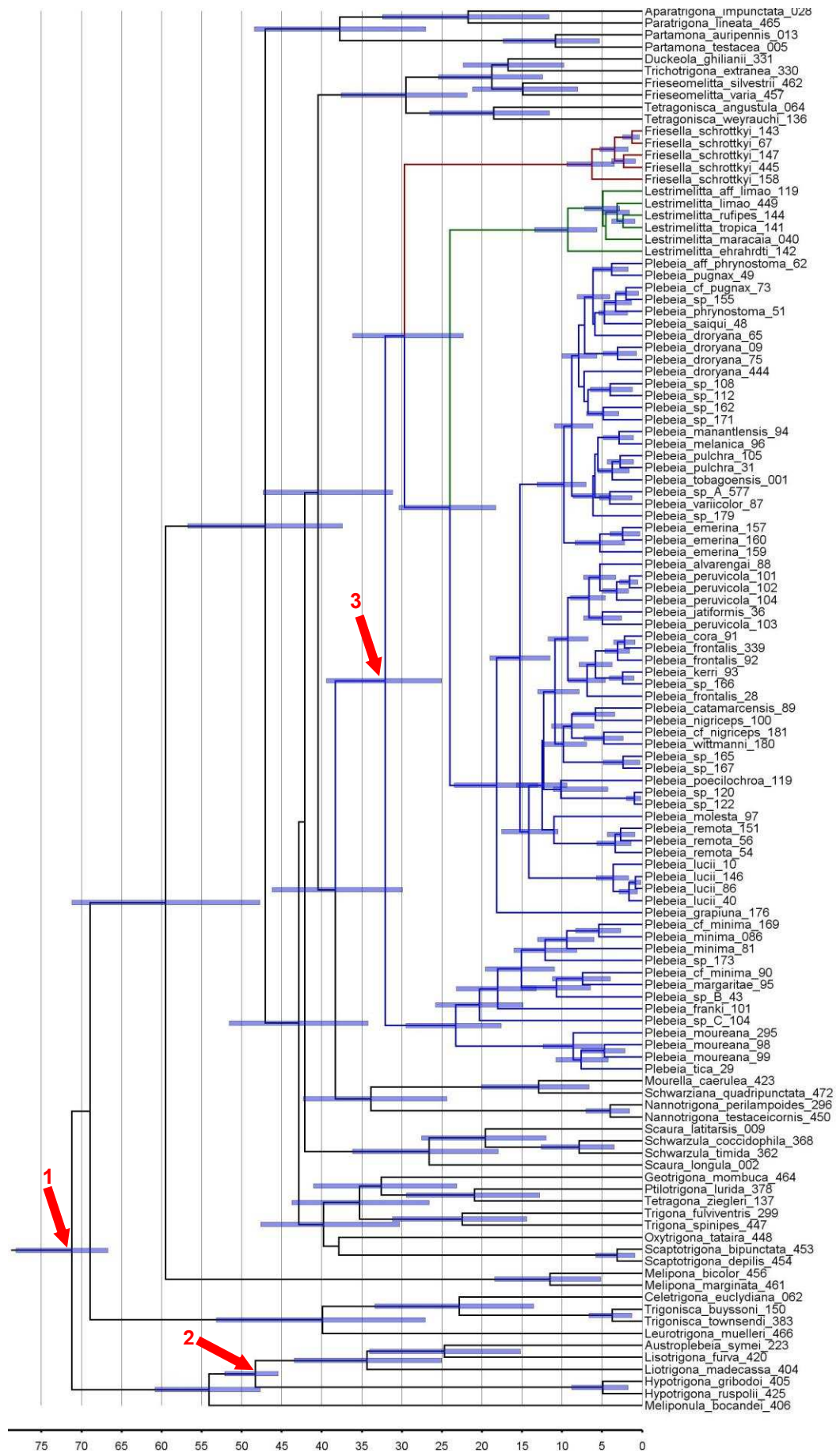
- Morrone, J.J., 2014. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa*, 3782(1): 001-110
- Moure, S.J., 1946. Contribuição para o conhecimento dos Meliponinae (Hymenoptera: Apoidea). *Revista Brasileira de Entomologia*, 17(3): 437-443
- Moure, J.S., 1951. Notas sobre Meliponinae (Hymenoptera - Apoidea). *Dusenya*, 2: 25-70
- Moure, J.S., 1961. A preliminary supra-specific classification of the world Meliponini bees (Hymenoptera, Apoidea). *Studia Entomologica*, 4(1-4): 181-242
- Moure, J.S., Camargo, J.M.F. 1978. A fossil stingless bee from copal (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 51(4): 560-566
- O'Dea, A., et al., 2016. Formation of the Isthmus of Panama. *Science Advances*, 2: e1600883
- Pedro, S.R.M., Camargo, J. M. F., 2003. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 47(supl. 1): 1-117
- Pedro, S.R.M., 2014. The stingless bee fauna in Brazil. *Sociobiology*, 61(4): 348-354
- Praz, C., Packer, L., 2014. Phylogenetic position of the genera *Ancyla* and *Tarsilia* (Hymenoptera: Apidae): A remarkable base compositional bias and an early Paleogene geodispersal from North America to the Old World. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 81: 258-270
- Rambaut, A., 2009. FigTree, Version 1.3.1. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- Rambaut, A., Drummond, A., 2009. Tracer, Version 1.5. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>
- Ramirez, S.R., Nieh, J.C., Quental, T.B., Roubik, D.W., Imperatriz-Fonseca, V.L.I., Pierce, N.E., 2010. A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56: 519-525
- Rasmusen C., Cameron, S.A., 2007. A molecular phylogeny of the old world stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the non-monophyly of the large genus *Trigona*. *Systematic Entomology*, 32, 26-39
- Rasmussen, C., Cameron, S.A., 2010. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99: 206-232
- Ronquist, F., et al., 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. *Systematic Biology*, 16: 1-4
- Roubik, D.W., 2006. Stingless bee nesting biology. *Apidologie*, 37: 124-143
- Sakagami, S.F. 1978. *Tetragonula* stingless bees of the continental Asia and Sri Lanka (Hymenoptera, Apidae). *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University*, VI, Zoology, 21(2): 165-247
- Sanderson, M.W., Farr, T.H., 1960. Amber with insect and plant inclusions from Dominican Republic. *Science*, 131: 1313
- Sanmartín, I., Enghoff, H., Ronquist, F., 2001. Patterns of animal dispersal, vicariance and diversification in the Holarctic. *Biological Journal of the Linnean Society*, 73: 345-390
- Sauquet, H., 2013. A practical guide to molecular dating. *Comptes Rendus Palevol*, 12: 355-367
- Scotese, C.R., 2016. PALEOMAP PaleoAtlas for GPlates and the PaleoData Plotter Program, PALEOMAP Project. Disponível em: <http://www.earthbyte.org/paleomap/paleoatlas-for-gplates/>. Acessado 03/10/2016

- Sedivy, C., Dorn, S., Müller, A., 2013. Molecular phylogeny of the genus *Hoplitis* (Megachilidae: Osmiini) – how does nesting biology affect biogeography? *Zoological Journal of the Linnean Society*, 167: 28-42
- Silva, J.M.C., Bates, J.M., 2002. Biogeographics patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savana hotspot. *Bioscience*, 52: 225-233
- Smith, T., Rose, K.D., Gingerich, P.D., 2006. Rapis Asia-Europe-North America geographic dispersal of earliest Eocene primate *Teilhardina* during the Paleocene-Eocene Thermal Maximum. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 103(30): 11223-11227
- Silveira F.A., Melo, G.A.R., Almeida, E.A.B., 2002. Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. Belo Horizonte, 221 pp
- Upchurch, P., 2008. Gondwana break-up: legacies of a lost world? *Trends in Ecology and Evolution*, 23(4): 229-236
- Wang, B., et al., 2014. A diverse palobiota in early Eocene Fushun amber from China. *Current Biology*, 24: 1606-1610
- Webb, S.D., 1991. Ecogeography and the Great American Interchange. *Paleobiology*, 17(3): 266-280
- Webb, S.D., 1995. Biological implications of the middle Miocene Amazon seaway. *Science*, 269: 361-362
- Wille, A., Chandler, L. C., 1964. A new stingless bee from the Tertiary amber of the Dominican Republic (Hymenoptera; Meliponini). *Revista de Biología Tropical*, 12: 187–195.
- Wille, A., Orozco, E., 1975. Observations on the founding of a new colony by *Trigona cupira* (Hymenoptera: Apidae) in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 22(2): 253-287
- Wille, A., 1977. A general review of the fossil stingless bees. *Revista de Biología Tropical*, 25(1): 43-46
- Wille, A., 1979. Phylogeny and relationship among the genera and subgenera of the stingless bees (Meliponinae) of the world. *Revista de Biología Tropical*, 27: 241-277
- Wille, A., 1983. Biology of stingless bees. *Annual Review of Entomology*, 28:41-64
- Wilf, P., Cúneo, N.R., Escapa, I.H., Pol, D. Woodborne, M.O. 2013. Splendid and seldom isolated: The palogeography of Patagonia. *Annual Review of Earth and Planetary*, 41: 561-603
- Woodburne, M.O., 2010. The Great American Biotic Interchange: Dispersals, tectonics, climate, sea level and holding pens. *Journal of Mammalian Evolution*, 17: 245-264
- Yu, Y., Harris, A.J., Blair, C., He., 2015. RASP (Reconstruction Ancestral State in Phylogenies): A tool for historical biogeographic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 87: 46-49
- Zanella, F.C.V., 2010. Evolução da biota da diagonal de formações abertas da América do Sul. In: In: *Biogeografia da América do Sul: Padrões & Processos*, São Paulo: Editora Roca. 306 pp.

ANEXOS



ANEXO I: Inferência Bayesiana dos dados concatenados com implementação de modelos mistos. Os grupos externos foram retirados.



Anexo II: Cronograma da Tribo Meliponini baseado em análise Bayesiana com implementação de relógio molecular relaxado (Relaxed Molecular Clock) e distribuição LogNormal para as calibrações com fóssil, correspondente à análise D1. Os números indicam os pontos de calibração com fósseis utilizados na análise: 1) *Cretotrigona prisca*; 2) *Kelneriapis eocenica*; e 3) *Proplebeia dominicana*. As barras azuis sobre os nós representam os intervalos com 95% HPD (High Posterior Density)