



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA



Danillo Cristian Feitosa dos Santos

**RESOLUÇÃO DE IMPASSES TAXONÔMICOS POR MEIO DA METODOLOGIA
DNA BARCODING: UM ESTUDO DO CASO *EUGLOSSA AZUREA* E
*EUGLOSSA VIRIDIS***

UBERLÂNDIA – MG

2020

Danillo Cristian Feitosa dos Santos

**RESOLUÇÃO DE IMPASSES TAXONÔMICOS POR MEIO DA METODOLOGIA
DNA BARCODING: UM ESTUDO DO CASO *EUGLOSSA AZUREA* E
*EUGLOSSA VIRIDIS***

Monografia apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Solange Cristina Augusto

Coorientador: Dr. Wilson Frantine Silva

UBERLÂNDIA – MG

2020

Danillo Cristian Feitosa dos Santos

**RESOLUÇÃO DE IMPASSES TAXONÔMICOS POR MEIO DA METODOLOGIA
DNA BARCODING: UM ESTUDO DO CASO *EUGLOSSA AZUREA* E
*EUGLOSSA VIRIDIS***

Banca examinadora:

Orientadora: Profa. Dra. Solange Cristina Augusto
Instituto de Biologia - UFU

Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira
Instituto de Biotecnologia - UFU

Dr. Léo Correia da Rocha Filho
Instituto de Biologia - UFU

Coorientador: Dr. Wilson Frantine da Silva
Centro de Biociências e Biotecnologia - UENF

UBERLÂNDIA – MG

2020

*Aos meus pais e avós,
que sempre me motivaram e
apoiaram incondicionalmente,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e aos meus avós, por todo o incentivo e por terem me dado todo o suporte durante a minha graduação. Agradeço, especialmente, a minha mãe e minha vó, Dejacira e Palmira, por serem a minha maior fonte de inspiração e sabedoria em toda a minha vida.

À minha orientadora e grande amiga, Professora Dra. Solange Cristina Augusto, pela oportunidade, dedicação, paciência e apoio dados ao longo da graduação e execução deste estudo.

Ao meu amigo e coorientador, Dr. Wilson Frantine Silva, toda paciência, companheirismo e ensinamentos metodológicos durante o percurso desse estudo com abelhas.

Agradeço a Professora Dra. Sílvia Helena Sofia, que gentilmente me cedeu parte do material de estudo, e a Ms. Thaís Kotelok Diniz pela ajuda com o equipamento de sequenciamento.

Agradeço ao Dr. Léo Correia da Rocha Filho e Professor Dr. Carlos Ueira-Vieira pelo aceite em compor a banca examinadora e pelas valorosas contribuições ao estudo.

Ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia (INBIO-UFU), ao Laboratório de Ecologia e Comportamento de Abelhas (LECA), ao Laboratório de Morfologia, Microscopia e Imagens (LAMOVI), ao Laboratório de Citogenética do Instituto de Biotecnologia (IBITEC – UFU) e ao Laboratório de Genética e Ecologia Animal, Universidade Estadual de Londrina (UEL) por toda a infraestrutura oportunizada para o presente estudo. Agradeço especialmente a grande equipe, de “solitários” e “sociais”, do LECA que me recebeu no início da graduação e me contagiou com o conhecimento, amor e fascínio pelas abelhas.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Uberlândia (PROPP/UFU) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

Aos meus queridos(as) amigos(as) Noemi, Miriam, Pietro, Jenyffer, Paulo, Tarcio, Anelise, Karen, Cris e Lílian por todo o carinho, apoio, companheirismo e momentos de diversão durante a graduação. Cada lágrima, abraço, estímulo e gargalhada que nos proporcionamos trouxeram mais perseverança na graduação.

A todos esses e outros mais, meu eterno obrigado.



“The bee’s life is like a magic well: the more you draw from it, the more it fills with water.”

- Karl von Frisch

RESUMO

A tribo Euglossini inclui cerca de 240 espécies distribuídas em cinco gêneros, dos quais o gênero *Euglossa* compreende 54% das espécies atualmente descritas. Dentre essa matriz de espécies, poucos são os casos como o de *Euglossa azurea* e *Euglossa viridis*, espécies cujas semelhanças morfológicas e padrões de distribuição na Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado levaram a impasses taxonômicos com abelhas das orquídeas no Brasil. Considerando a intrínseca relação destas abelhas com seus ambientes de origem e seu potencial informativo para a compreensão da biogeografia e conservação tanto do Cerrado quanto das abelhas Euglossini, o presente estudo tem por objetivo testar a hipótese de *E. azurea* e *E. viridis* constituírem unidades taxonômicas distintas. Cerca de 650 pares de base do gene mitocondrial citocromo oxidase c subunidade I (COI) provenientes de 7 e 6 indivíduos de cada espécie foram avaliadas. Análises de distância genética com base no modelo Kimura-2-Parâmetros (K2P) foram empregadas observando os padrões de distância encontrados para a tribo Euglossini como parâmetro de comparação. Os resultados do presente estudo elucidam o status taxonômico das espécies por meio de ferramentas moleculares e auxiliam na compreensão dos padrões biogeográficos e de abelhas Euglossini no Cerrado no Triângulo Mineiro. Adicionalmente, ao contribuir para o correto reconhecimento do status taxonômico das espécies, o presente estudo auxiliará em projetos futuros de manejo e conservação tanto das espécies em questão quanto das demais espécies de Euglossini.

Palavras-chave: Abelhas das orquídeas, *DNA barcoding*, *Euglossella*, biogeografia.

ABSTRACT

The tribe Euglossini contains approximately 240 species divided among five genera, one of which is *Euglossa* and comprises 54% of the currently described species. Among this species matrix, few are the cases such as the one seen in *Euglossa azurea* and *Euglossa viridis*, which due to their morphological similarities and distribution pattern in the Amazon, Atlantic Forest, and Cerrado region led to taxonomic implications with orchid bees in Brazil. Considering the inherent relationship of these bees with their original habitat and their informative potential to the comprehension of biogeography and conservation both of the Cerrado and the Euglossini, this study aims to test the hypothesis of *E. azurea* and *E. viridis* constituting distinct taxonomic entities. Around 650 base pairs of the mitochondrial gene cytochrome c oxidase I (COX1) from 7 and 6 individuals of each species respectively evaluated. Genetic distance analyses based on the Kimura-2-parameter (K2P) were used, observing the distance patterns found for the Euglossini tribe as a comparison parameter. The results of this study elucidate the taxonomic status of these species derived from molecular tool analyses and help in the understanding of biogeographic patterns of Euglossini bees in the Cerrado region of Triângulo Mineiro. This study also contributes to the correct recognition of the taxonomic status of these species and will be helpful in future management and conservation projects regarding the Euglossini tribe.

Key-words: Orchid bees, *DNA barcoding*, *Euglossella*, biogeography.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1** – Distribuição e localidades das espécies estudadas e das amostras utilizadas.
..... 6
- Figura 2** – Alinhamento das sequências COI no *software* MEGA v10.0.....7
- Figura 3** – Representação gráfica das distâncias genéticas estimadas para 17 sequências de oito espécies do gênero *Euglossa* através do modelo de Kimura-2-Parâmetros agrupado pelo método de *Neighborn-Joining*. Imagens ilustrativas das amostras GenBank seguindo Hinojosa-Díaz & Engel (2014) 10
- Tabela 1** – Distâncias genéticas par-a-par estimadas de dezenove sequências de oito espécies do gênero *Euglossa* através do modelo K2P. Diagonal inferior apresenta os valores de distância genética transformados em porcentagem e a diagonal superior os desvios padrão..... 9

Sumário

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS.....	4
RESULTADOS.....	8
DISCUSSÃO	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13

INTRODUÇÃO

A tribo Euglossini é um grupo de abelhas corbiculadas com distribuição neotropical que reúne cerca de 240 espécies em cinco gêneros: *Aglae* Lepelletier & Serville, 1825, *Eufriesea* Cockerell, 1908, *Eulaema* Lepelletier, 1841, *Exaerete* Hoffmannsegg, 1817 e *Euglossa* Latreille (NEMÉSIO, 2009; ROUBIK, D.; HANSON, 2004) além de um gênero extinto, (*Paleoeglossa*), descrito na região da América Central (POINAR-JR., 2009). Também conhecidos popularmente como abelhas das orquídeas, esses himenópteros possuem alguns traços instigantes quando comparados às outras espécies da família Apidae, tais como: (i) a vasta diversidade em áreas úmidas; (ii) a coloração iridescente do tegumento, variando do amarelo-acastanhado ao azul, verde e intermediários dessa cor; (iii) o extenso comprimento da língua; e (iv) modificações das pernas nos machos, relacionadas à coleta e armazenamento de compostos aromáticos (MICHENER, 2007; ROUBIK, D.; HANSON, 2004).

Uma outra característica que ocorre no grupo, é a presença de espécies cleptoparasitas nos gêneros *Aglae* e *Exaerete* as quais atacam ninhos de *Eufriesea* e *Eulaema* (KIMSEY, 1979). Nessa relação ecológica, as fêmeas cleptoparasítas invadem os ninhos de outras abelhas solitárias e ovipõe em células de cria já provisionadas, beneficiando-se assim do trabalho de fêmeas hospedeiras (GARÓFALO; ROZEN JR., 2001; ROZEN, 2003).

Como as outras abelhas, as fêmeas Euglossini possuem forte relação com as angiospermas, atuando na polinização de diversas famílias durante a coleta de recursos florais e vegetais, tais como resina, néctar e pólen para o provisionamento das células de cria (ARMBRUSTER; WEBSTER, 1979; DRESSLER, 1968; JANZEN, 1971; WILLIAMS; DODSON, 1972). No entanto, os machos da tribo se destacam na polinização de espécies da família Orchidaceae pois buscam, ativamente, substâncias aromáticas nas flores dessas plantas e em outras fontes não florais, tais como madeira em decomposição, fezes e algumas espécies de fungos (CAPPELLARI; HARTER-MARQUES, 2010; DRESSLER, 1968; ELTZ *et. al*, 2007; SILVEIRA; ALMEIDA, E A B; MELO, 2002; WILLIAMS; DODSON, 1972). Tais recursos exógenos são coletados e armazenados em estruturas especializadas presentes nas pernas posteriores dos machos para posteriormente serem exibidos no território de corte das fêmeas

(DRESSLER, 1968; ELTZ; ROUBIK; WHITTEN, 2003; KIMSEY, 1984; PEMBERTON; WHEELER, 2006)

Com a identificação dos compostos coletados pelos machos (DODSON *et. al*, 1969), análogos sintéticos foram isolados e usados como iscas aromáticas para a atração e coleta de indivíduos em suas áreas de ocorrência. Esse método para atração dos machos Euglossini proporcionou um aumento no número de estudos com essas abelhas nas últimas décadas (AUGUSTO, 2010; ROUBIK, D.; HANSON, 2004; TOSTA, 2014).

Estudos relativamente recentes sobre a filogenia da tribo Euglossini trazem dados que sustentam que a origem e diversificação do grupo ocorreu cerca de 40 milhões de anos, na bacia Amazônica (RAMÍREZ *et. al*, 2010; ROUBIK, D.; HANSON, 2004)). No decorrer da história evolutiva da tribo, as espécies distribuíram-se na região Neotropical e atualmente abrangem o território do sul dos Estados Unidos (GRISWOLD; HERNDON; GONZALEZ, 2015) até o norte da Argentina (MOURE, J. S., MELO, G. A. R. & FARIA JR, 2012; RAMÍREZ *et. al*, 2010; ROUBIK, D.; HANSON, 2004).

No bioma Cerrado, alguns estudos conduzidos em matas de galeria e remanescentes florestais semidecíduais relatam riqueza de espécies de Euglossini similar a encontrada em alguns remanescentes de Mata Atlântica de mesma latitude (ALVARENGA; FREITAS; AUGUSTO, 2007; NEMÉSIO; AUGUSTO; ALMEIDA, 2007; TOSTA, 2018). Esses estudos também evidenciaram a ocorrência no Cerrado de espécies tidas até então pertencentes aos domínios da Amazônia e Mata Atlântica tais como, *Euglossa truncata*, *Euglossa amazonica*, *Euglossa decorata* e *Aglae caerulea* (NEMÉSIO, 2009; NEMÉSIO; AUGUSTO; ALMEIDA, 2007; SILVA *et. al*, 2013; SILVEIRA *et. al*, 2015; TOSTA, 2018).

O Cerrado está inserido entre três zonas de endemismo propostas para a tribo Euglossini: Bacia Amazônica, Floresta Atlântica e Corredor Paraguaio (RAMÍREZ *et. al*, 2010). Tal fato, aliado à hipótese de OLIVEIRA-FILHO & RATTER (1995) de que a atual área em que o bioma Cerrado ocupa foi no passado uma área de conexão entre a Bacia Amazônica e Mata Atlântica explica a ocorrência de espécies como *E. decorata* e *A. caeruleae*. Estas espécies, assim como a maioria amostrada no Bioma, estão presentes exclusivamente ou são mais associadas às áreas florestais, o que demonstra a intrínseca dependência dessas abelhas por fitofisionomias mais úmidas

do Cerrado, as quais têm sido intensamente fragmentadas nos últimos anos (SILVEIRA *et. al*, 2015).

As espécies ocorrentes no Cerrado, *Euglossa (Euglossella) azurea* Ducke, 1902 e *Euglossa (Euglossella) viridis*, Perty 1833 compõem um caso peculiar de espécies morfológicamente similares e com pontos de simpatria, especialmente no centro-oeste e sudeste brasileiros. Essas duas espécies constituem um verdadeiro impasse taxonômico que perpassa décadas de estudos com abelhas Euglossini no Brasil (HINOJOSA-DÍAZ; ENGEL, 2014).

Fatores tais como a morfologia similar e a intensa coloração azul do metassoma provocaram uma série de alterações no status taxonômico de *E. azurea* na região do Cerrado meridional. Enquanto Nemésio (2007) sugere a hipótese de uma nova espécie, *Euglossa jacquelynae*, para os indivíduos que ocorrem no Cerrado meridional dos Estados de Goiás e Minas Gerais, Moure *et. al* (2012) trata as mesmas como *E. viridis*. Hinojosa-Diaz & Engel (2014) avaliaram os exemplares de *E. jacquelynae* e *E. viridis* provenientes da região sudeste e os sinonimizaram a *E. azurea*, reestabelecendo a designação inicial de Ducke (1902).

A emblemática história de similaridade taxonômica e distribucional que cerca o reconhecimento de *E. azurae* a coloca sobre uma perspectiva biogeográfica interessante. Dessa forma, considerando a importância do *status* taxonômico para fins de conservação, e especificamente a relevância biogeográfica do presente caso, torna-se necessária a inclusão de informações adicionais que auxiliem na resolução da dúvida taxonômica entre *E. viridis* e *E. azurea*.

Nesse contexto, as ferramentas moleculares têm sido requisitadas, cada vez mais, para complementar os estudos de caso como o exposto, subsidiando as evidências de novas espécies.

Para resolver esses impasses taxonômicos, destaca-se atualmente a metodologia conhecida como DNA *barcoding* (HEBERT *et. al*, 2003; HEBERT; RATNASINGHAM; DEWAARD, 2003), que apresenta bons resultados em diversos casos, tanto em grupos animais (HEBERT *et. al*, 2004a; MORITZ; CICERO, 2004; VAN VELZEN *et. al*, 2012; WARD, 2009) como as abelhas das orquídeas (FERRARI; MELO, 2014), quanto em espécies vegetais, após algumas adaptações da metodologia (JANUARIO, 2014).

Em animais, esta metodologia se baseia no sequenciamento da porção 5' do gene mitocondrial citocromo oxidase c subunidade I (COI) que codifica uma porção transmembrana da holoenzima, combinando regiões estruturais (mais variáveis) e catalíticas (menos variáveis), o que resulta em níveis de variação mais baixos dentro de espécies em relação àqueles encontrados entre espécies diferentes (HEBERT; RATNASINGHAM; DEWAARD, 2003; SAVOLAINEN *et. al*, 2005). No caso das plantas, a metodologia DNA *Barcoding* ainda é muito questionada por pesquisadores visto o não estabelecimento de uma única região de leitura para a sequência pois a maioria dos genes e espaços intergênicos analisados em plantas se mostram eficazes como marcadores evolucionários em análises moleculares (JANUARIO, 2014; KUMAR; MAHADANI, 2016).

Considerando a importância da correta definição do *status* taxonômico como uma medida básica para a conservação de espécies e seus respectivos ambientes, reconhece-se a necessidade de pesquisas relacionadas com padrões taxonômicos como a que se propõe no presente trabalho com espécies morfologicamente similares da tribo Euglossini. Ao obter o potencial informativo do caso de *E. viridis* e *E. azurea*, poder-se-á compreender os padrões relacionados às áreas de ocorrência de abelhas das orquídeas, bem como novas informações sobre a distribuição dessas espécies e sobre a biogeografia do grupo.

OBJETIVOS

Esse estudo tem como finalidade testar a hipótese de separação das unidades taxonômicas mencionadas fazendo o uso de metodologias moleculares para subsidiar estudos futuros sobre a taxonomia, conservação e manejo.

Objetivos específicos

- (i) Levantar registros de ocorrência de *E. viridis* e *E. azurea* a fim de compreender corretamente a distribuição geográfica das espécies;
- (ii) Obter sequências da região citocromo c oxidase subunidade I (COI) das amostras de ambas as espécies e compará-las contra sequências de espécies próximas já disponíveis em bancos de dados públicos (GenBank);

- (iii) Estimar a divergência genética entre estas espécies para obter métricas balizadoras entre espécies para o reconhecimento dessas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem e área de estudo

As amostragens de sete indivíduos identificados como *E. azurea* provenientes da localidade de Uberlândia - MG foram comparadas com outras seis amostras de *E. viridis* coletadas na região costeira de Mata Atlântica (Ubatuba, SP; -23.364478 S, -44.823435 O; Salto Morato, PR; -25.1522498 S, -48.266482) (**Figura 1**). As amostragens foram realizadas nos anos de 2012 (Uberlândia, MG) e 2015 (Ubatuba – SP; Salto Morato – PR), utilizando iscas aromáticas de acordo com o protocolo descrito por Giangarelli *et. al* (2015). Registros de *E. viridis* e *E. azurea* disponíveis na literatura e em bancos de dados de coleções do Brasil foram plotados (**Figura 2**) com referência às áreas onde foram coletadas as amostras para as análises genéticas.

Espécies estudadas

O subgênero *Euglossella* é reconhecido como Grupo irmão das Euglossas *sensu lato* e o mais notoriamente distintivo por ser composto de (i) espécies com coloração do tegumento variando do amarelo-acastanhado ao azul, verde e cores intermediárias dessas, (ii) mandíbula tridentada e (iii) basitarso longo (DRESSLER, 1978; MOURE, 1967).

Reunindo cerca de 21 espécies descritas, ainda se reconhece três grupos de espécies no subgênero: *decorata*, *viridis* e *mandibularis* (HINOJOSA-DÍAZ; ENGEL, 2014; RAMÍREZ *et. al*, 2010). O grupo *viridis* se destaca por reunir treze espécies com distribuição desde o México até as regiões de Mata Atlântica do Brasil. Morfologicamente as espécies são agrupadas devido ao tegumento com um intenso brilho metálico; coloração verde, azul, roxa ou intermediárias das mesmas e distâncias interorbitais iguais ou desiguais com relação as outras espécies.

Curiosamente, apenas *E. azurea* e *E. viridis* abrangem distribuição além da Amazônia, ocupando o Cerrado e Mata Atlântica, respectivamente (**Figura 1**). Tais espécies são muito similares morfologicamente e constituem um verdadeiro impasse

taxonômico que perpassa décadas de estudos com abelhas Euglossini no Brasil (HINOJOSA-DÍAZ; ENGEL, 2014).

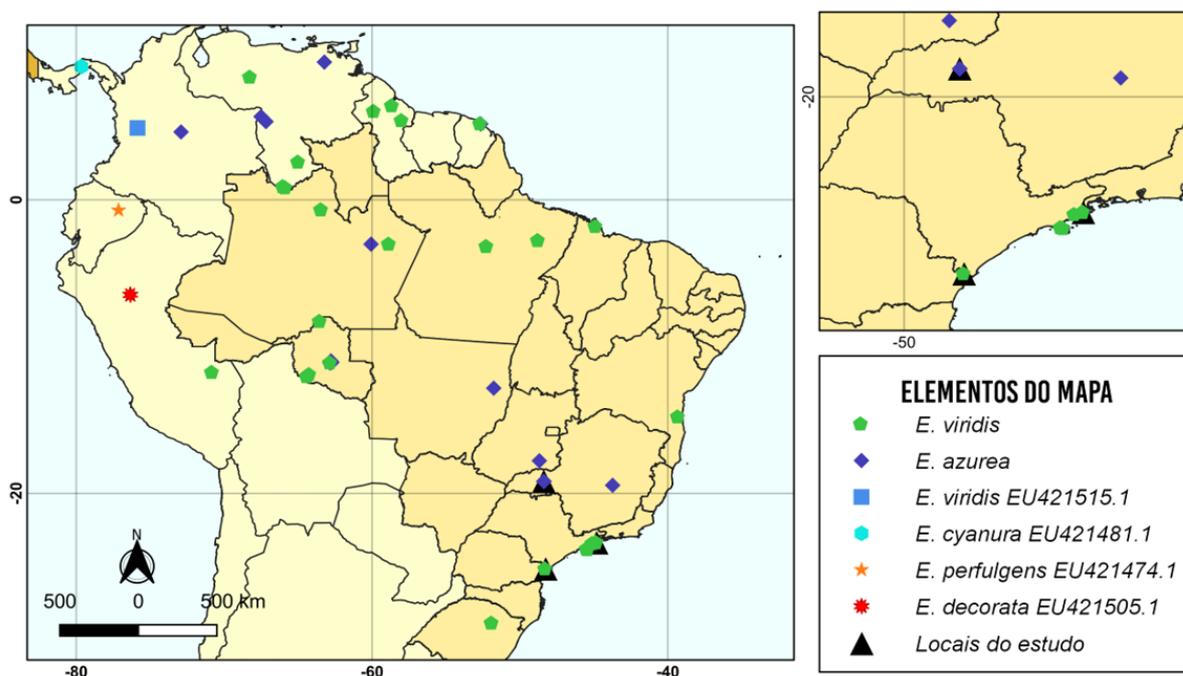


Figura 1 – Distribuição e localidades das espécies estudadas e das amostras utilizadas.

Análises moleculares

O DNA total dos machos analisados foi extraído com base no protocolo de Chelex 100 segundo Frantine-Silva *et. al* (2017) a partir da musculatura torácica de cada indivíduo. As amostras foram então quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, CA-USA) e normalizadas para 5 ng/μL em cada amostra.

Em seguida, ampliações do gene COI (citocromo oxidase c subunidade 1) via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram realizadas por meio dos *primers* LepF1 e LepR1 (HEBERT *et. al*, 2003), seguindo o protocolo descrito em Frantine-Silva *et. al* (2017). As reações de PCR foram realizadas em volume total de 15 μL, contendo 1,5 μL de tampão de reação 10x, 200 μM de cada dNTP, 3,0 mM de MgCl₂, 0,5 μM de cada primer, 2 μL de DNA, 1 U de Taq polimerase (Invitrogen) e água ultrapura para completar o volume, com os seguintes ciclos termais: desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos (94 °C por 30s, 55 °C por 30s e 72 °C por 45s) e extensão final de 10 minutos a 72 °C.

RESULTADOS

Os fragmentos obtidos da amplificação do gene mitocondrial COI foram superiores a 600 pb e suas respectivas sequências apresentaram boa qualidade para ambos os primers utilizados. Não houve evidências de inserções, deleções ou códons de parada.

Após a edição e alinhamento, as 13 sequências dos espécimes analisados foram padronizadas em uma matriz de 627 bases, juntamente com outras quatro sequências da região COI oriundas do banco de dados GenBank (*E. cyanura* EU421481.1, *E. decorata* EU421505.1, *E. perfulgens* EU421474.1, e *E. viridis* EU421515.1), pertencentes também ao subgênero *Euglossella*.

Dentre a matriz de sequências, um total de 527 pb apresentaram-se conservados para análise entre os exemplares. O restante expressou variâncias, sendo 45 *singletons* (com variação em uma sequência) e as outras 55 parcimoniosamente informativas (com variação para duas ou mais sequências).

A priori, foi detectado uma alta divergência entre as unidades taxonômicas. As estimativas de distâncias genéticas K2P entre pares de sequências variaram entre 0 e 9,01% (d.p 1,37%), com menores distâncias entre *E. viridis* EU421515.1 e *E. cyanura* EU421481.1 e maiores distâncias na comparação entre *Euglossa viridis* e *E. decorata* EU421505.1 (**Tabela 1**). Quando comparadas entre si, as amostras de *E. viridis* e *E. azurea* (objetos do presente estudo) apresentaram variância em uma escala de 5,74 e 5,98%, constatando uma divergência taxonômica significativa ao considerarmos a distância interespecífica superior a 2%.

Os dados da tabela 1 foram plotados graficamente em uma árvore de *Nighbor-Joining* de modo a resumir a distinção das distâncias genéticas K2P entre as sequências analisadas (**Figura 2**). Ao analisar a disposição dos dados na árvore, nota-se que as sequências tratadas como *Euglossa viridis*, coletadas em remanescentes de Mata Atlântica em Ubatuba – SP e Salto Morato – PR, mostram-se distantes tanto das sequências de *Euglossa azurea*, quanto da segunda amostra atribuída à *Euglossa viridis* (EU421515.1), proveniente de localidade amazônica.

Ainda, ressalta-se o valor de 0,79% de distância genética entre *E. cyanura* EU421481.1 e *E. viridis* EU421515.1. Tal valor está abaixo da média esperada para distinção de espécies entre insetos (HEBERT *et. al*, 2004b; SHEFFIELD *et. al*, 2009).

Tabela 1 – Distâncias genéticas par-a-par estimadas dezessete sequências de cinco espécies do gênero *Euglossa* através do modelo K2P. Diagonal inferior apresenta os valores de distância genética transformados em porcentagem e a diagonal superior os desvios padrão.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. <i>E. viridis</i> SP07-50		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,86	1,21	1,37	0,77	0,96	0,97	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96
2. <i>E. viridis</i> SP06-49	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,86	1,21	1,37	0,77	0,96	0,97	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96
3. <i>E. viridis</i> SP05-48	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,86	1,21	1,37	0,77	0,96	0,97	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96
4. <i>E. viridis</i> SP04-47	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,86	1,21	1,37	0,77	0,96	0,97	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96
5. <i>E. viridis</i> SP03-46	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,86	1,21	1,37	0,77	0,96	0,97	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96
6. <i>E. viridis</i> PR02-45_Salto Morato	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,86	1,21	1,37	0,77	0,96	0,97	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96
7. <i>E. viridis</i> EU421515.1	3,64	3,64	3,64	3,64	3,64	3,64		1,23	1,32	0,38	1,07	1,08	1,08	1,07	1,09	1,07	1,09
8. <i>E. perfulgens</i> EU421474.1	6,38	6,38	6,38	6,38	6,38	6,38	7,03		1,30	1,17	1,14	1,16	1,16	1,14	1,17	1,14	1,17
9. <i>E. decorata</i> EU421505.1	9,01	9,01	9,01	9,01	9,01	9,01	8,57	8,12		1,30	1,32	1,33	1,33	1,32	1,30	1,32	1,30
10. <i>E. cyanura</i> EU421481.1	2,82	2,82	2,82	2,82	2,82	2,82	0,79	6,16	8,36		1,00	1,01	1,01	1,00	1,02	1,00	1,02
11. <i>E. azurea</i> MG07-57	5,80	5,80	5,80	5,80	5,80	5,80	5,74	5,74	8,34	4,89		0,22	0,22	0,16	0,36	0,16	0,36
12. <i>E. azurea</i> MG06-56	5,98	5,98	5,98	5,98	5,98	5,98	5,95	5,95	8,56	5,10	0,32		0,00	0,16	0,35	0,16	0,35
13. <i>E. azurea</i> MG05-55	5,98	5,98	5,98	5,98	5,98	5,98	5,95	5,95	8,56	5,10	0,32	0,00		0,16	0,35	0,16	0,35
14. <i>E. azurea</i> MG04-54	5,80	5,80	5,80	5,80	5,80	5,80	5,74	5,74	8,34	4,89	0,16	0,16	0,16		0,32	0,00	0,32
15. <i>E. azurea</i> MG03-53	5,80	5,80	5,80	5,80	5,80	5,80	5,95	5,95	8,34	5,10	0,80	0,80	0,80	0,64		0,32	0,00
16. <i>E. azurea</i> MG02-52	5,80	5,80	5,80	5,80	5,80	5,80	5,74	5,74	8,34	4,89	0,16	0,16	0,16	0,00	0,64		0,32
17. <i>E. azurea</i> MG01-51	5,80	5,80	5,80	5,80	5,80	5,80	5,95	5,95	8,34	5,10	0,80	0,80	0,80	0,64	0,00	0,64	

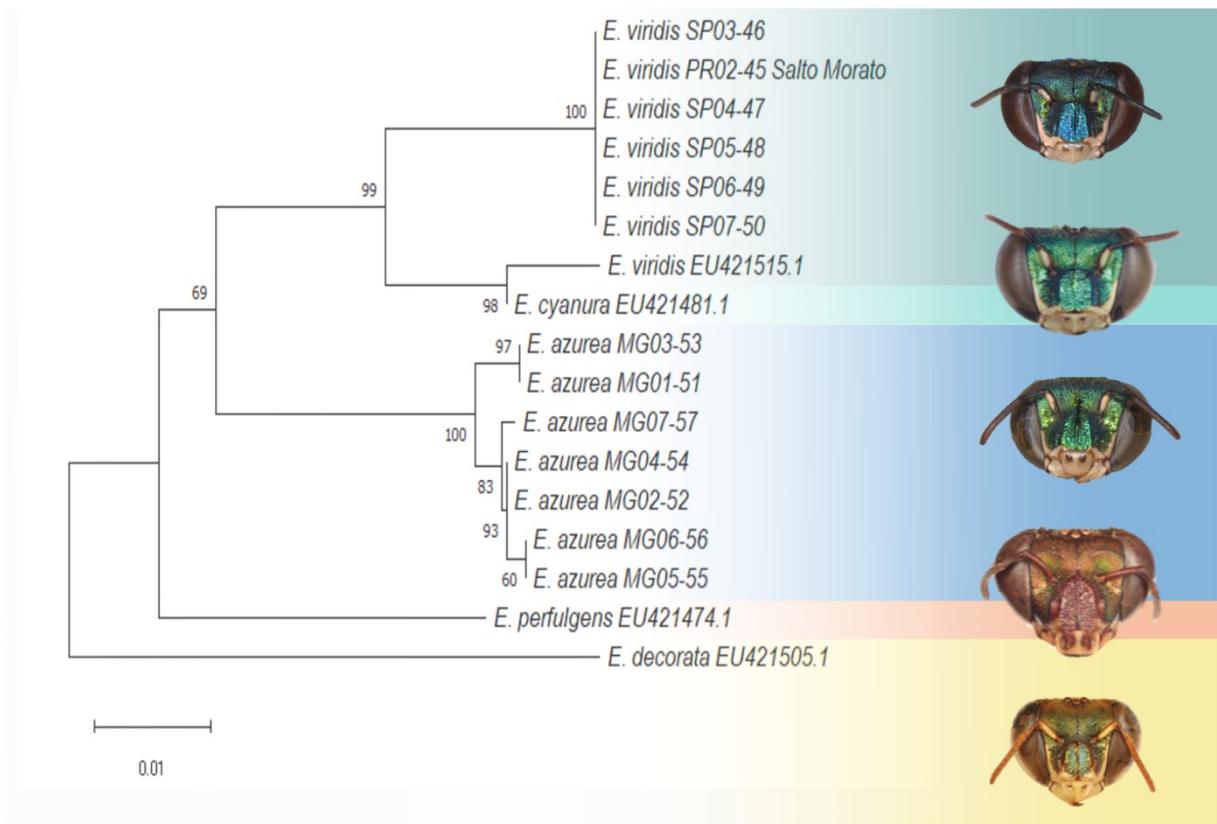


Figura 3 – Representação gráfica das distâncias genéticas estimadas para 17 sequências de oito espécies do gênero *Euglossa* através do modelo de Kimura-2-Parâmetros agrupado pelo método de *Neighbor-Joining*. Imagens representativas das amostras GenBank seguindo Hinojosa-Díaz & Engel (2014).

DISCUSSÃO

As sequências COI aqui obtidas sugerem substancialmente a hipótese de distinção entre *E. viridis* e *E. azurea*. Tais dados corroboram a hipótese proposta por Hinojosa-Díaz & Engel (2014), que trataram o caso do ponto de vista morfológico, revalidando a espécie descrita por Ducke (1902).

Nota-se a baixa distância genética (0,79%) da amostra *E. viridis* EU421515.1, de procedência amazônica, com a sequência de *E. cyanura* EU421481.1. Atribui-se tal resultado a um possível erro de identificação das amostras amazônicas, visto que a complexa similaridade de abelhas Euglossini que ocorrem na região pode acarretar uma série de impasses taxonômicos, como o que trata o presente trabalho.

Historicamente, a taxonomia do grupo tem sido discutida a cerca da coloração iridescente que é presente em grande parte dos indivíduos do grupo. Nemésio (2007)

descreve *E. jacquelynae* como uma espécie nova para o Cerrado do estado de Goiás com ocorrência adicional na região do Triângulo Mineiro, enfatizando diferenças na coloração desta com *E. viridis* e *E. cyanura*.

Ferrari & Melo (2014), utilizando ferramentas moleculares (inclusive o *DNA Barcoding*) para a resolução do problema taxonômico na variação de cores para *Euglossa iopoecila* ao longo do litoral, consideraram a coloração como um caráter pouco preciso para distinção de espécies na subtribo Euglossini.

No caso de *Euglossa jacquelynae*, Nemésio (2007) ressalta, dentre outros fatores, a posição interiorana e a coloração do integumento como uma considerável característica para a distinção da espécie quando comparada com *E. viridis*. Essas justificativas levaram a espécie ser reconhecida como sinônimo júnior de *E. viridis* por alguns autores (MOURE, J. S., MELO, G. A. R. & FARIA JR, 2012).

Um estudo do subgênero *Euglossella*, realizado por Hinojosa-Díaz & Engel (2011, 2014), sugere uma série de modificações morfológicas. Nesse trabalho, os autores analisam as séries dos grupos *mandibularis*, *decorata* e *viridis*, amostradas na região Neotropical, reestabelecem nomes e descrevem novas espécies, dentre elas *Euglossa celiae*, uma nova espécie reconhecida para a Amazônia e que possui coloração e morfologia similar a *E. viridis*, *E. cyanura* e *E. azurea*.

Interessantemente que, dentro do subgênero *Euglossella*, o grupo *viridis* possui uma distribuição mais concentrada e próxima da linha do Equador, excetuando-se *E. viridis* e *E. azurea* que ocupam regiões mais amplas a leste da Cordilheira dos Andes. Apesar das duas espécies serem originalmente descritas para a Amazônia e possuírem alguns pontos de simpatria conhecidos, essas abelhas apresentam uma peculiar distribuição no Cerrado e Mata Atlântica – *E. azurea* no Cerrado e *E. viridis* na Mata Atlântica, respectivamente – o que as insere em um interessante contexto para o estudo do ponto de vista biogeográfico visto que a Amazônia e Mata Atlântica intercambiaram fauna e flora no passado (LEDO; COLLI, 2017; OLIVEIRA-FILHO; RATTER, 1995).

Os dados moleculares aqui tratados reforçam a distinção das unidades taxonômicas, corroborando com o reconhecimento de *E. azurea* para as áreas de Cerrado do Triângulo Mineiro. A metodologia *DNA Barcoding* se mostrou eficaz para o reconhecimento de espécies de abelhas das orquídeas no presente trabalho, bem como em outros estudos (FERRARI; MELO, 2014; FRANTINE-SILVA *et. al*, 2017).

Portanto, abordagens moleculares para o estudo de impasses taxonômicos podem ser ferramentas úteis na identificação de espécies em novas áreas de coleta, corroborando com dados a respeito da biogeografia e informações que visam incrementar planos de manejo e conservação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F., *ET. AL.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, 1997.

ALVARENGA, P. E. F.; FREITAS, R. F.; AUGUSTO, S. C. Diversidade de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em áreas de cerrado do Triângulo Mineiro, MG. **Biosci. j. (Online)**, p. 30–37, 2007.

ARMBRUSTER, W. S.; WEBSTER, G. L. Pollination of Two Species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) in Mexico by Euglossine Bees. **Biotropica**, v. 11, n. 4, p. 278, 1979.

CAPPELLARI, S. C.; HARTE-MARQUES, B. First Report of Scent Collection by Male Orchid Bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) from Terrestrial Mushrooms. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 83, n. 3, p. 264–266, 2010.

JUSTINO, D. G.; AUGUSTO, S.C. Avaliação da eficiência de coleta utilizando armadilhas aromáticas e riqueza de Euglossini (Hymenoptera, Apidae) em áreas de Cerrado do Triângulo Mineiro. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 12, n. 3, p. 227–239, 2010.

DODSON, C. H. *et. al* Biologically active compounds in orchid fragrances. **Science**, v. 164, n. 3885, p. 1243–1249, 1969.

DRESSLER, R. L. Pollination by Euglossine Bees. **Evolution**, v. 22, n. 1, p. 202, 1968.

DRESSLER, R. L. An infrageneric classification of *Euglossa*, with notes on some features of special taxonomic importance (Hymenoptera; Apidae). **Biol. Trop.**, p. 12, 1978.

DUCKE, A. **Beobachtungen über Blütenbesuch, Erscheinungszeit etc. der bei Pará vorkommenden Bienen**. 7. ed. [s.l.] Allgemeine Zeitschrift für Entomologie, 1902.

EDGAR, R. C. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**, v. 5, p. 1–19, 2004.

ELTZ, T. *et. al* Enfleurage, lipid recycling and the origin of perfume collection in orchid bees. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 274, n. 1627, p. 2843–2848, 2007.

ELTZ, T.; ROUBIK, D. W.; WHITTEN, M. W. Fragrances, male display and mating behaviour of *Euglossa hemichlora*: A flight cage experiment. **Physiological Entomology**, v. 28, n. 4, p. 251–260, 2003.

FERRARI, B. R.; MELO, G. A. R. Deceiving colors: Recognition of color morphs as separate species in orchid bees is not supported by molecular evidence. **Apidologie**, v. 45, n. 5, p. 641–652, 2014.

FRANTINE-SILVA, W. *et. al* Phylogeography and historical demography of the orchid bee *Euglossa iopoecila*: signs of vicariant events associated to Quaternary climatic changes. **Conservation Genetics**, v. 18, n. 3, p. 539–552, 2017.

GARÓFALO, C. A.; ROZEN JR., J. G. Parasitic Behavior of *Exaerete smaragdina* with Descriptions of Its Mature Oocyte and Larval Instars (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **American Museum Novitates**, v. 3349, n. 3349, p. 1–28, 2001.

Giangarelli, D.C., Aguiar, W.M. & Sofia, S.H. Orchid bee (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) assemblages from three different threatened phytophysiognomies of the subtropical Brazilian Atlantic Forest. **Apidologie** 46, 71–83 (2015). **Disponível em:**<https://doi.org/10.1007/s13592-014-0303-4>

GRISWOLD, T.; HERNDON, J. D.; GONZALEZ, V. H. First record of the orchid bee genus *Eufriesea* Cockerell (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) in the United States. **Zootaxa**, v. 3957, n. 3, p. 342—346, 2015.

HEBERT, P. D. N. *et. al* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003.

HEBERT, P. D. N. *et. al* Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biology**, v. 2, n. 10, 2004a.

HEBERT, P. D. N. *et. al* Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 41, p. 14812–14817, 2004b.

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

HINOJOSA-DÍAZ, I. A.; ENGEL, M. S. Revision of the orchid bee subgenus *Euglossella* (Hymenoptera, Apidae), Part I, the decorata species group. **ZooKeys**, v. 140, p. 27–69, 2011.

HINOJOSA-DÍAZ, I. A.; ENGEL, M. S. Revision of the orchid bee subgenus *Euglossella* (Hymenoptera: Apidae), part II: The *viridis* and *mandibularis* species groups. **Journal of Melittology**, n. 36, p. 1, 2014.

JANUARIO, B. B. **Aplicação de códigos de barras de dna (dna barcoding) na identificação das espécies de *Senna* Mill. (Fabaceae) e *Casearia* Jacq. (Salicaceae) para estudos de variabilidade genética.** 2014.

JANZEN, D. H. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. **Science**, v. 171, n. 3967, p. 203–205, 1971.

KIMSEY, L. S. An Illustrated Key to the Genus *Exaerete* with Descriptions of Male Genitalia and Biology (Hymenoptera: Euglossini, Apidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, vol. 52, no. 4, 1979.

KIMSEY, L. S. The behavioural and structural aspects of grooming and related activities in euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Zoology**, v. 204, n. 4, p. 541–550, 1984.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.

KUMAR, R.; MAHADANI, P. DNA Barcoding of Indian Orchids. n. September 2017, 2016.

LEDO, R. M. D.; COLLI, G. R. The historical connections between the Amazon and the Atlantic Forest revisited. **Journal of Biogeography**, v. 44, n. 11, p. 2551–2563, 2017.

MICHENER, C. D. **Bees of the World**. 2. ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2007.

MORITZ, C.; CICERO, C. DNA barcoding: Promise and pitfalls. **PLoS Biology**, v. 2, n. 10, 2004.

MOURE, J. S., MELO, G. A. R. & FARIA JR, L. R. R. **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version**.

MOURE, J. S. A check-list of the known euglossine bees (Hymenoptera, Apidae). **Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica**, v. 5, p. 395–415, 1967.

NEMÉSIO, A. Three new species of *Euglossa* Latreille (Hymenoptera: Apidae) from

Brazil. **Zootaxa**, v. 31, n. 1547, p. 21–31, 2007.

NEMÉSIO, A. Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of the Brazilian Atlantic Forest. **Zootaxa**, n. 2041, p. 242, 2009.

NEMÉSIO, A.; AUGUSTO, S. C.; ALMEIDA, E. A. B. *Euglossa decorata* Smith (Hymenoptera: Apidae) in central Brazil - Biogeographic implications. **Lundiana**, v. 8, n. 1, p. 57–61, 2007.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; RATTER, J. A. A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 52, n. 2, p. 141–194, 1995.

PEMBERTON, R. W.; WHEELER, G. S. Orchid bees don't need orchids: Evidence from the naturalization of an orchid bee in Florida. **Ecology**, v. 87, n. 8, p. 1995–2001, 2006.

POINAR-JR., G. *Paleoeuglossa melissiflora* gen. n., sp. n. (Euglossinae: Apidae), Fossil Orchid Bees in Dominican Amber Author (s): George Poinar, Jr. Source: Journal of the Kansas Entomological Society, Vol. 71, No. 1 (Jan., 1998), pp. 29–34. Published by the Kansas Entomological Society. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 71, n. 1, p. 29–34, 2009.

RAMÍREZ, S. R. et al. Phylogeny, diversification patterns and historical biogeography of euglossine orchid bees (Hymenoptera: Apidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 100, n. 3, p. 552–572, 2010.

ROUBIK, D.; HANSON, P. **Orchid bees of tropical America: Biology and field guide**. 1. ed. Santo Domingo de Heredia. 2004.

ROZEN, J. G. Eggs, Ovariole Numbers, and Modes of Parasitism of Cleptoparasitic

Bees, with Emphasis on Neotropical Species (Hymenoptera: Apoidea). **American Museum Novitates**, v. 3413, n. 3413, p. 1–36, 2003.

SAVOLAINEN, V. *et. al* Towards writing the encyclopaedia of life: An introduction to DNA barcoding. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1805–1811, 2005.

SHEFFIELD, C. S. *et. al* DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. SUPPL. 1, p. 196–207, 2009.

SILVA, D. P. *et. al* Amazonian species within the Cerrado savanna: New records and potential distribution for *Aglae caerulea* (Apidae: Euglossini). **Apidologie**, v. 44, n. 6, p. 673–683, 2013.

SILVEIRA, F. A.; ALMEIDA, E A B; MELO, G. A. R. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação**. 1° ed. Belo Horizonte. 2002.

SILVEIRA, G. C. *et. al* The orchid bee fauna in the Brazilian savanna: do forest formations contribute to higher species diversity? **Apidologie**, v. 46, n. 2, p. 197–208, 2015.

TAMURA, K. *et. al* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TOGAWA, R. C; BRIGIDO, M. M. PHPH : Web based tool for simple electropherogram quality analysis. 1st. International Conference on Bioinformatics and Computational Biology -IcoBiCoBi. **Anais...**Ribeirão Preto: 2003

TOSTA, Thiago Henrique Azevedo. Abelhas Euglossini no bioma cerrado:

diversidade, estimativa populacional e estrutura genética. 2014. 99 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia**, Uberlândia, 2014.

TOSTA, Thiago Henrique Azevedo. Diversidade, dinâmica populacional e uso de recursos aromáticos por abelhas Euglossini em formações florestais do bioma Cerrado. 2018. 86 f. **Tese (Doutorado em Ecologia e Conservação dos Recursos Naturais) - Universidade Federal de Uberlândia**, Uberlândia, 2018. **Disponível em:** <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.498>.

VAN VELZEN, R. *et. al* DNA barcoding of recently diverged species: Relative performance of matching methods. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.

WARD, R. D. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 4, p. 1077–1085, 2009.

WILLIAMS, O. H.; DODSON, C. H. Selective attraction of male Euglossine bees to orchid floral fragrances and its importance in long distance pollen flow. **Evolution**, p. 84–95, 1972.