



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIODIVERSIDADE NEOTROPICAL**

**DELIMITAÇÃO ESPECÍFICA DE DUAS ESPÉCIES NOMINAIS DE *XYLOCOPA*
(*NEOXYLOCOPA*) MICHENER, 1954 POR MEIO DE DADOS MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES**

JÚLIA COLOMBELLI AGOSTINI

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Linha de pesquisa: Sistemática e Evolução

Orientador: Prof. Dr. Fernando César Vieira Zanella

Coorientadora: Dr.^a Elaine França

FOZ DO IGUAÇU
2021

JÚLIA COLOMBELLI AGOSTINI

**DELIMITAÇÃO ESPECÍFICA DE DUAS ESPÉCIES NOMINAIS DE *XYLOCOPA*
(*NEOXYLOCOPA*) MICHENER, 1954 POR MEIO DE DADOS MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

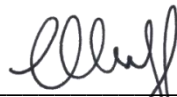
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Fernando César Vieira Zanella
Orientador
UNILA



Dra. Carolina Isabel Miño
Banca examinadora
CONICET-UNaM (Arg.)



Prof. Dr. Luiz Roberto Ribeiro Faria Jr
Banca examinadora
UNILA

Foz do Iguaçu, 24 de janeiro de 2021.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

A275

Agostini, Julia Colombelli.

Delimitação específica de duas espécies nominais de *Xylocopa* (*Neoxylocopa*) Michener, 1954 por meio de dados morfológicos e moleculares / Julia Colombelli Agostini. - Foz do Iguaçu - PR, 2021.

107 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza. Programa de Pós-Graduação de Biodiversidade Neotropical. Foz do Iguaçu - PR, 2020.

Orientador: Fernando César Vieira Zanella.

Coorientador: Elaine Françoso.

1. *Xylocopa nigrocincta*. 2. *Xylocopa suspecta*. 3. Sinonímia. 4. DNA Barcode. I. Zanella, Fernando César Vieira. II. Françoso, Elaine. III. Universidade Federal da Integração Latino-Americana. IV. Título.

CDU 581

Whether the marvels of nature inspire belief in a creator (New York Times):

Not for me. It's a process called evolution (Jerome G. Rozen Jr.).

28 de setembro de 2009.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Fernando César Vieira Zanella, pela oportunidade, pela paciência, pela confiança, principalmente pelo apoio financeiro e incontáveis horas de conversas de descontração e orientação que contribuíram na minha formação.

À Dr.^a Elaine Françoso, por todo tempo dedicado para me ajudar a elaborar o presente trabalho, pelos ensinamentos, pelas conversas, orientações e a enorme paciência que teve comigo.

À Professora Dr.^a Maria Cristina Arias (Instituto de Biociências, Departamento de Biologia – USP) pela enorme colaboração na realização desse trabalho, pelos conhecimentos repassados, dicas e pelo cuidado que teve comigo, com o Allan e o Giovani durante nossa estadia no seu laboratório.

À todos do Laboratório de Genética e Evolução de Abelhas do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva da USP, Susy, Paulo, Priscila, Larissa Cont e Larissa Nunes, pelo acolhimento, apoio imprescindível e ajuda nos experimentos.

Aos Professores Elaine, Nuno e Luiz Henrique do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza (ILACVN) da UNILA pelos auxílios inestimáveis com as análises, resultados, por serem sempre muito atenciosos e pacientes com as minhas dúvidas.

Aos membros da banca que aceitaram o convite de avaliar este trabalho e contribuir, com sua experiência e conhecimento, para o enriquecimento do mesmo.

A todas as instituições e museus que gentilmente cederam os espécimes de *Xylocopa* que compõem esse trabalho, INPA, MPEG, MZSP, RPSP, UFBA, UENF, UFGD, UFMG, UFMS, UFPE, UFTO e UFPB.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Neotropical, que se dedicaram para contribuir ao máximo com a nossa formação.

Ao técnico do PPGBN, Celso Paula Junior, por sempre ser muito prestativo e solícito com as minhas dúvidas.

Agradeço imensamente aos meus pais, Luiz Carlos e Cláudia, por toda confiança, por todas as broncas, por todo carinho, por todo tempo e investimento financeiro que tiveram para que eu complementasse ainda mais minha formação. Serei eternamente grata, pois sem vocês não teria chegado nem na metade do caminho!

Ao meu irmão, Ernesto, pelo companheirismo, pelas intermináveis brigas, pelos momentos de descontração durante esses vinte e um anos e pelas fotos enviadas para que eu pudesse matar a saudade do Alfito.

Aos meus tios, Luiz Cláudio e Mercês e a minha vó, Terezinha, que mesmo de longe participaram de mais essa etapa da minha vida, me oferecendo conselhos, me apoiando, me ajudando como podiam e sempre me recebendo de portas abertas durante as semanas de descanso.

A todos os integrantes dos Laboratórios Multiusuário Engenheira Enedina Alves Marques do PTI e Laboratório de Biodiversidade da UNILA. Agradeço imensamente ao Richard, Elaine, Poena, Maria Carolina, Sara, Carol, Manu, Marcos e Bia pelas orientações, dicas, conversas sobre os mais diversos assuntos e pela companhia diária nos últimos tempos. Obrigada por deixarem essa etapa mais leve!

À UNILA pela bolsa de mestrado e pelos auxílios evento científico e campo, concedidos para realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!



Agostini, J. C. **DELIMITAÇÃO ESPECÍFICA DE DUAS ESPÉCIES NOMINAIS DE XYLOCOPA (NEOXYLOCOPA) MICHENER, 1954 POR MEIO DE DADOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES**. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical–Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

RESUMO

Xylocopa nigrocincta Smith, 1854 e *Xylocopa suspecta* Moure & Camargo, 1988 são duas espécies nominais encontradas dentro subgênero *Neoxylocopa* Michener, 1954, que é um dos mais diversos do gênero. As espécies nominais apresentam distribuições geográficas em grande parte simpátricas, podendo ser encontradas desde o sul até o norte do Brasil. A primeira é diagnosticada pela presença das faixas ferrugíneas metassomais, enquanto a outra é inteiramente preta. Apesar dessa distinção morfológica, um estudo publicado levantou a hipótese de que as duas poderiam ser, na verdade, uma mesma entidade evolutiva e, portanto sinônimos. O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise da identidade dessas espécies nominais, por meio de dados morfológicos e moleculares para avaliar a hipótese de que não se tratam de duas linhagens evolutivas distintas. Fêmeas das duas espécies foram obtidas por empréstimos de museus e coleções representando grande parte da distribuição dos morfotipos. Também foram realizadas coletas nos estados do Pará, Minas Gerais, São Paulo e Paraná. Os espécimes foram associados às espécies nominais por meio de chaves de identificação para o subgênero *Neoxylocopa*. Caracteres diagnósticos adicionais na morfologia externa foram procurados. Os fragmentos das regiões mitocondriais *Citocromo c oxidase subunidade I (COI)* e *Citocromo B (CytB)* foram sequenciados, editados e analisados. Com as sequências finais foram obtidas estimativas de distâncias genéticas, sendo utilizados os diferentes morfotipos como critério de agrupamento, incluindo representantes do grupo externo. Filogenias por inferência bayesiana para ambos os fragmentos de genes foram reconstruídas e posteriormente, determinados os números de haplótipos, sítios polimórficos e confeccionada a rede de haplótipos. Os mapas de distribuição foram feitos para diferentes morfotipos encontrados, incluindo dados conferidos e de referências bibliográficas selecionadas. Foi observada variação contínua no número de faixas ferrugíneas metassomais, sendo possível encontrar morfotipos desde inteiramente pretos até com seis faixas. O padrão de pontuação do segundo terço metassomal variou entre muito esparsos, esparsos e moderadamente densos nos dois morfotipos. Variação na forma da placa basitibial e a cor do brilho metálico das asas também foram observadas em ambas as formas. Os haplótipos mais frequentes, tanto para *COI* como para *CytB*, estiveram representados em ambos morfotipos de coloração. As sequências de *COI* e *CytB* para ambas as formas apresentaram baixa distância genética, exceto por um indivíduo do Pará. As hipóteses filogenéticas para os dois marcadores apresentaram várias politomias no grupo interno e sem agrupamento por morfotipos. Os clados formados para a região de *COI* possuem baixo valor de *bootstrap*, mostrando como as topologias dentro do grupo interno são incertas, mas sendo o grupo interno bem suportado pelo seu nó ancestral. As evidências não suportam a hipótese de que as duas espécies nominais são linhagens evolutivas distintas, sendo proposta a sinonímia entre *X. nigrocincta* e *X. suspecta*.

Palavras-chave: *Xylocopa nigrocincta*. *Xylocopa suspecta*. DNA Barcode. Morfologia. Sinonímia.

Agostini, J. C. **SPECIES DELIMITATION OF TWO NOMINAL SPECIES OF *XYLOCOPA* (*NEOXYLOCOPA*) MICHENER, 1954 USING MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR DATA.** Master's thesis of the Graduate Program in Neotropical Biodiversity - Federal University of Latin American Integration, Foz do Iguaçu, 2021.

ABSTRACT

Xylocopa nigrocincta Smith, 1854 and *Xylocopa suspecta* Moure & Camargo, 1988 are two nominal species found within the subgenus *Neoxylocopa*, being one of the most diverse in genus. The two nominal species present a sympatric geographic distribution and the first is recognized by the presence of reddish metasomatic bands, while that the other one is entirely black. Although, morphologically distinct by metasomal bands, a published study raised the hypothesis that the two could actually be the same evolutionary entity and therefore synonymous. The aim of this research was analyzed the identity of these nominal species using morphological and molecular data to evaluate the hypothesis that these are not two different evolutionary lineages. Females of both species specimens were obtained on loan from museums and collections representing a large part of the morphotypes distribution. Also, there were made collects in the Pará, Minas Gerais, São Paulo e Paraná States and also. The specimens were associated with the nominal species by identification keys of the subgenus *Neoxylocopa*. Additional diagnostic characters in the external morphology were sought. The mitochondrial fragments of the *Cytochrome C Oxidase Subunit I* (*COI*) and *Cytochrome B* (*CytB*) were sequenced, edited and analyzed. With the final sequences, estimates of genetic distances were obtained, using the different morphotypes as a grouping criterion, including representatives of the external group. Phylogenies by Bayesian inference for both gene fragments were reconstructed and later, the numbers of haplotypes, polymorphic sites were determined and the haplotype network was made. The distribution maps were made according to different morphotypes found including data checked and selected bibliographic references. Continuous variations were observed in the number of reddish metasomal bands, finding morphotypes ranging from entirely black to six strips. The pattern punctuation of second metasomal tergal varied in very sparse, sparse and moderately dense in the two morphotypes. Variations in the shape of basitibial plate and the iridescence of wings had different pattern colors in both morphotypes. The most frequent haplotypes, for *COI* and for *CytB*, were represented in both morphotypes. The *COI* and *CytB* sequences for both morphotypes had a low genetic distance, except for one individual from Pará. The phylogenetic hypotheses for both molecular markers presented several polytomies, with no grouping by morphotypes. The clades formed by the *COI* region had low bootstrap value, showing how the topologies within internal group are uncertain, but well supported by your ancestral node. The evidence does not support the hypothesis that the two nominal species are distinct evolutionary lineages, with a synonym between *X. nigrocincta* and *X. suspecta* being proposed.

Keywords: *Xylocopa nigrocincta*. *Xylocopa suspecta*. DNA Barcode. Morphology. Synonymy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Locais de ocorrência das formas *nigrocincta* e *suspecta* conforme literatura selecionada.

Figura 2. Variação no número de faixas ferrugíneas nos tergos do metassoma de *Xylocopa* nas formas *nigrocincta* e *suspecta*.

Figura 3. Variação na pontuação metassomática do segundo tergo nas formas *nigrocincta* e *suspecta*.

Figura 4. Variações no formato nas regiões apical posterior e anterior da placa basitibial nas formas *nigrocincta* e *suspecta*.

Figura 5. Variação na coloração das asas nas formas *nigrocincta* e *suspecta*.

Figura 6. Distribuição dos morfotipos para as formas *nigrocincta* e *suspecta* conforme espécimes examinados.

Figura 7. Frequência da distribuição das formas *nigrocincta* e *suspecta*, conforme material examinado, mais literatura citada.

Figura 8. Distribuição morfológica baseada no padrão de variação do segundo tergo metassomal nos morfotipos de *nigrocincta* e *suspecta*.

Figura 9. Rede de haplótipos baseada nos fragmentos dos genes mitocondriais *Citocromo C oxidase subunidade I (COI)* e *Citocromo B (CytB)* de espécimes das formas *nigrocincta* e *suspecta*.

Figura 10. Mapa da distribuição da rede de haplótipos utilizando sequências dos fragmentos dos genes mitocondriais *Citocromo C oxidase subunidade I (COI)* *Citocromo B (CytB)* de espécimes das formas *nigrocincta* e *suspecta*.

Figura 11. Árvore consenso proveniente da análise Bayesiana de dados moleculares do gene *COI* para os morfotipos de *nigrocincta* e *suspecta*.

Figura 12. Árvore consenso proveniente da análise Bayesiana de dados moleculares do gene *CytB* para os morfotipos de *nigrocincta* e *suspecta*.

Figura 13. Histograma da distribuição de distância genética entre as sequências para os morfotipos *nigrocincta* e *suspecta*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. *Primers* utilizados para amplificação de fragmentos dos genes de *COI* e *CytB*.

Tabela 2. Média da distância genética de *Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI)* entre os morfotipos das formas *nigrocincta* e *suspecta* e o grupo externo.

Tabela 3. Média da distância genética da região de *Citocromo B (CytB)* entre os morfotipos das formas *nigrocincta* e *suspecta* e o grupo externo.

Tabela 4. Haplótipos encontrados a partir do sequenciamento de uma região do gene mitocondrial *Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI)* e *Citocromo B (CytB)* e com os indivíduos representantes das formas *nigrocincta* e *suspecta*.

Tabela 5. Sítios variáveis dos 14 haplótipos encontrados para o fragmento de 300 pb do gene *COI* para as formas *nigrocincta* e *suspecta*.

Tabela 6. Sítios variáveis dos nove haplótipos encontrados para o fragmento de 268 pb do gene *CytB* para as formas *nigrocincta* e *suspecta*.

SUMÁRIO

DELIMITAÇÃO ESPECÍFICA DE DUAS ESPÉCIES NOMINAIS DE *Xylocopa* (*Neoxylocopa*) MICHENER, 1954 POR MEIO DE DADOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	20
3. METODOLOGIA	21
3.1. Material examinado	21
3.2. Análise de caracteres morfológicos das formas <i>nigrocincta</i> e <i>suspecta</i>	22
3.3. Mapeamento da distribuição das formas <i>nigrocincta</i> e <i>suspecta</i>	23
3.4. Extração de DNA, PCR e sequenciamento	34
3.4.1. Extração de DNA	24
3.4.2. Escolha dos marcadores moleculares, <i>Primers</i> e amplificação	24
3.4.3. Sequenciamento	26
3.4. Análise das sequências nucleotídicas	26
4. RESULTADOS	28
4.1. História taxonômica das espécies nominais <i>X. nigrocincta</i> e <i>X. suspecta</i>	28
4.2. Caracterização morfológica	30
4.3. Mapeamento da distribuição por morfotipo	33
4.4. Análise dos dados moleculares	37
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	50
6.1. Proposta taxonômica	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO I – MATERIAL EXAMINADO	65
ANEXO II – TABELA DE INDIVÍDUOS SEQUENCIADOS	69
ANEXO III – TABELA DE MEDIDAS DE CARACTERES	75
ANEXO IV – ARTIGO A SER SUBMETIDO NA REVISTA APIDOLOGIE	76
ANEXO V – NORMAS PARA SUBMISSÃO NA APIDOLOGIE	97

1. INTRODUÇÃO

Uma espécie é a menor unidade fundamental da biodiversidade, que faz a união entre áreas micro e macroevolutiva da Biologia (Ridley 2006). Entretanto, ocorrem inúmeros debates sobre como delimitar uma espécie tanto teoricamente quanto em termos práticos (Rapini 2004; Zander 2007; Mallet 2010). Os meios relacionados à delimitação de espécies estão atrelados às ferramentas utilizadas para entender as transformações que ocorrem dentro do objeto de estudo. Uma abordagem integrativa pode utilizar diferentes fontes de dados e metodologias e tem se mostrado indispensável para a compreensão dos limites e reconhecimento dessas espécies, devido à complexidade biológica envolvida (Dayrat 2005; Pante *et al.* 2015). Para contornar esse problema, caracteres comportamentais, ecológicos e moleculares (Will *et al.* 2005) têm sido associados à morfologia e, assim auxiliando a aumentar o conhecimento dos níveis de variações em populações naturais que não podem ser diferenciadas a partir dos critérios tradicionais de morfologia aristotélico e lineano (Cronquist 1978).

Dessa forma, a taxonomia integrativa propõe o uso de diversas fontes de evidência para delimitar espécies de uma maneira mais confiável (Dayrat 2005; Will *et al.* 2005; Schilick-Steiner *et al.* 2010; Yeates *et al.* 2011). A partir de 2005, muitos trabalhos foram publicados utilizando o termo “taxonomia integrativa” – em que mais de um tipo de evidência (a maioria sendo dados moleculares e morfológicos) foi utilizado para resolver problemas taxonômicos (Yeates *et al.* 2011; Michez 2009; Almeida *et al.* 2008; Michel-Salzat *et al.* 2004). Mesmo com a disseminação do termo e de suas aplicações, uma metodologia unificada de como um trabalho de taxonomia integrativa deve ser conduzido ainda não é consenso, com divergências, inclusive, de como devemos testar hipóteses de espécie (Schilick-Steiner *et al.* 2010; Yeates *et al.* 2011).

O gênero *Xylocopa* Latreille, 1802 (Apidae, Xylocopini) é um grupo de abelhas grandes, usualmente chamadas de mamangavas ou abelhas carpinteiras, sendo a maioria das espécies solitárias ou facultativamente sociais, tendo como hábito a construção de ninhos escavando madeira morta ou outros materiais vegetais (Hurd & Moure 1963; Camilo & Garófalo 1989; Michener 2007; Marchi & Melo 2010; Pereira & Garófalo 2010). Dependendo do clima, podem ser uni, bi, ou polivoltinas (Watmough 1974 1983). Muitas espécies são poliléticas (Linsley *et al.* 1966; Hurd 1978, Gerling *et al.* 1989), porém, para grande parte delas, as relações com flores visitadas ainda são pouco ou nada conhecidas. Todavia, as abelhas carpinteiras têm recebido destaque nos últimos anos por serem extremamente importantes para a polinização de plantas

cultivadas de diversas famílias, incluindo maracujá, abóbora, tomate, castanha-do-pará e beringela (Kearse 2010; Yamamoto *et al.* 2014; Giannini *et al.* 2015).

As abelhas do gênero *Xylocopa* são cosmopolitas e possuem um pouco mais de 470 espécies acomodadas em 31 subgêneros, principalmente nas regiões tropicais e neotropicais (Leys *et al.* 2002; Michener 2007). O trabalho mais relevante para a taxonomia desse gênero foi realizado por Hurd & Moure (1963) e resultou em uma classificação fundamentada em um estudo morfológico e na distribuição geográfica. Minckley (1998) realizou o primeiro trabalho de análise filogenética para investigar as relações dentro do gênero, tendo proposto várias mudanças taxonômicas. O gênero *Xylocopa* ficou subdividido em 33 subgêneros, dos quais 20 pertenciam a dois grupos do Velho Mundo e 13 pertenciam a um grupo do Novo Mundo. Pela falta de caracteres filogenéticos informativos e a presença de características que pareciam ser homoplásticas, muitos subgêneros apareceram em posições incertas nas várias análises realizadas. Posteriormente, Leys *et al.* (2000; 2002) reavaliaram as relações filogenéticas dentro do gênero *Xylocopa* através de sequências de DNA de genes de mitocondriais e nucleares, corroborando a hipótese de monofilia do grupo do Novo Mundo.

Na Região Neotropical são citados doze subgêneros e 96 espécies (Michener 2007), sendo os mais diversos *Neoxylocopa* Michener, 1954 e *Schonnherria* Lepeletier, 1841, contendo 50 e 30 espécies, respectivamente, com vinte espécies de *Neoxylocopa* registradas no Brasil (Moure 2012). O subgênero *Neoxylocopa* tem sua monofilia suportada por quatro sinapomorfias, 1) combinação de dois dentes na margem apical da mandíbula, 2) crista contínua imputada ao longo da sutura epistomal, 3) carena medial visível ao longo de todo esterno metassomal e 4) pilosidade amarelada dos machos, caracterizando um forte dimorfismo sexual (Minckley 1998), a qual foi corroborada pelo trabalho de relações filogenéticas através de dados moleculares de Leys *et al.* (2002). Segundo Hurd & Moure (1963), Silveira *et al.* (2002) e Lucia *et al.* (2014), o subgênero *Neoxylocopa* necessita de revisão para resolver problemas taxonômicos quanto à identidade das espécies.

Seguindo esse viés, Lewis (2006), afirma que conhecer a taxonomia e a distribuição das espécies dos ecossistemas é um método extremamente importante para o desenvolvimento de técnicas e estratégias satisfatórias para a conservação e prevenção de extinção proveniente de ações antrópicas. Dentre as espécies nominais desse subgênero, *Xylocopa nigrocincta* e *X. suspecta* tem sido amplamente citadas em trabalhos de biologia (Camilo *et al.* 1986; Witman & Scholz 1989; Lucia *et al.* 2009; Bernadino *et al.* 2008; Chaves-Alves *et al.* 2011; Carvalho *et al.*

2013; Figueiredo *et al.* 2013; Lucia *et al.* 2014) e distribuição geográfica (Lucia *et al.* 2014; Marchi & Alves 2013; Schlindwein *et al.* 2003) e, apesar de aparentemente serem facilmente distinguíveis pela presença de várias faixas metassomáticas avermelhadas em *X. nigrocincta*, apresentam distribuição em grande parte simpátrica e foram encontrados alguns indivíduos aparentemente intermediários.

Recentemente, Lucia e Gonzalez (2017) em nota sobre *X. andica* Enderlein, 1913 e *X. nigrocincta* comentaram sobre a possibilidade dessa última espécie ser coespecífica com *X. suspecta*. Os trabalhos que analisaram comparativamente essas duas espécies nominais, em estudos de faunas regionais, apresentam pequenas divergências no escopo de *X. nigrocincta*, o que pode representar somente variações regionais, mas não fazem menção a indivíduos intermediários. Segundo Lucia *et al.* (2014), *X. nigrocincta* pode ser facilmente diferenciada das outras espécies da Argentina pelas seguintes características: todos os tergos abdominais são castanho avermelhados, exceto T6, as asas são castanhas escuras com forte reflexo violeta e pilosidade preta. Eles não registraram *X. suspecta* para o país, apesar de terem analisado grande número de exemplares. Marchi & Alves dos Santos (2013), ao estudar as espécies do estado de São Paulo, definem *X. nigrocincta* pela presença de faixas ferrugíneas nos três ou quatro primeiros tergos com tergo 5 escurecido e tergo 6 preto e asas ferrugíneas escuras com forte brilho violáceo. Schlindwein *et al.* (2003), estudando as espécies do estado do Rio Grande do Sul, relatam que essa espécie pode ser diferenciada das demais pela presença de faixas tegumentares avermelhadas, sem citar o número de faixas, e que podem ser fracas, e asas pretas com forte brilho violáceo.

É importante destacar que Moure & Camargo (1988), ao descreverem *X. suspecta*, não a comparam com *X. nigrocincta*, possivelmente por terem considerado a facilidade na distinção das duas, discutindo mais detalhadamente os caracteres diagnósticos em relação a *X. ordinaria* Smith, 1874, *X. carbonaria* Smith, 1854 e *X. submordax* Cockerel, 1935 (sinônimo de *X. transitoria* Pérez 1901) espécies inteiramente melânicas como *X. suspecta*. De acordo com Moure (2012), *X. nigrocincta* possui ocorrência registrada no Brasil da Bahia ao Rio Grande do Sul e do Rio de Janeiro ao Mato Grosso. É citada ainda a ocorrência no Paraguai e Argentina, chegando até a latitude de Buenos Aires e Córdoba. Para *X. suspecta* é citada a ocorrência no Brasil de forma quase inteiramente simpátrica, do Pará à Paraíba e até o Rio Grande do Sul e do Rio de Janeiro ao Mato Grosso. Também é citada para a Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai, mas sem mencionar localidades específicas (Figura 1).

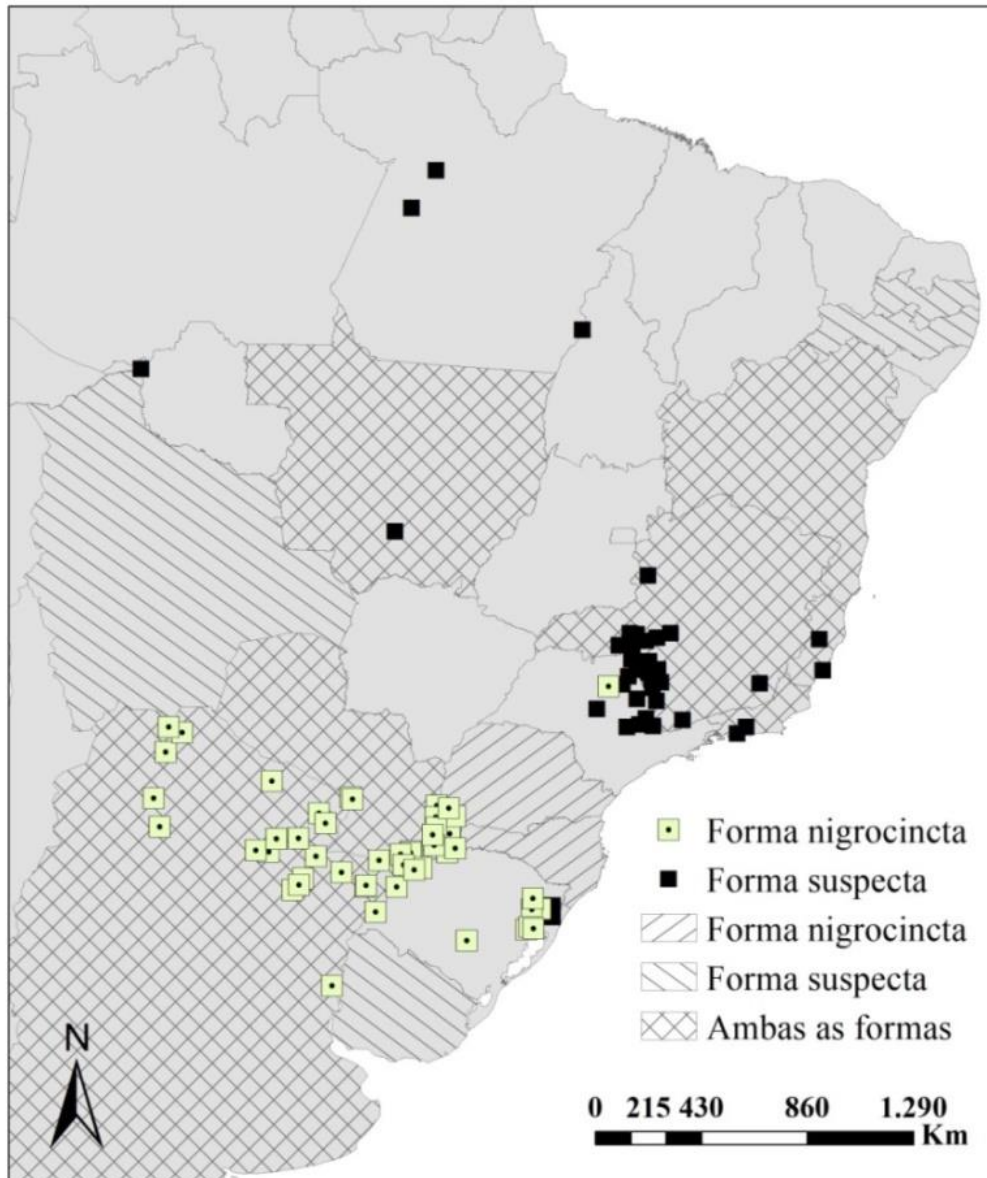


Figura 1. Locais de ocorrência das formas *nigrocincta* e *suspecta* conforme literatura selecionada: Camargo & Moure (1988), Lucia *et al.* (2014) e Mawdsley (2018). Quando hachurado representa que está indicado somente o país ou estado na referência consultada.

A ausência de informações sobre a distribuição das espécies é conhecida como Déficit Wallaceano, já a falta de informação sobre a existências de quais espécies existem é conhecido como Déficit Linneano (Cardoso *et al.* 2011, Bini *et al.* 2006; Withaker *et al.* 2005). O Déficit Lineano é um problema que não irá ser solucionado tão cedo, especialmente por que as Regiões Neotropicais apresentam um alto índice de biodiversidade (Nabout *et al.* 2010).

Isaac *et al.* (2004) afirmam que existe uma inflação taxonômica relacionada a superestimação de subespécies ao nível das espécies. Segundo Jones *et al.* (2009), esse conflito geralmente é resolvido por revisões taxonômicas dos gêneros, podendo assim, reduzir o número de espécies através do agrupamento de duas ou mais espécies em uma única espécie (sinonimização) e podendo também ocorrer a “criação” de novas espécies através da descrição de um novo material ou pela divisão de uma espécie existente em duas ou mais. Em contrapartida, Jones *et al.* (2012) reconhecem que as revisões realizadas também podem voltar atrás de uma espécie sinonizada e torna-la válida outra vez. O status atual das informações taxonômicas varia muito entre táxons e entre as áreas geográficas (Vecchiome *et al.* 2000). Um conjunto de informações biológicas atualmente conhecidas não mensura o padrão correto da distribuição das espécies. Isso se deve ao fato de que a amostragem espacial é, na maioria das vezes, restrita a localizações de fácil acesso ou a locais onde existe ocorrência conhecida da espécie estudada, causando déficits espaciais e taxonômicos (Jobe & White 2009). Consequentemente, sem conhecer a verdadeira delimitação das espécies, o seu padrão de distribuição, sua real nomenclatura, seus diagnósticos e diagnoses feitos de forma correta, se torna extremamente complicado avaliar seu verdadeiro status de preservação e onde se devem concentrar esforços para preservá-las (Vecchiome *et al.* 2000; Cardoso *et al.* 2011). Durante muito tempo, a descrição de espécies tem sido comumente realizada de acordo com a morfologia tradicional. No entanto, em certos gêneros, apenas a morfologia pode não ser dessegura para delimitar a limite entre duas espécies (Choi 2016) podendo levar a classificações ambíguas devido à elevada variabilidade fenotípica (polimorfismos) ou à existência de espécies crípticas (Maydem 1997; Agapow *et al.* 2004).

A disseminação do uso das ferramentas moleculares tem sido utilizadas com sucesso para avaliar divergências intra e interespecíficas, fornecendo soluções confiáveis para delimitação de espécies e reconstrução de filogenias (Hebert *et al.* 2003; Goldstein & Desalle 2010; Jörger & Schrödl 2013). O *DNA Barcode* é um instrumento molecular baseado na sequência da região do gene mitocondrial *Citocromo C oxidase I (COI)*, um fragmento de aproximadamente 648 pb de comprimento e seu conceito original é baseado na aplicabilidade universal (Hebert *et al.* 2003),

pois a maioria dos grupos de animais possui o *COI*, sendo esse gene frequentemente utilizado com sucesso para identificar uma grande variedade de taxa, incluindo aves, peixes, borboletas e moscas (Herbert *et al.* 2003; Hogg & Hebert 2004; Johnson & Cicero 2004; Tavares & Baker 2008). Essa metodologia foi testada e mostrou grande sucesso ao contribuir para a identificação e delimitação de espécies (Gibbs 2009; Sheffield *et al.* 2009; Koch 2010; Magnacca & Brown 2012), identificação de espécies crípticas (Murray *et al.* 2008; Williams *et al.* 2012; Hurtado-Burillo *et al.* 2013) e identificação de machos e fêmeas que correspondem a uma mesma espécie (Sheffield *et al.* 2009). Em abelhas, como exemplo de identificação de espécies crípticas através do mtDNA temos duas espécies de *Bombus*, *B. hortorum* e *B. ruderatus*, que recentemente foram reconhecidas como espécies distintas (Williams & Hernandez 2000, Cameron *et al.* 2007). A identificação baseada somente na morfologia é difícil até mesmo para morfologistas experientes, sendo que elas foram consistentemente separadas através dos genes mitocondriais *CoI* e *CoII* (Ellis *et al.* 2005; 2006).

Assim, tentando solucionar a questão da identidade dessas duas espécies nominais, dentro desse projeto foi proposto fazer uma revisão da história taxonômica de *X. nigrocincta* e *X. suspecta*, e uma análise da identidade dessas espécies nominais, por meio da dados morfológicos com associação a dados moleculares para testar a hipótese de que não se tratam de duas linhagens evolutivas distintas. Complementarmente, foi reavaliada a distribuição geográfica das diferentes formas e possíveis intermediários. Logo, esse trabalho representa um dos primeiros a utilizar abordagem integrativa para solucionar problemas taxonômicos relacionados a espécies do subgênero *Neoxylocopa*.

2. OBJETIVOS

Gerais

Verificar através da análise de dados morfológicos e moleculares se as duas espécies nominais, *X. nigrocincta* e *X. suspecta* são coespecíficas, representando uma mesma unidade evolutiva.

Específicos

- Revisão taxonômica das duas espécies nominais;
- Revisar a morfologia das espécies nominais em busca de caracteres e variações;
- Atualizar a distribuição espacial das diferentes formas incluindo variações intraespecíficas em caracteres morfológicos;

- Integrar dados moleculares nas análises;
- Propor a sinonímia de *X. suspecta* como sinônimo júnior de *X. nigrocincta*;
- Atualizar as diagnoses e descrições.

3. METODOLOGIA

3.1. Material examinado

Devido ao dimorfismo sexual presente no gênero *Xylocopa* e a dificuldade de encontrar esses exemplares na natureza, muito pouco se sabe sobre os indivíduos machos desse grupo, sendo assim, foram analisados somente exemplares fêmeas disponíveis na Coleção Entomológica da UNILA, exemplares obtidos por empréstimo de outras instituições e também de coletas complementares realizadas durante o período do projeto. As instituições que disponibilizaram material por empréstimo ou permitiram o acesso às suas coleções estão listada na Tabela 1, com o acrônimo utilizado e o nome do pesquisador responsável, sendo todas do Brasil. Exemplares coletados previamente por Flávio Francisco e Elaine Françoso, que se encontravam congelados no Laboratório de Genética e Evolução do IB USP-SP, foram montados e depositados na Coleção da UNILA. Coletas complementares foram realizadas nos estados do Pará, Minas Gerais, São Paulo e Paraná. Uma expedição foi realizada ao estado do Tocantins, próximo de onde havia registros mais ao norte para a forma *nigrocincta*, no entanto não se mostrou significativa para a realização desse trabalho, pois não foram encontrados exemplares representantes do objeto de estudo. Os espécimes coletados foram sacrificados em frasco com cianeto de potássio e armazenados em potes de plásticos devidamente identificados e contendo álcool 70% em freezer a -20°C. Os potes foram identificados com local, coordenada, data, responsável pela coleta e método de coleta. A licença para as coletas foi emitida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade ICMBio No. 67692-1 em nome de Fernando Zanella. As informações contidas nas etiquetas de todos os espécimes estudados (empréstimo e coleta) foram transcritas na seção "Material examinado" (Anexo I).

Tabela 1. Lista de instituições que disponibilizaram acesso às coleções que continham exemplares das espécies nominais de *X. nigrocincta* e *X. suspecta*.

Acronímico	Nome da instituição, local onde se encontra e responsável pela coleção
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM; Dr. Marcio Oliveira
MPEG	Museu Emílio Goeldi, Belém, PA, Dr. Orlando Tobias Silveira e Dra. Beatriz Coelho
MZSP	Museu de Zoologia da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP; Dra. Kelly Ramos e Dr. Carlos Brandão
RPSP	Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Coleção Camargo, USP, SP; Dr. Eduardo Almeida
UFBA	Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA; Dr. Mauro Ramalho e Dra. Maise Silva
UENF	Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos do Goytacazes, RJ; Dra. Maria Cristina Gaglianone
UFG	Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS; Dr. Rogério Silvestre
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG; Dr. Fernando Silveira
UFMS	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS; Dr. Gustavo Gracioli
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE; Dra. Luciana Ianuzzi
UFTO	Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO; Dr. Marcos Antônio de Lima Bragança
UFPB	Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB; Dr. Celso Feitosa Martins

3.2. Análise de caracteres morfológicos das formas *nigrocincta* e *suspecta*

Duzentos e trinta e dois indivíduos foram triados e analisados, inicialmente seguindo as chaves de identificação para abelhas do subgênero *Neoxylocopa*, propostas por Schindwein *et al.* (2003), Marchi & Alves (2013), Lucia *et al.* (2014) e Mawdsley (2018) com auxílio da Lupa estereoscópica Zeiss Discovery V.8 no Laboratório Multiusuário Enedina Marques de Souza (ITAIPU/PTI/UNILA). Todos exemplares foram analisados para procura de variação em estados de caracteres de morfologia externa, especialmente nos citados anteriormente em trabalhos de natureza taxonômica, além dos citados acima, Smith (1854) e Moure e Camargo (1998). A morfologia externa das abelhas foi estudada com uma lupa Zeiss Discovery V12. A captura das imagens dos caracteres foi realizada com auxílio do software Axion Vision SE 64.4 com o comando Z-stack no laboratório de Biodiversidade da UNILA. Posteriormente as fotos foram editadas no Photoshop. A confecção das pranchas de imagem foi feita pelo Adobe Illustrator CC 2017. Fotos dos exemplares inteiros foram obtidas com uma câmara CANON 6Di, A nomenclatura da anatomia de abelhas foi tomada de Michener (2007) Silveira *et al.* (2002), Hurd & Moure (1963). As medidas foram obtidas em lupa e as abreviações utilizadas para as medidas

foram: comprimento total do corpo; CMT - comprimento do metassoma; LMT - largura do metassoma; CMS - comprimento do mesossoma; LMS - largura do mesossoma; CC - comprimento da cabeça; LC - largura da cabeça; CT – Comprimento total; T – tergos; T1: primeiro tergo metassomal; T2: segundo tergo metassomal; T3: terceiro tergo metassomal; PBT – placa basitibial; leg – responsável pela coleta; det – responsável pela identificação.

3.3. Mapeamento da distribuição das formas *nigrocincta* e *suspecta*

A distribuição das duas formas, *nigrocincta* e *suspecta*, registrada previamente foram mapeadas a partir de trabalhos de análise de faunas regionais (Schlindwein *et al.* 2003; Marchi & Alves 2013; Lucia *et al.* 2014; Mawdsley *et al.* 2018;) além do trabalho onde é descrito a espécie *X. suspecta* (Moure & Camargo 1988). As referências mencionando apenas um Estado ou País foram representadas no mapa da Figura 1 - Introdução. Apesar de na literatura existir inúmeros registros de ambas as formas, o presente mapeamento foi restrito a artigos que continham precisão na localização das formas *nigrocincta* e *suspecta*. O mapa representado pela Figura 6 é referente aos registros de localidade dos morfotipos observados, conforme o número de faixas ferrugíneas, e foi produzido a partir do material examinado. Os mesmos dados foram utilizados para construção dos mapas das Figuras 7 e 8, representando a proporção do padrão dos morfotipos do número de bandas metassomais e a pontuação do segundo tergo metassomal, respectivamente, por estado ou província, para representar a variação geográfica nos padrões. Para este mapa foram aproveitados dados da literatura de artigos que analisaram a fauna regional e que permitem o reconhecimento do padrão de faixas: Moure & Camargo (1988), Lucia *et al.* (2014) e Mawdsley (2018), possibilitando uma apreciação mais ampla da variação geográfica. As coordenadas geográficas dos locais foram obtidas diretamente das etiquetas, ou quando somente constava o nome do município e localidade, através de consulta e plotagem no mapa pelo Google Earth Pro versão 9.3.3.1.5, tomando o devido cuidado para verificar a possível presença de homônimos. Na ausência de coordenadas foi utilizada a localização sede do município ou localidade. Arquivos com as coordenadas e dados dos locais foram salvos no formato KMZ sendo transformados em Shape file através do site <http://www.zonums.com/online/kml2shp.php> e em seguida, exportados para o software ArcMap 10.2.2, para confecção dos mapas. Os Shape files referentes ao mapa do Brasil, províncias da Argentina e países da América do Sul foram obtidos do site do IBGE, <https://www.indec.gob.ar/indec/web/Institucional-Indec-Codgeo> e <https://forest-gis.com>.

3.4. Extração de DNA, PCR e Sequenciamento

3.4.1. Extração de DNA

Setenta e sete indivíduos foram utilizados para realizar a extração das regiões parciais dos genes mitocondriais e nucleares. Foi criada uma abreviação de identificação para os indivíduos que se encontra na lista de material sequenciado (Anexo II), composta pelo nome da forma, estado onde foi coletado e nº do indivíduo, sendo que na forma *nigrocincta* foram incluídos aqueles com uma ou mais faixas ferrugíneas e na forma *suspecta*, os inteiramente pretos. Para a extração, as duas pernas traseiras de cada indivíduo foram retiradas com pinça entomológica de ponta fina, separadas em papel pardo e posteriormente depositadas em tubos de Eppendorf 1,5 ml devidamente identificados. Após esse procedimento, o papel pardo era descartado e as pinças eram lavadas com Hipoclorito de Sódio, seguido de detergente e água corrente abundante para evitar contaminação. Esse material foi macerado e o DNA extraído utilizando diferentes protocolos de extração conforme a origem dos espécimes:

1) Chelex (Bio-Rad) (Walsh *et al.* 1991) para amostras consideradas frescas (mortas com cianeto ou álcool e posteriormente congeladas a -20°C). A incubação inicial com o produto ocorreu à 56°C por 30 min e homogeneização com auxílio de vortex.

2) Kit de extração DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) para amostras coletadas há mais tempo e conservadas a seco, usualmente sem informação de método de sacrifício. O protocolo foi o do fabricante, com incubação inicial com tampão ATL (fornecido pelo Kit) *overnight* à 56°C e homogeneização com auxílio de vortex. A extração e amplificação do DNA foram realizadas no Laboratório de Genética e Evolução de Abelhas (IB-USP).

3.4.2. Escolha dos marcadores moleculares, *Primers* e amplificação.

Foram avaliados marcadores moleculares e *primers* previamente usados por outros autores em estudos com *Xylocopa* e outros grupos de abelhas (Leys *et al.* 2000, 2002; Rehan *et al.* 2010; Ferrari & Melo 2014), sendo selecionados dois genes mitocondriais: *Cytochrome C oxidase I* (*COI*) e *Cytochrome B* (*CytB*), e um gene nuclear: *Elongation fator 1- α* (*EF*) (Tabela 1).

Tabela 1: Primers utilizados para amplificação de fragmentos dos genes *COI* e *CytB*.

Gene	Primer	Sequência (5' – 3')	pb	Referência
<i>COI</i>	Barbeef	CAACAAATCATAAAAATATTGG	720	Françoso & Arias, 2013 Simon <i>et al.</i> 1994
	MtD9	CCCGGTAAAATTTAAAATATAAACTTC		
<i>CytB</i>	MtD26	TATGTACTACCATGAGGACAAATATC	450	Simon <i>et al.</i> 1994
	MtD28	ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT		
<i>Ef-1α</i>	EF1F	GGACACAGAGATTTTCATCAARAA	≅ 720	Kawakita <i>et al.</i> 2003
	EF1R	TTGCAAAGCTTCRTGRTGCATT		

Foi feita PCR teste com dois kits de amplificação:

- 1) Invitrogen®: para a reação de PCR foi utilizado 2 µl de DNA em um volume final de 16 µL, que continha 2 µl de Tampão de Reação sem MgCl₂ (10x) e 0,6 µl de MgCl₂ (50mM) do kit, 2 µl dNTPs (10mM), 0,4 µl de cada primer, 0,3 µl de Taq e 8,3 µl de Água milli-Q.
- 2) GoTaq® qPCR Master Mix, (Promega, Madison, WI): para reação de PCR foi utilizado 1,5 µl de DNA em um volume final de 15 µl, que continha 7,5 µl de GoTaq®, 0,3 µl de cada primer e 5,4 µl de Água milli-Q.

Foi realizada uma PCR de gradiente a fim de delimitar a melhor temperatura de anelamento para amplificação das sequências. O gradiente de temperatura variou de 38 - 48°C para os *primers* mitocondriais e 48 - 56°C para os *primers* nucleares. Todas as amplificações de PCR foram feitas utilizando o Mastercycler Pro (Eppendorf). O kit da Invitrogen® foi utilizado para amplificar *CytB* e *EF - 1α* e o GoTaq® qPCR Master Mix foi utilizado para amplificar as sequências de *COI*. As condições dos ciclos das PCRs para *COI* foram: 94°C por 5 min; 35x (94°C por 1 min, 42°C por 1 min e 20 seg, 64°C por 2 min); 64°C por 10 min; para *CytB* 94°C por 5 min; 35x (94°C por 1 min, 38,4°C por 1 min e 20 seg, 64°C por 2 min); 64°C por 10 min e para *EF - 1α* 94°C por 2 min; 35x (94°C por 20 seg, 54°C por 30 seg, 72°C por 1 min); 72°C por 10 min. Posteriormente, os produtos da reação foram verificados em gel de Agarose 0,8% em tampão TAE (40mM Tris, 20mM Ácido Acético e 1mM EDTA) juntamente com o marcador de peso molecular conhecido. Foi utilizado GelRed 10.000X (Biotium) para a visualização e fotodocumentação.

3.4.3. Sequenciamento

O volume final da PCR de cada amostra amplificada foi purificada com 0.5 µl de ExoSAP-IT® (USB, USA), a fim de reduzir/eliminar produtos inespecíficos, como resto de *primers* e DNTPs, que pudessem interferir na qualidade das sequências. Para o sequenciamento, o DNA de cada amostra foi pipetado em placas de PCR com sua devida identificação e posteriormente foi adicionado o mix contendo o BigDYE 3.1 preparado com 0,5 µl de *Primer*, 3 µl de Tampão 5x Sequencing, 2 µl de BigDYE 3.1, 1 – 5 µl de DNA e 8,5 – 4,5 µl de Água milli-Q DEPC para cada amostra e seguindo o protocolo utilizado por Françoso *et al.* (2015). Após a PCR, as amostras foram precipitadas por um mix de glicogênio de acordo com o protocolo do fabricante para uma placa de 96 amostras, contendo 2750 µl de Etanol 100%, 110 µl de 3 M NaOAc pH 5,2 e 110 µl de Glicogênio 1mg/ml. Foi distribuído 25 µl do mix em cada poço e em seguida, as placas foram vortexadas e mantidas no gelo durante 15 min. Posteriormente foram centrifugada a 4000rpm por 20 minutos em temperatura ambiente e logo após houve o descarte do sobrenadante, o excesso foi absorvido com papel apropriado e no final dessa etapa houve uma centrifugação de 1000 rpm. Foi adicionado 50 µl de etanol 70% (armazenado no gelo) para cada poço. A placa foi então centrifugada à 4000rpm por 10 min, novamente o sobrenadante foi descartado e o excesso recolhido com papel absorvente. A placa foi deixada para secar completamente por 1 min à 95°C no termociclador aberto. Por fim, a placa foi selada, envolta em papel alumínio e mantida à 4°C. O sequenciamento foi realizado pelo Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa - CEFAP-USP com o equipamento 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.4. Análise das sequências nucleotídicas

Os eletroferogramas obtidos foram visualizados e as sequências de nucleotídeos editadas no programa Geneious 7.3.1 (<http://www.geneious.com>) (Drummond *et al.* 2011). Com o auxílio deste programa também foi realizada a tradução das sequências em aminoácidos para identificar códons de parada, logo após, comparadas com as disponíveis no banco de dados GenBank, utilizando-se a ferramenta de busca *Nucleotide Basic Local Alignment Search tool* (BLASTn) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul *et al.* 1990). Tanto a presença de *Stop Codons*, para genes mitocondriais, como a elevada similaridade com grupos distantes filogeneticamente de *Xylocopa* foram considerados como evidências da amplificação de pseudogenes mitocondriais no DNA nuclear (*numts*) e essas amostras foram descartadas das análises posteriores. A similaridade com organismos como fungos e bactérias foi interpretada

como possível contaminação. Para as análises moleculares as sequências foram editadas para apresentarem o mesmo tamanho. A distância entre sequências separadas por diferentes morfotipos e representantes do grupo externo foi analisada pelo software MEGA versão 10.0.5 (Tamura *et al.* 2011), utilizando o modelo de *Kimura-two-parameter* (K2P) (Nei & Kumar, 2000).

O modelo de substituição para os nucleotídeos foi selecionado usando o critério de informação de Akaike no jModeltest 2.1.7 (Posada 2008). Para *CoI* e *CytB*, o modelo mais indicado foi o HKY+I. O modelo HKY+I (Hasegawa *et al.* 1985) trabalha como se a frequência de todas as bases é desigual e que as transições e transversões apresentam taxas de substituição diferentes. As árvores filogenéticas por inferência bayesiana foram realizadas pelo software *Geneious* com adição do plug-in do *Mr. Bayes*, no qual as Análises de MCMCMC (*Metropoliscoupled Markov chain Monte Carlo*) implementadas no programa foram utilizadas para estimar a probabilidade posterior de cada um dos clados encontrados na melhor topologia. Quatro grupos de cadeias rodadas por 1.000.000 gerações e sendo uma topologia salva de cada grupo a cada 200 gerações. Para sumarização dos valores paramétricos e das árvores geradas foram descartadas 20% das árvores.

O software DnaSP v.5.10 (Librado & Rozas 2009) foi utilizado para separar os grupos de haplótipos, determinar o número de sítios polimórficos e número de haplótipos (H). A rede de haplótipos foi produzida pelo programa NETWORK v. 4.6 (Polzin & Daneshmand 2003), utilizando o algoritmo *Median Joining* (Bandelt *et al.* 1999) que identifica os haplótipos evolutivamente mais próximos entre si. Foi feita uma análise complementar utilizando a ferramenta de delimitação de espécies interface web do ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery - Puillandre *et al.* 2012) através do modelo Kimura-2-Parametro (K2P) (padrão *barcoding*) e valor para largura do gap sendo $X=1$, a fim de verificar a delimitação específica entre as amostras de diferentes morfotipos.

Como representantes do grupo externo, foram utilizadas sequências de *Xylocopa* disponíveis no *GenBank*. *Neoxylocopa* tem sua monofilia bem suportada por caracteres morfológicos (Minckley 1998) e moleculares (Leys *et al.* 2000; 2002), sendo desse modo selecionados representantes desse subgênero *Xylocopa Neoxylocopa sonora* (*COI* - KX055189), *Xylocopa Neoxylocopa frontalis* (*COI* - KC853310 e *CytB* - AY005275), *Xylocopa Neoxylocopa grisescens* (*COI* - JQ230009), *Xylocopa Neoxylocopa gualanensis* (*CytB* - AY005273) e *Xylocopa Neoxylocopa cubaecola* (*COI* - KP253873) (Anexo I), por potencialmente estarem mais próximos das morfoespécies de interesse e dois representantes de outros subgêneros próximos para se

proceder o enraizamento, *Xylocopa Stenoxycopa micheneri* (CytB - AY005271) e *Xylocopa Alloxycopa appendiculata* (COI - LC492865 e CytB - EU722495) (Anexo I). Não foi possível encontrar sequências do grupo externo dos três genes para todas as espécies analisadas (COI: 47 terminais no grupo interno e cinco no grupo externo; CytB: 19 terminais no grupo interno e quatro no grupo externo).

4. RESULTADOS

4.1. História taxonômica das espécies nominais *X. nigrocincta* e *X. suspecta*

Xylocopa nigrocincta foi descrita pela primeira vez por Smith (1854) com as seguintes características: “cabeça e mesossoma pretos; o metassoma com cor ferrugínea e as margens apicais dos tergos com faixas pretas, o segmento apical preto; os lados ciliados com pubescência preta; possui uma carena longitudinal central entre as antenas e as asas ferrugíneas com uma esplêndida iridescência violeta” (tradução livre atualizando terminologia). Seu holótipo é proveniente da América do Sul sem indicação de localidade específica.

Após Smith (1874) mencioná-la em sua monografia das *Xylocopa*, vários autores citaram essa espécie nominal (Dalla Torre 1896; Schrottky 1902; Bertoni 1918; Dusmet & Alonso 1924; Sakagami & Laroca 1971) conforme relatado no Catálogo de Abelhas Neotropicais (Moure, 2012). Moure & Hurd (1963) estabeleceram a sinonímia com *X. schultessi* que havia sido descrita por Dusmet & Alonso (1924) a partir de exemplar coletado no Rio Grande do Sul.

Trabalhos recentes tratando de faunas regionais de *Xylocopa* têm apresentado definições ligeiramente diferentes para caracterizar a espécie. Segundo Lucia & Gonzalez (2017), *X. nigrocincta* pode ser facilmente identificada pelas seguintes características: todos os tergos abdominais são castanho avermelhados, exceto T6, e as asas são castanho escuras com forte reflexo violeta e pilosidade preta. Por sua vez, Marchi & Alves dos Santos (2013) definem *X. nigrocincta* pelo integumento predominantemente preto, os três ou quatro primeiros tergos com faixas ferrugíneas, com tergo 5 escurecido e tergo 6 preto, e asas ferrugíneas escuras com forte brilho violáceo. Em contrapartida, Schlindwein *et al.* (2003) relata que essa espécie pode ser diferenciada das demais pela presença de faixas tegumentares avermelhadas, às vezes fracas e asas pretas com forte brilho violáceo. É importante registrar que os autores desse último trabalho, incluindo Moure, não mencionam o número de faixas, não sendo claro se observaram variação.

Ao descrever *X. suspecta*, Moure & Camargo (1988) debateram sobre distinção das fêmeas com as espécies *X. carbonaria*, *X. submordax* e *X. ordinaria*, consideradas simpátricas e igualmente melânicas. Foram destacados como caracteres, o tamanho corporal, pontuação esparsa no disco do segundo tergo com pelos curtos e asas com brilho esverdeado. Além do brilho verde das asas de *X. suspecta* que contrasta com o brilho violáceo-púrpura de *X. ordinaria*. Outro caracter de delimitação seria a pontuação do segundo tergo metassomal, que em *X. suspecta* é esparsa e com pelos curtíssimos e em *X. ordinaria* é muito densa e com pelos que se sobrepõem. Seu holótipo é de Ribeirão Preto/SP.

De forma semelhante, o reconhecimento dessa espécie nominal tem sido diferente conforme os autores. Na sua chave de identificação, Schilindwein *et al.* (2003) propõem que *X. suspecta* é diferenciada das demais espécies por serem inteiramente pretas, com asas pardo-escuras com forte reflexo esverdeado, o segundo tergo com a pontuação muito esparsa no disco com pelos curtos e o intervalo entre os pontos é maior que quatro diâmetros de ponto. Marchi & Alves dos Santos (2013) definem *X. suspecta* pelas asas com forte brilho verde metálico, podendo ser violáceo perto da base, disco do segundo tergo com pontuação moderadamente esparsa a esparsa, distância entre os pontos maior que seu próprio diâmetro e pelos curtíssimos no disco e mais densos nas laterais. Em contrapartida, na sua chave de identificação para espécies do gênero *Xylocopa* encontradas na Amazônia, Mawdsley (2018) utiliza apenas o caráter asas com brilho uniformemente esverdeadas ou esverdeadas com leve brilho dourado para separá-la de outras espécies.

Recentemente Lucia & Gonzalez (2017) afirmam que *X. nigrocincta* e *X. suspecta* podem ser coespecíficas, pois consideraram espécimes masculinos e femininos etiquetados como *X. suspecta* e coletados na Bolívia (El Beni) como indistinguíveis de *X. nigrocincta*, inclusive na genitália masculina. Além disso, Lucia & Gonzalez (2017) afirmam que *X. andica*, uma espécie citada até o momento somente para a localidade tipo, em Chanchamayo, Peru, pode também ser coespecífica.

A distribuição registrada na literatura para as duas espécies nominais é em grande parte simpátrica (Figura 1 - Introdução). De acordo com Moure (2012), *X. suspecta* possui ocorrência registrada no Brasil da Paraíba ao Pará e ao sul até o Rio Grande do Sul, se estendendo até Bolívia, Argentina e Uruguai. Mawdsley (2018) cita também o estado de Roraima. E *X. nigrocincta* é citada por Moure (2012) da Bahia ao Mato Grosso e ao sul até o Rio Grande do Sul, se estendendo até Buenos Aires e La Rioja na Argentina. Entretanto, Lucia *et al.* (2014), ao

revisar as espécies desse país, colocam em dúvida a ocorrência em Buenos Aires, Córdoba e La Rioja. Esses autores também não registram *X. suspecta*, apesar de terem analisado 259 exemplares.

4.2. Caracterização morfológica

Foram estudados duzentos e trinta e dois exemplares, sendo cinquenta coletados durante o projeto, cento e cinquenta e cinco obtidos por empréstimo (Anexo I) e vinte e sete exemplares adicionais das coleções da UFTO e da UENF foram analisados nas instituições para complementar a distribuição referente ao número de faixas. Foi observada a variação contínua no número de faixas metassomais ferrugíneas, desde inteiramente pretos até com seis faixas (Figura 2), não permitindo para vários espécimes associar com clareza à espécie nominal, de acordo com as descrições presentes na literatura.

O padrão de pontuação do T2 variou entre muito esparso, esparso e moderadamente denso tanto nas formas inteiramente pretas, usualmente reconhecidas como *X. suspecta* como nas com faixas ferrugíneas no metassoma (Figura 3). Cabe ressaltar que o principal caracter diagnóstico entre *X. suspecta* e *X. ordinaria* é a pontuação no T2. Em *X. ordinaria*, a pontuação tende a ser muito densa, assemelhando de certo modo com as Figura 3 C e F.

A placa basitibial teve variações quanto ao formato dos ápices da região apical posterior e anterior em ambas as formas, *nigrocincta* e *suspecta*. O ápice do lobo apical posterior geralmente sendo mais curto que o anterior e tendo ângulo arredondado ou mais retilíneo (quase 90°), enquanto que o lobo apical anterior pode apresentar o ápice com formato fino ou da mesma largura que sua base (Figura 4).

O brilho metálico das asas foi também variável em ambas as formas. Observaram-se indivíduos de asas com forte brilho violáceo por toda sua extensão, podendo apresentar manchas azuladas em ambas as formas, bem como outros com brilho predominantemente verde metálico e levemente dourado na porção apical ou com brilho predominantemente azulado, esse último podendo ser visto somente em *X. suspecta* (Figura 5).

Foi realizada uma busca exaustiva na morfologia externa de fêmeas para registrar a variação em outros caracteres que potencialmente pudessem ser úteis como diagnóstico, que não tenham

tido citados na literatura, mas todos os estados ocorriam nas formas *nigrocincta* e *suspecta* (Anexo III).



Figura 2. Variação no número de faixas ferrugíneas nos tergos do metassoma de *Xylocopa* das formas *nigrocincta* e *suspecta*. A: Tergos metassomais inteiramente pretos. B: Uma faixa. C e D: Duas faixas, no qual C possui uma pequena mancha no T1 e faixas no T2 e T3. E: Três faixas. F: Quatro faixas. G: Cinco faixas. H: Seis faixas. Escala: 1 mm.

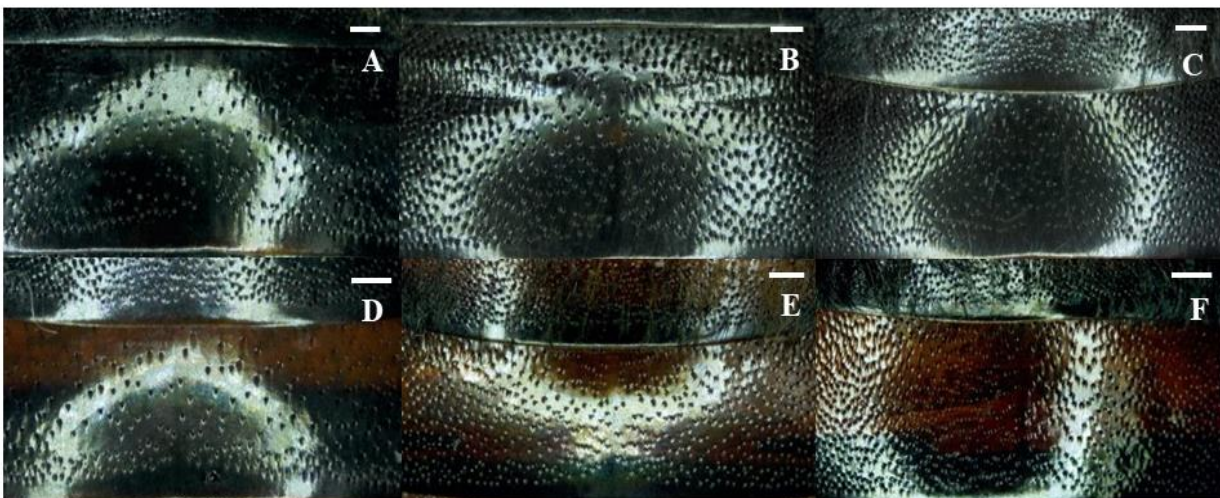


Figura 3. Variação na pontuação metassomática do segundo tergo nas formas *nigrocincta* e *suspecta*. A e D: pontuação muito esparsa. B e E: pontuação esparsa. C e F: pontuação moderadamente densa. Escala: 1mm.

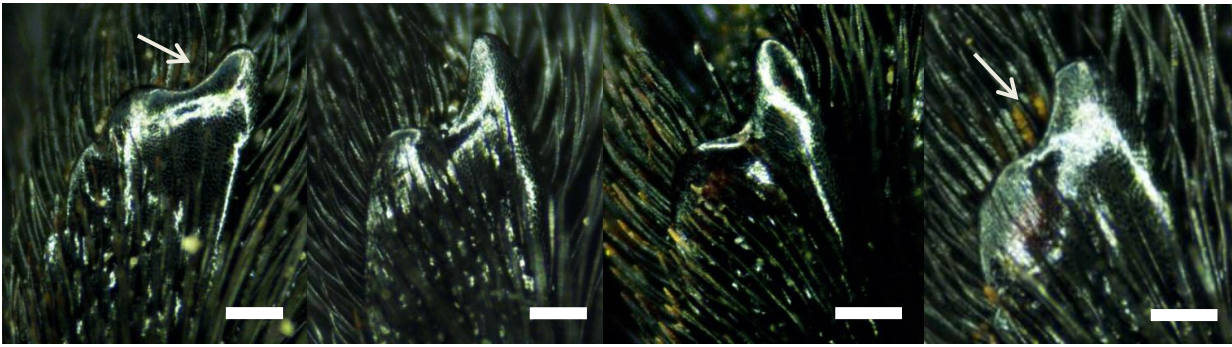


Figura 4. Variação no formato nas regiões apical posterior e anterior da placa basitibial nos morfotipos de *nigrocincta* e *suspecta*. Escala: 1 mm.



Figura 5. Variação na coloração das asas nas formas *nigrocincta* e *suspecta*. A e B: morfotipo de *suspecta*. C: morfotipo de *nigrocincta*. Escala: 1cm.

4.3. Mapeamento da distribuição por morfotipos

Os espécimes examinados permitiram registrar o morfotipo inteiramente preto em uma distribuição mais ampla, em quase todo o Brasil, do Amapá ao Paraná e do litoral do nordeste até a fronteira do Brasil com o Peru (Figura 6). O Amapá, Amazonas, Acre, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Piauí, Ceará e Maranhão representam novos registros de distribuição, considerando as citações para *X. suspecta* na Figura 1, como correspondentes à essa forma. Também é possível observar algumas lacunas relacionadas às formas intermediárias (uma, duas e três faixas), como no estado de Goiás e no norte da Bahia. As formas intermediárias, com uma ou duas faixas apresentaram distribuição mais restrita, sendo encontradas somente nas em algumas regiões do sul, sudeste e centro-oeste (Figura 6). No novo mapeamento que é representado pela Figura 7, foi indicada a proporção de cada morfotipo por estado/província ou país, sendo possível observar que aqueles com registro exclusivo da forma com 4 faixas ou mais estão na porção mais ao sul da distribuição, incluindo algumas regiões da Argentina (apenas aquelas possuem ocorrências previamente conhecidas) e o estado de Santa Catarina. A distribuição dos indivíduos com diferentes padrões de pontuação do T2 não permitem reconhecer nenhum possível padrão de distribuição para essa característica (Figura 8). Os únicos estados brasileiros onde havia espécimes com apenas um padrão, são aqueles com menor número de indivíduos examinados, portanto, é possível que todos os três morfotipos estivessem presentes em toda a distribuição registrada, se mais indivíduos fossem analisados.

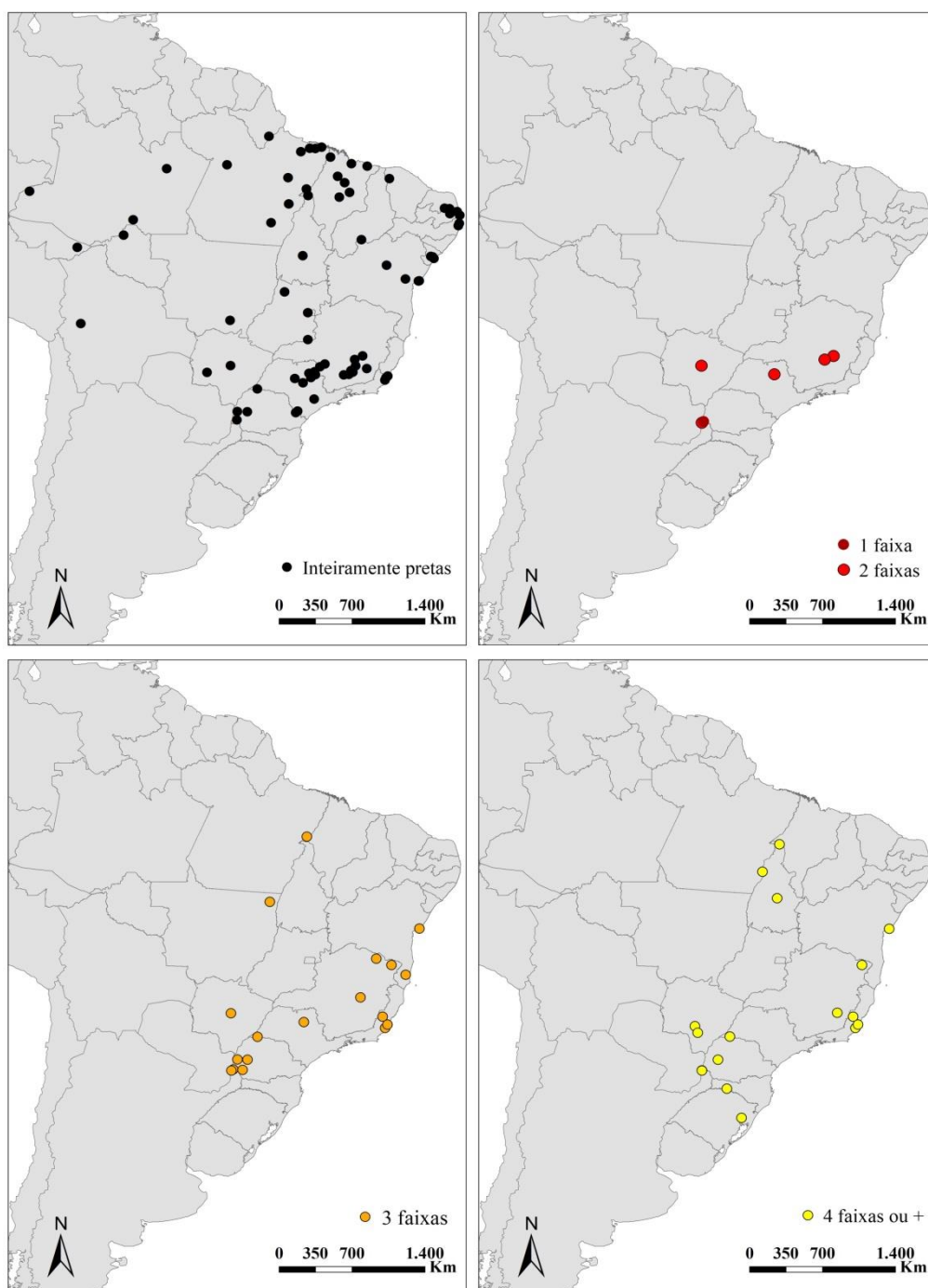


Figura 6. Distribuição dos morfotipos coletados ou obtidos por empréstimos para as formas *nigrocincta* e *suspecta* conforme espécimes examinados.

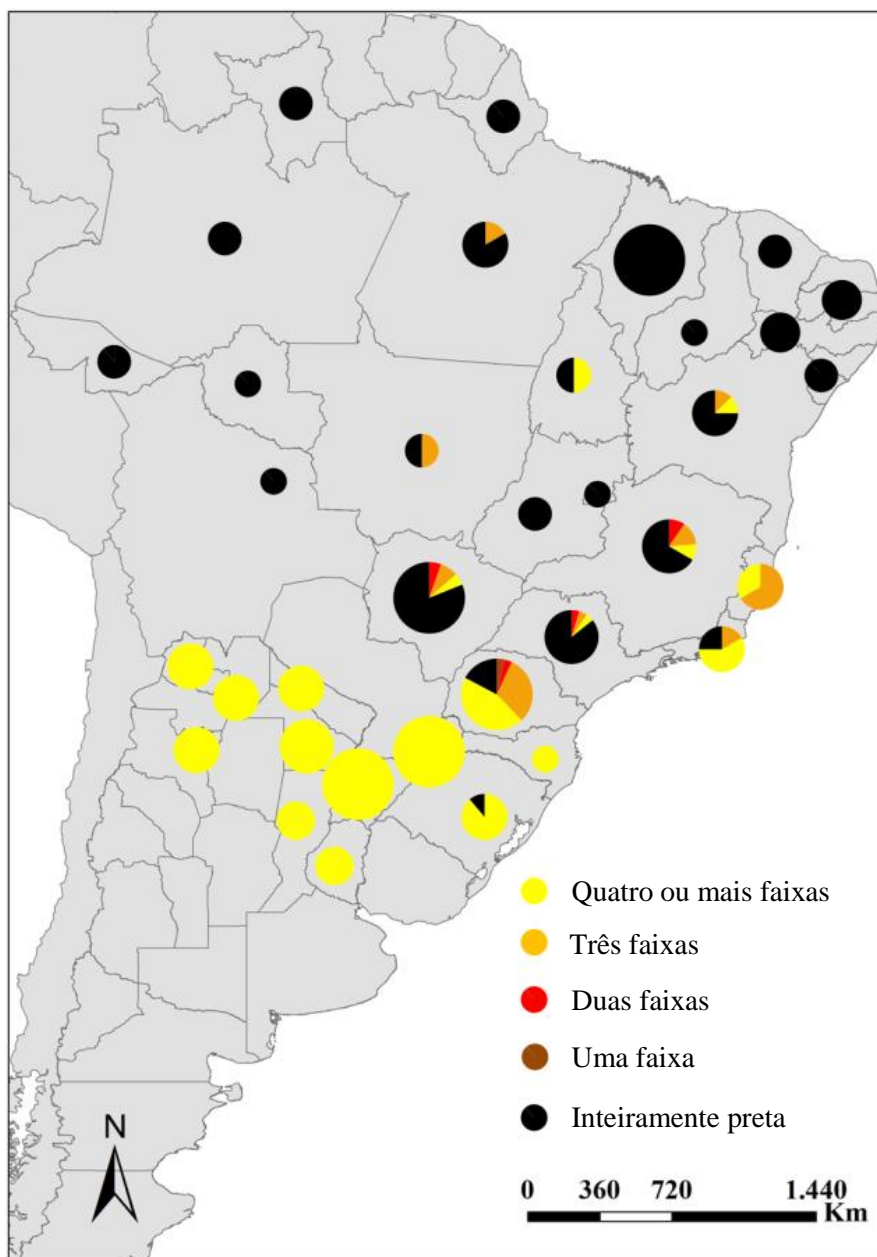


Figura 7. Frequência da distribuição das formas *nigrocincta* e *suspecta*, conforme material examinado mais Moure e Camargo (1988), Schindwein *et al.* (2003), Lucia *et al.* (2014) e Mawdsley (2018). O tamanho de cada círculo representa a quantidade de espécimes registrada em cada estado ou província. A menor circunferência corresponde a um indivíduo, as intermediárias de 2–5, 6–15 e 16–25 e a maior a 26 indivíduos ou mais. A divisão em cores dos círculos corresponde a frequência de cada padrão de faixas observado.

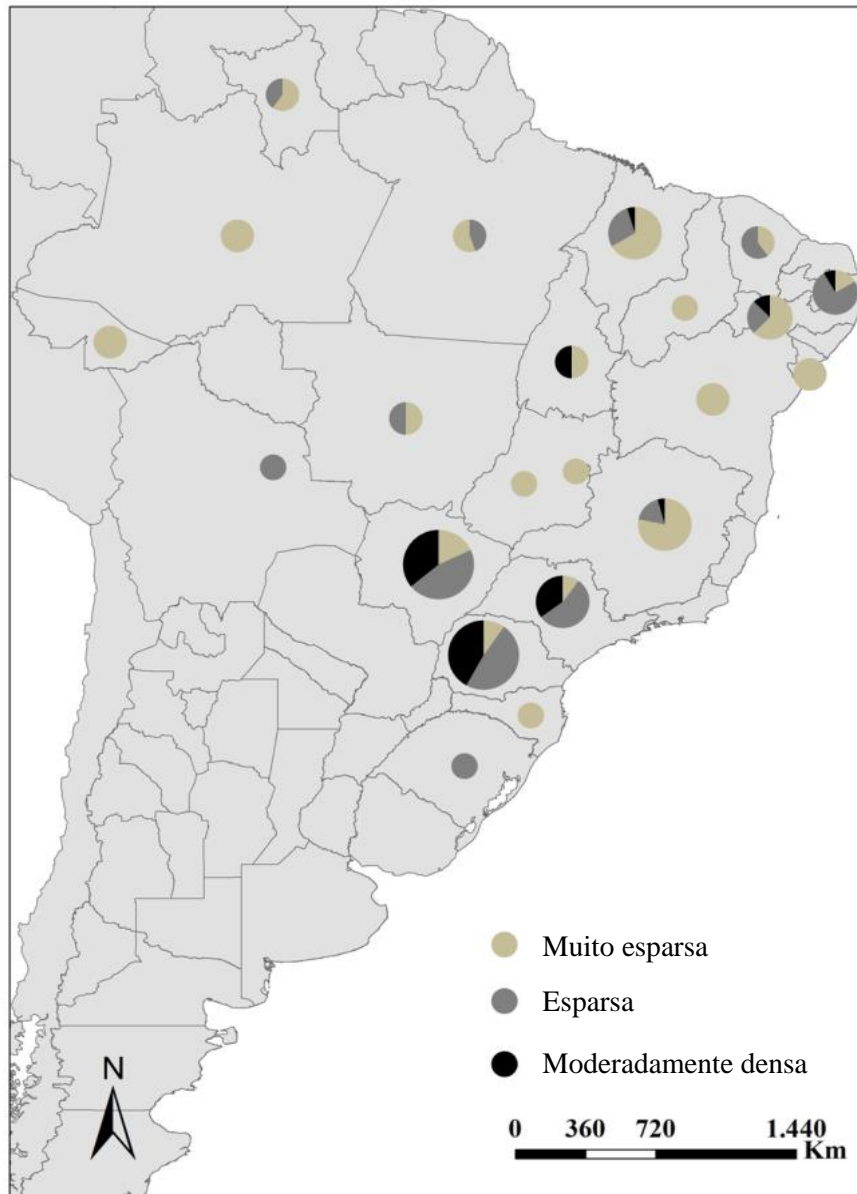


Figura 8. Distribuição morfológica baseada no padrão de variação do segundo tergo metassomal nos morfotipos de *nigrocincta* e *suspecta*. O tamanho do círculo representa a quantidade de espécimes registrados em cada estado ou província. O menor círculo corresponde a um indivíduo, os círculos intermediários correspondem a 2–5, 6–15, 16–25 e o maior corresponde a 26 indivíduos ou mais. A divisão de cores dos círculos corresponde a frequência do padrão de bandas observadas.

4.4. Análise dos dados moleculares

De início foram amplificados 77 exemplares, mas apenas 10 para *EF-1 α* , 19 para *CytB* e 47 para *COI* foram amplificados com sucesso. Foram obtidas sequências do gene *EF-1 α* de 219 pb para oito indivíduos de ambas as formas. Os resultados partir do alinhamento revelou uma variação genética extremamente baixa entre os diferentes morfotipos e na árvore consenso reconstruída pelo método de análise Bayesiana revelou um único grupo que agrupava todos os oitos representantes.

Foram obtidas sequências de *COI* de 300 pb para 47 indivíduos, sendo observada uma proporção de nucleotídeos de T= 32,8% ,C= 10,5%, A= 44,6% e G= 11,8%. Para a região de *CytB*, obtivemos 19 sequências com 268 pb. A proporção de nucleotídeos observada para essa região foi de T= 46,8%. C= 10%, G= 8,1% e A= 35,1%. Os diferentes morfotipos, definidos pela presença de faixas ferrugíneas, apresentaram alta similaridade média entre as sequências quando comparados entre si, com distância variando de 0,7 – 1,4% para *CoI* e próximo a 1,2% para *CytB*. A similaridade foi menor com o grupo externo, sendo as distâncias superiores a 5% para *COI* e 13% para *CytB* (Tabelas 2 e 3). Em nossos resultados, a variação média intraespecífica entre diferentes morfotipos para sequências parciais de *COI* e *CytB* foi sempre inferior a 1,5% sendo compatível com os valores esperados para uma variação dentro de uma única espécie.

Na análise dos haplótipos, foram encontrados quatorze haplótipos para *COI* (Fig. 9 e Tabela 4) com 19 sítios polimórficos sumarizados na Tabela 5, sendo o haplótipo H2 o mais frequente e amplamente distribuído nas amostras. Diferentes morfotipos das formas *nigrocincta* e *suspecta* apresentam o mesmo haplótipo, como visto em H2, H5, H6, H8, H12 e H13. Haplótipos exclusivos também foram visualizados, sendo estes com distribuição mais restrita nos limites dos exemplares estudados: H1 e H9 (Pará), H3 e H4 (Pernambuco), H7 (Ceará), H10, H11 e H14 (Paraná). Os haplótipos mais distantes dos demais em *COI* são H1 (Pará) e H10 (Paraná), correspondendo com cinco e três passos mutacionais, respectivamente. Os demais haplótipos mostram-se mais próximos em relação ao número de passos mutacionais.

Na região analisada em *CytB* foram encontrados nove haplótipos (Fig. 9 e Tabela 4) com treze sítios polimórficos sumarizados na Tabela 6, sendo o haplótipo H7 o mais frequente e amplamente distribuído. Os haplótipos exclusivos foram H1 (Pará), H5 e H6 (Paraná), H8 e H9 (São Paulo). Os haplótipos mais distantes foram o H1 (Pará), H3 (Minas Gerais) e H4 (São Paulo e Minas Gerais). Aparentemente existe certo padrão espacial na rede de haplótipos bem como nos morfotipos indicados na figura 7, o que pode permitir como potencial para se avaliar a

filogeografia das formas em trabalhos futuros. O número de indivíduos analisados para cada marcador e seus respectivos estados de origem é apresentado na Tabela 4 e podem ser visualizados geograficamente pela Figura 10.

Foram reconstruídas árvores filogenéticas a partir da inferência bayesiana para ambos os fragmentos de genes, *COI* e *CytB*, e para ambas as formas, *nigrocincta* e *suspecta* (Figuras 11 e 12). As análises foram realizadas para os genes de forma individual e em ambas as topologias não há a possibilidade de se reconhecer agrupamentos distintos para as formas ou morfotipos. Os resultados encontrados para as sequências de *CytB* demonstram a existência de clados com topologias bem suportadas para o grupo interno, independente dos morfotipo, mas com união de regiões geográficas, ocorrendo um agrupamento dos espécimes provenientes de Minas Gerais daquelas que ocorrem no Paraná e São Paulo. Apesar desse agrupamento, alguns outros indivíduos desses estados são encontrados no meio das politomias.

O haplótipo H1 é o mais distante, tanto para *COI* quanto para *CytB* e sendo exclusivo de um indivíduo do oeste do Pará (Figuras 9 e 10 e Tabelas 5 e 6). Apesar de ter sido coletado outro indivíduo do mesmo estado, essa sequência foi a única obtida para localidade. A distância em relação a outros exemplares sequenciados é grande, mas não suficiente para separá-las como outra espécie. Adicionalmente, deve ser destacado que em todas as politomias observadas dentro do grupo interno são formadas por representantes das formas *suspecta* e *nigrocincta*.

Não foi observado nenhum intervalo de divergência entre as sequências dos representantes inteiramente pretos (forma *suspecta*) e com faixas avermelhadas (forma *nigrocincta*) na análise ABGD feita para os fragmentos de *COI* e *CytB* (Figura 13).

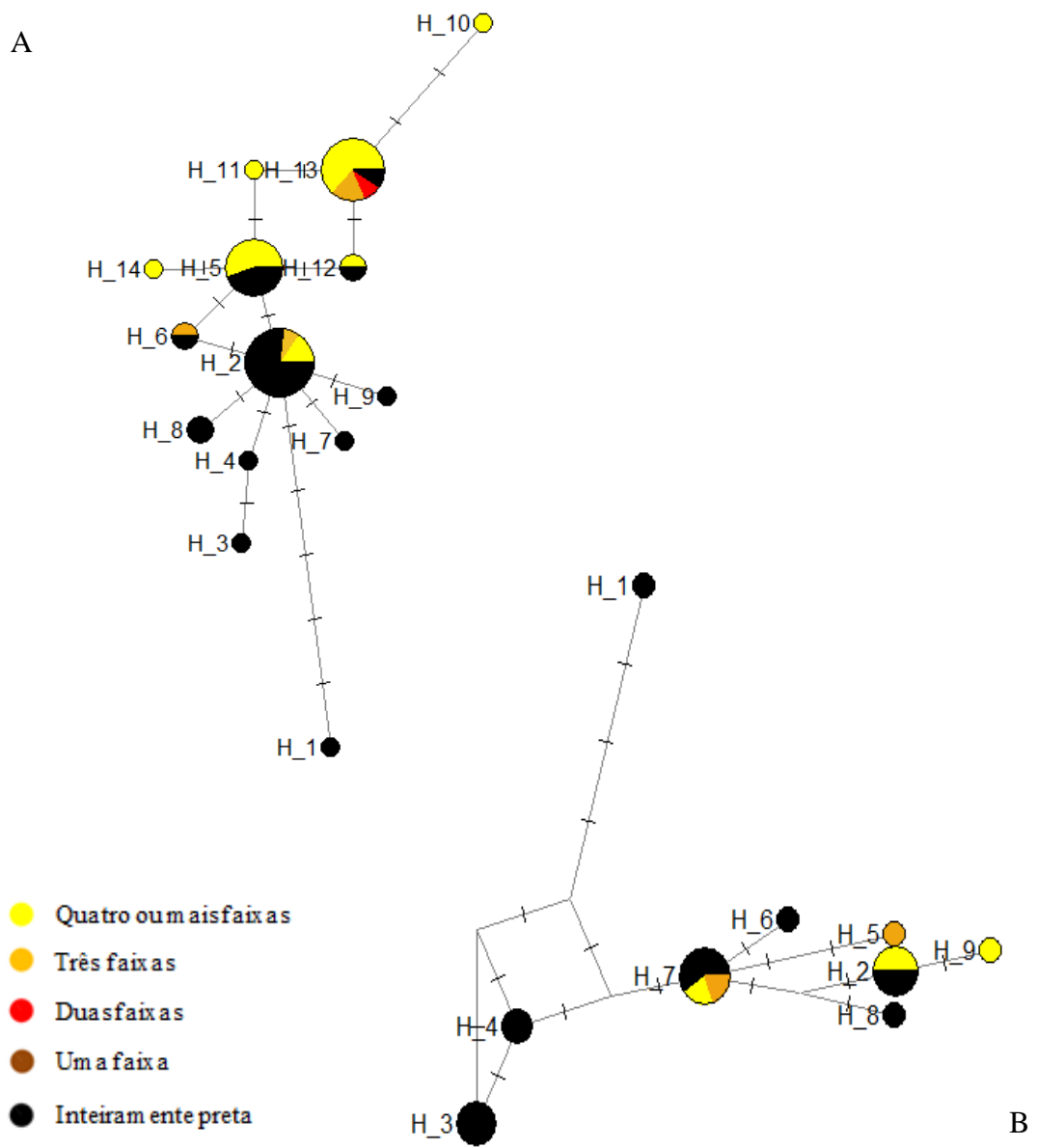


Figura 9. Rede de haplótipos baseada nos fragmentos de *COI* (A) e *CytB* (B) para os morfotipos de *nigrocincta* e *suspecta*.

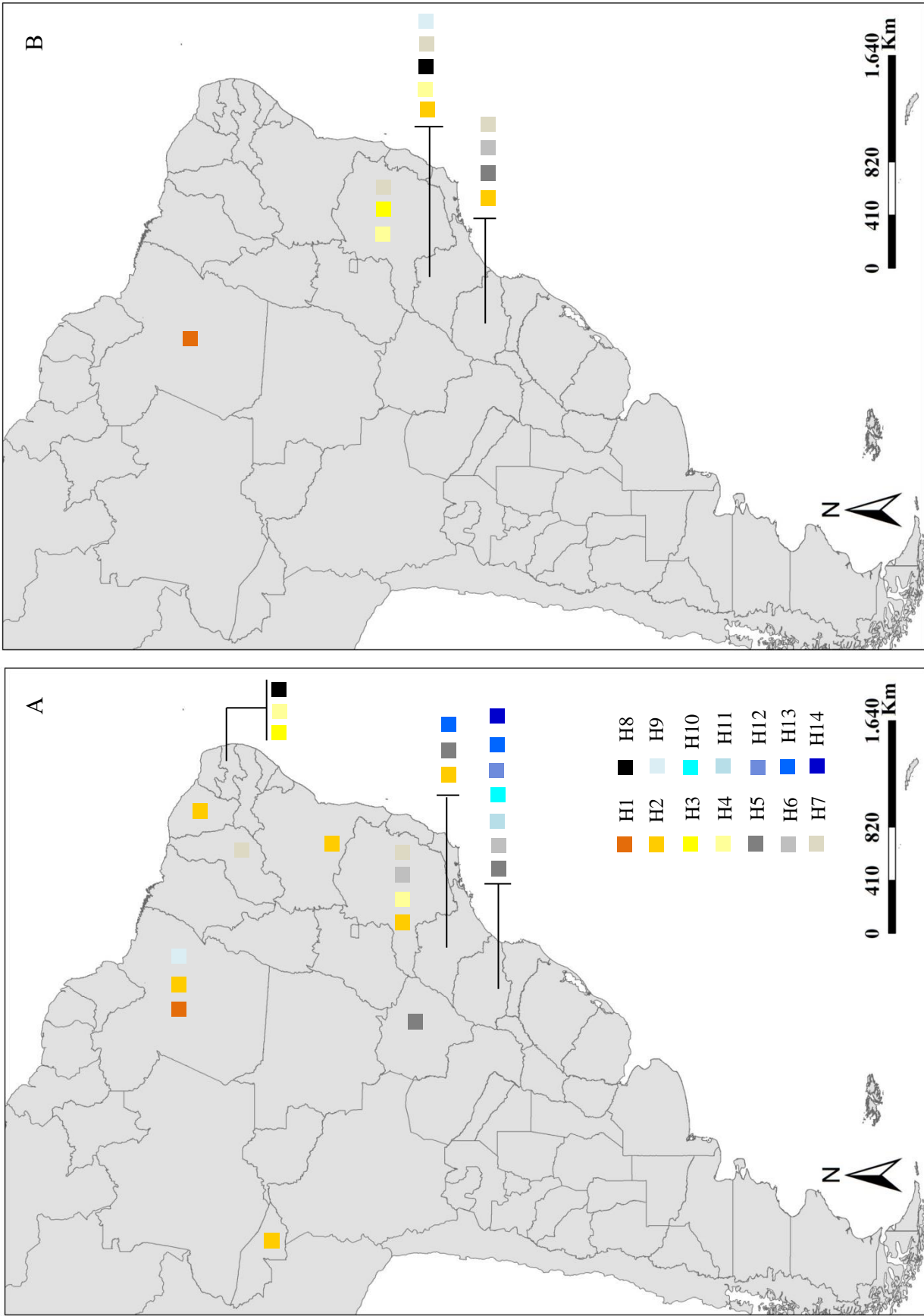


Figura 10. Mapa da distribuição da rede de haplótipos utilizando sequências dos genes mitocondriais *Citocromo C oxidase subunidade I (COI)* e *Citocromo B (CytB)* de espécimes das formas *nigrocincta* e *suspecta*. A: fragmento de *COI*. B: fragmento de *CytB*. A coloração da distribuição dos haplótipos é baseada na latitude e longitude. As cores representam as regiões norte e nordeste, enquanto que

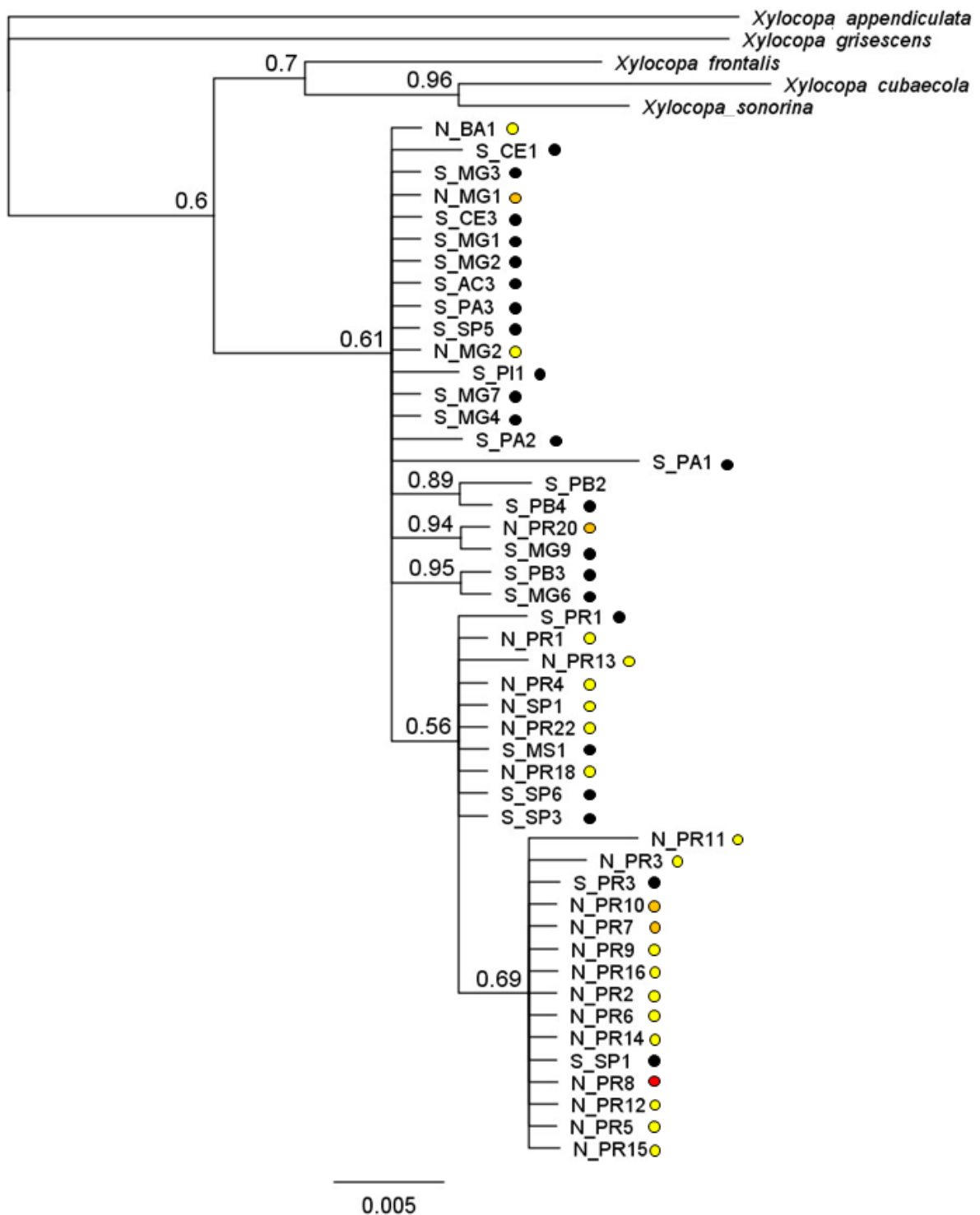


Figura 11. Árvore consenso proveniente da análise Bayesiana de dados moleculares do gene *COI* para os morfotipos de *nigrocincta* e *suspecta*. O suporte de probabilidade posterior é indicado atrás dos ramos. As cores dos círculos são baseadas em um diagnóstico quanto ao número de faixas nos indivíduos. Preto: inteiramente preto. Vermelho: duas bandas. Laranja: três bandas. Amarelo: quatro bandas ou mais.

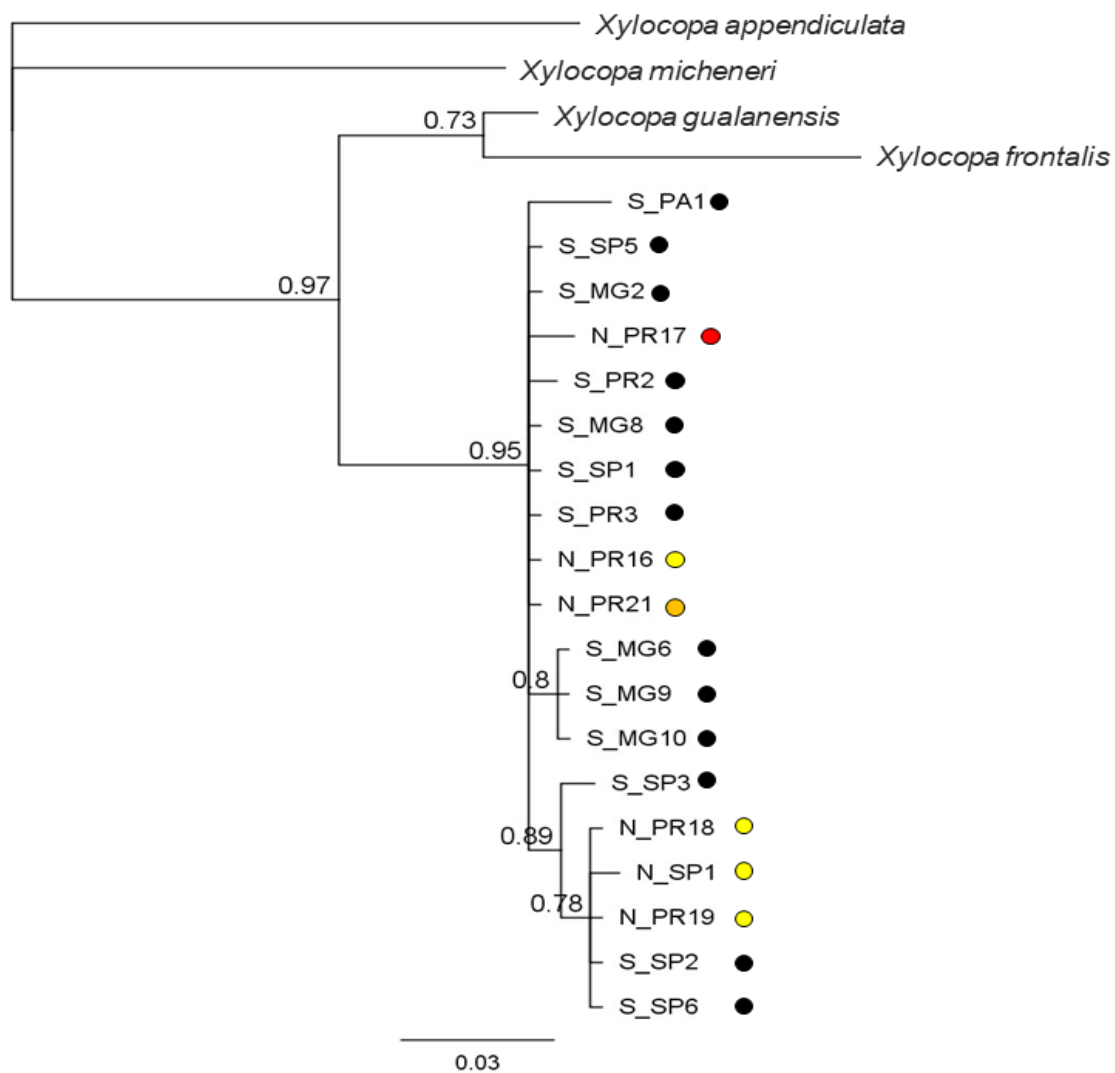


Figura 12. Árvore consenso proveniente da análise Bayesiana de dados moleculares do gene *CytB* para os morfotipos de *nigrocincta* e *suspecta*. O suporte de probabilidade posterior é indicado atrás dos ramos. As cores dos círculos são baseadas em um diagnóstico quanto ao número de faixas nos indivíduos. Preto: inteiramente preto. Vermelho: duas bandas. Laranja: três bandas. Amarelo: quatro bandas ou mais.

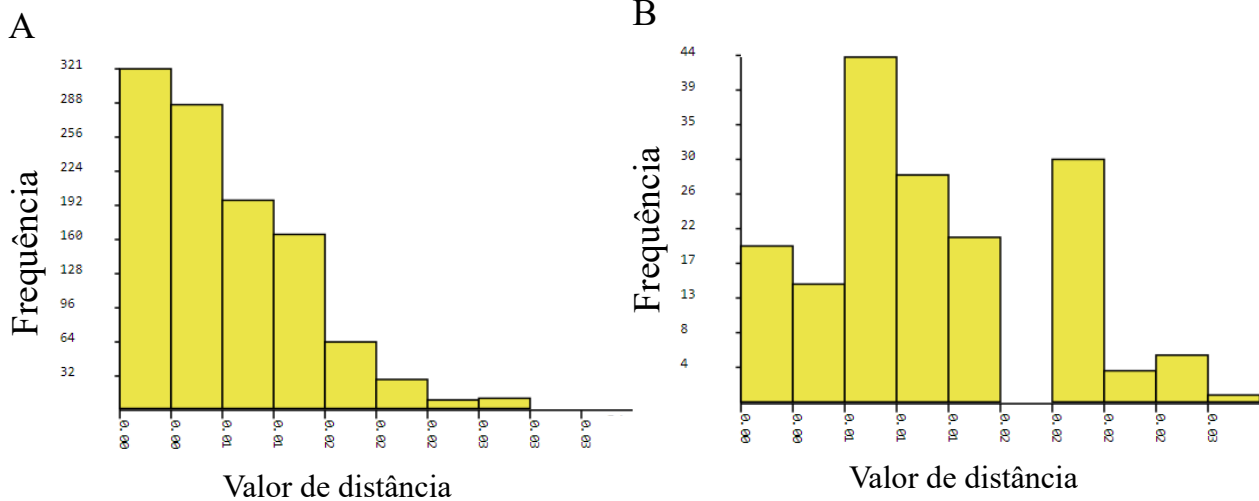


Figura 13. Histograma da distribuição de distância genética entre as sequências para os morfotipos *nigrocincta* e *suspecta*. Frequência dos valores de distância por pares de sequência de *COI* (A) e *CytB* (B).

Tabela 2. Média da distância genética da região de *COI* entre os morfotipos das formas *nigrocincta* e *suspecta* e o grupo externo.

Grupos	1	2	3	4
1 Inteiramente preta				
2 2 faixas	0,014			
3 3 faixas	0,010	0,007		
4 4 faixas ou +	0,010	0,006	0,007	
5 Outgroup	0,050	0,057	0,053	0,054

Tabela 3. Média da distância genética da região de *CytB* entre os morfotipos das formas *nigrocincta* e *suspecta* e o grupo externo.

Grupos	1	2	3
1 Inteiramente preta			
3 3 faixas	0,011		
4 4 faixas ou +	0,012	0,011	
5 Outgroup	0,138	0,141	0,143

Tabela 4. Haplótipos encontrados a partir do sequenciamento de uma região do gene mitocondrial de *Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI)* e *Citocromo b (CytB)* e com os indivíduos representantes.

<i>COI</i>		<i>CytB</i>	
Haplótipo	Indivíduos	Haplótipo	Indivíduos
H_1	S_PA1	H_1	S_PA1
H_2	S_AC3; S_PA3; S_PI1; S_CE3; N_BA1; S_MG7; S_MG4; S_MG3; S_MG2; S_MG1; N_MG2; N_MG1; S_SP5	H_2	S_SP6; S_SP2; N_PR19; N_PR18
H_3	S_PB2	H_3	S_MG10; S_MG9; S_MG6
H_4	S_PB4	H_4	S_MG2; S_SP5
H_5	S_SP6; S_SP3; S_MS1; S_PR1; N_PR1; N_PR4; N_SP1; N_PR22; N_PR18	H_5	N_PR17
H_6	S_MG9; N_PR20	H_6	S_PR2
H_7	S_CE1	H_7	S_MG8; S_SP1; N_PR21; N_PR16; S_PR3; N_PR21
H_8	S_PB3; S_MG6	H_8	S_SP3
H_9	S_PA2	H_9	N_SP1
H_10	N_PR11		
H_11	N_PR3		
H_12	S_PR3; N_PR15		
H_13	S_SP1; N_PR10; N_PR16; N_PR14; N_PR12; N_PR9; N_PR8; N_PR7; N_PR6; N_PR5; N_PR2		
H_14	N_PR13		

Tabela 5. Sítios variáveis dos 14 haplótipos encontrados para o fragmento de 300 pb do gene *COI*. Os números verticais acima indicam as posições dos mesmos

Haplótipos	Sítios polimórficos															
	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
	4	8	0	0	0	2	2	3	6	6	9	0	2	2	3	5
	4	9	1	3	6	5	8	1	4	6	3	5	2	9	4	8
H 1	G	.	.	G	.	.	.	A	G	.	T
H 2	A	T	T	A	A	A	T	T	A	T	A	T	.T	A	.T	C
H 3	.	C	G
H 4	G
H 5	T
H 6	G
H 6	G
H 7	C
H 8	C
H 9	C	.
H 10	G	T	C	.	.	.	G	.	C	.	.	.
H 11	G	T
H 12	T	C
H 13	G	T	C
H 14	.	.	C	.	.	T

Tabela 6. Sítios variáveis dos nove haplótipos encontrados para o fragmento de 268 pb do gene *CytB*. Os números verticais acima indicam as posições dos mesmos.

Haplótipos	Sítios polimórficos													
	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	2	5	8	9	0	1	1	4	4	5	9	9	0	
	9	0	0	8	7	3	6	6	9	5	1	4	0	
H 1	A	C	.	.	T	.	C	T	.	
H 2	G	G	.	.	.	
H 3	C	T	
H 4	T	
H 5	.	C	C	
H 6	.	.	.	G	
H 7	T	T	T	A	A	T	A	A	C	A	T	C	C	
H 8	G	.	G	.	.	.	
H 9	G	.	G	.	.	G	.	.	.	

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização morfológica

A abordagem morfológica tradicional é geralmente o método mais fácil e comum para delimitar espécies (Løken 1984; Bolton 1995; Michez & Eardley 2007). Entretanto, caracteres morfológicos que refletem com precisão as unidades taxonômicas geralmente são difíceis de determinar (Bickford *et al.* 2007), pois os indivíduos podem exibir uma variação nos caracteres, sendo essa variação usualmente chamada de polimorfismo. Segundo Sigovini *et al.* (2016) os caracteres polimórficos são usualmente utilizados para identificar espécies, e assim, podendo ser considerada como mais de uma espécie diferente, causando uma superestimação da diversidade. A identificação incorreta de espécies pode ser frequente quando espécies crípticas ou polimórficas estão presentes numa população. Além disso, a identificação incorreta é comum quando apenas chaves taxonômicas são usadas para identificação e frequentemente gerando uma lacuna nas informações de diagnóstico das espécies (Bickford *et al.* 2007; Padial *et al.* 2010).

Nos resultados das análises morfológicas foram encontrados variações em diversos caracteres morfológicos, como por exemplo, variação na coloração das asas, variação na cor do número de faixas metassomais, variação no formato da placa basitibial e variação na pontuação do segundo tergo metassomal. Os três caracteres mais importantes para delimitação de espécies do gênero *Xylocopa* são: 1) número de faixas metassomais ferrugíneas, podendo ser encontrados indivíduos desde inteiramente pretos até com seis bandas metassomais avermelhadas. 2) pontuação no segundo tergo metassomal, com indivíduos apresentando pontuação com variação muito esparsa, esparsa e moderadamente densa. 3) indivíduos com diferentes brilhos metálicos nas asas podendo ser violáceo por toda sua extensão, apresentando manchas azuladas em ambas as formas, bem como outros com brilho predominantemente verde metálico e levemente dourado na porção apical ou com brilho predominantemente azulado, esse último podendo ser visto somente em na forma *suspecta*. É importante destacar que essa variação no número de faixas metassomais e o brilho metálico das asas pouco eram discutidos em estudos anteriores, e sempre foi utilizada por diversos autores (Camilo *et al.* 1986; Witman & Scholz 1989; Lucia *et al.* 2009; Bernadino *et al.* 2008; Chaves-Alves *et al.* 2011; Carvalho *et al.* 2013; Figueiredo *et al.* 2013; Marchi & Alves 2013; Lucia *et al.* 2014) para separar as formas *nigrocincta* e *suspecta*. E também podemos citar *X. ordinaria* também é separada da forma *suspecta* pela pontuação do segundo tergo metassomal e algumas vezes pela brilho das asas.

A característica de coloração (seja corporal ou das asas) é muito utilizada na taxonomia tradicional de abelhas para separar táxons (Pamilo *et al.* 1984; Waldschmidt *et al.* 2000).

Entretanto, quando essa característica é exclusivamente utilizada para uma classificação, a análise não é considerada segura (Estoup *et al.* 1996; Carolan *et al.* 2012). As variações de cores corporais têm sido constantemente relatadas para diversas espécies dentro da ordem Apidae (Williams 2007), e apresentando padrões de distribuição de cores dentro, podendo estar relacionado com a distribuição espacial. Batalha-Filho *et al.* (2010) no seu trabalho sobre *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836 apresentou uma certa estruturação no padrão de distribuição das faixas tergais (contínuas, interrompida ou intermediária). Ferrari & Melo (2014) observaram que a variação de cores para exemplares de *Euglossa*, os quais indivíduos com tons quentes (verde e avermelhado) se encontram ao sul e indivíduos com tons frios (azul com nuances em violeta) estão distribuídos pela região norte do Brasil. França *et al.* (2016) obteve dados sobre a distribuição do padrão de coloração de *Bombus pauloensis* Friese, 1913 apresentou indivíduos inteiramente pretos ao norte, com uma zona híbrida na região central e indivíduos amarelos ao sul. Aparentemente, espécies solitárias ou facultativamente solitárias também apresentam polimorfismos que estão estritamente relacionados com os gradientes de altitude e sazonalidade (Davison & Field 2016).

Em outros grupos de animais também foram encontrados os mesmos padrões de distribuição de coloração, como por exemplo, Grazziotin *et al.* (2006) e Cabanne *et al.* (2007) que observaram a existência de grupos (norte e sul) para um complexo de espécies de serpentes e para a subespécie de *Xiphorhynchus fuscus* Lichtenstein, 1820 (aves), respectivamente. Por outro lado, Lepeco & Gonçalves (2018) relataram polimorfismos relacionados à coloração corporal para indivíduos de *Auglochlora*, porém não apresentando nenhum padrão de distribuição espacial. Outros dois exemplos desse tipo são reportados por Smith-Pardo (2010) e Gonçalves (2017) que também observaram variações em *Neocorynura pseudobaccha* e *Paroxystoglossa mourella*, respectivamente.

5.2. Mapeamento das formas *nigrocincta* e *suspecta*

Através dos mapas representados pelas Figuras 6, 7 e 8 foi possível observar as formas com três e quatro ou mais faixas ferrugíneas, que usualmente são identificadas como *X. nigrocincta*, de acordo com Lucia *et al.* (2014) e Marchi & Alves dos Santos (2013). Apresentaram um padrão de distribuição aparentemente semelhante e simpátrica, com registros no Tocantins e locais próximos em estados vizinhos, podendo ser encontradas no Rio Grande do Sul, na região sudeste e chegando até o litoral norte da Bahia. Analisando a distribuição dos pontos de indivíduos examinados, percebe-se que a lacuna de informação no estado de Goiás ocorre na

verdade pela falta de coleta, enquanto que no estado da Bahia, aparentemente essas formas intermediárias ocorrem com menos frequência. Certamente esses mapas apresentam lacunas devido ao não acesso do material de várias regiões, especialmente da porção mais meridional da distribuição. Mas deve-se registrar que foi observado um exemplar inteiramente preto do Rio Grande do Sul e Moure (2012) cita *X. suspecta* também para o Uruguai e a Argentina. Por sua vez a porção ao norte da região Nordeste e o leste da região Norte do Brasil apresentam registros somente da forma inteiramente preta. Para dar uma visão mais abrangente da distribuição dos morfotipos, foi verificado na literatura os registros que pudessem ser associados a pelo menos as formas inteiramente pretas e formas com quatro faixas ou mais (Figura 7), destacando-se o trabalho de Lucia *et al.* (2014) que analisou 259 indivíduos da Argentina, todos com quatro faixas ou mais, de acordo com sua chave de identificação e diagnose para *X. nigrocincta*.

5.3. Análise dos dados moleculares

O conjunto de dados dos fragmentos do gene nuclear mostrou que não existe divergência o suficiente nas sequências de *EF-1 α* e, portanto não sendo informativas para trabalhos de filogenia com representantes muito próximos. De acordo com Slowinski & Page (1999) esses resultados podem ser explicados pelo fato de que esse gene é considerado um dos mais conservados devido a sua taxa evolutiva ser mais lenta e sendo assim, sendo uma importante ferramenta para soluções taxonômicas de grupos superiores, porém sem eficácia em estudos para delimitação a nível de espécie.

O gene *COI* tem exercido um papel fundamental para documentar e mapear a biodiversidade. Apesar de ter sido bem-sucedido e sendo de extrema valia para diversos táxons. Porém, a utilização dessa metodologia sendo mais desafiadora em genomas maiores, possivelmente devido ao seu envolvimento frequente em pseudogenes ou numts (Buhay 2009). A metodologia que utiliza a combinação de dois ou mais genes para delimitar espécies mostrou ser uma abordagem eficiente para resolver a questão voltada para delimitação específica com alta confiança, assim como apresentado em outros trabalhos (Ceccarelli *et al.* 2012; Santos Junior *et al.* 2015; Sabadini *et al.* 2020). Nas regiões mitocondriais de *COI* e *CytB*, foram observadas a grande quantidade de bases A e T, descritas para o genoma mitocondrial de insetos (Tarrío *et al.* 2001).

As sequências das amostras de diferentes morfotipos analisadas quanto a distância genética apresentaram alta similaridade média quando comparados entre si, com distância variando de 0,7 – 1,4% para *CoI* e próximo a 1,2% para *CytB* (Tabela 2 e 3). Nos resultados encontrados por Ferrari & Melo (2014) em seu estudo feito com indivíduos de três espécies do gênero *Euglossa* mostram uma média intraespecífica de 0,28 até 1,21 %. Recentemente, Sheffield *et al.* (2020) publicaram um trabalho sobre uma possível sinonímia entre *X. (Neoxylocopa) sonorina* e *X. (Neoxylocopa) varipuncta*, o qual a distância genética intraespecífica mínima para o gene de sequências de *COI* foi de 0,52% e a máxima foi de 0,87%. Em contrapartida, analisando outras espécies de abelhas existem exemplos que mostram uma baixa distância genética interespecífica, como por exemplo, representantes dos gêneros *Thygater* (Freitas *et al.* 2018), *Bombus* (Santos Júnior *et al.* 2015) e *Euglossina* (Dick *et al.* 2004; Nemésio *et al.* 2013) e suportando assim a hipótese de que são linhagens independentes, mesmo sendo consideradas muito próximas por diferentes análises. Porém, existem representantes na ordem de Apidae que apresentam médias intraespecíficas altas, como é possível observar no trabalho realizado por Gibbs (2018), cujo o nível de divergência intraespecífica chegou a 6,9% na espécie de *Lasioglossum ruidosense*. De acordo com Meier *et al.* (2008) a média da variabilidade interespecífica para *COI* de Hymenoptera é de $9,3 \pm 3,9\%$ e as menores distâncias interespecíficas observadas foram de $3,8 \pm 4,2\%$.

As reconstruções filogenéticas por inferência bayesiana para fragmentos das regiões de *COI* e *CytB* (Figura 11 e 12) mostraram que mesmo os clados do grupo interno não possuem alto valor de *bootstrap*, a diferença entre as sequências é muito pequena. Os clados dentro do grupo interno no cladograma construído para a região de *COI* possuem baixo valor de *bootstrap*, possivelmente devido ao pequeno número de caracteres para suportá-los além de eventual contradição entre caracteres. Esse resultado mostra como as topologias dentro do grupo interno são incertas, mas sendo o grupo interno bem suportado pelo seu nó ancestral, essa informação é importante para a questão proposta no presente trabalho, de que a hipótese de sinonímia entre duas espécies nominais do subgênero *Neoxylocopa* e que usualmente são reconhecidas como distintas, é verdadeira.

Complementarmente ao resultado de variabilidade genética intraespecífica, vários haplótipos para ambos os marcadores ocorrem em indivíduos de ambas as formas. A rede de haplótipos é um método interessante para investigar as relações entre os haplótipos, pois não requer um número razoavelmente grande de caracteres variáveis para reconstruir com confiabilidade essas relações (Clement *et al.* 2000). A ausência do intervalo de divergência apresentado pela análise ABGD (Figura 13) pode ser explicada pelo fato de que haplótipos com

mais indivíduos foram encontrados em indivíduos das duas formas (Tabela 4). O princípio da existência do barcode gap tem se mostrado importante para realizar delimitação de espécies através da metodologia do DNA barcoding (Wiemers & Fiedler 2007). O método ABGD tem se mostrado eficiente como análise adicional para delimitação de espécies (Meyer *et al.* 2008; Kvist 2014). De acordo com nossos resultados, as distâncias do K2P (padrão do barcoding) do *COI* e *CytB* não evidenciam um limiar entre as distâncias intraespecíficas, sendo o resultado similar ao trabalho feito com representantes de Diptera (Shi *et al.* 2019).

Para todo o conjunto de dados utilizados nesse estudo, os diferentes morfotipos não apresentam distância suficiente para caracterizá-los como espécies distintas, mesmo a forma inteiramente preta e a com quatro faixas ou mais. Ao comparar a Figura 7 com a Figura 9 é possível observar que existe um padrão filogeográfico, onde os representantes do morfotipo inteiramente preto tem maior predominância na região norte e nordeste, os representantes do morfotipo com 4 ou + faixas tendo predominância na região sul e a zona central sendo mais diversa com presença de todos os morfotipos, representando uma possível zona híbrida, padrão esse já visto em espécies do gênero *Bombus* (Françoso *et al.* 2016).

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados mostram que de fato as duas espécies nominais antes conhecidas como *Xylocopa nigrocincta* e *Xylocopa suspecta*, são sinônimas. Esse trabalho é o segundo trabalho que utiliza genes mitocondriais para resolver questões taxonômicas entre duas espécies do subgênero *Neoxylocopa* (ver Sheffield *et al.* 2020). Portanto, é de extrema importância destacar que houveram problemáticas envolvendo as sequências do gene mitocondrial de *COI*. Um destaque importante deve ser dado pela primeira observação da presença de *numts* nessas sequências desse subgênero, causando certas divergências, e sendo descartadas das análises, mas que futuramente serão aproveitadas em outros estudos sobre o tema. Outra problemática enfrentada durante a realização foi a dificuldade de realizar os alinhamentos corretos e até mesmo encontrar sequências com regiões compatíveis para os representantes do grupo externo. Apesar disso, os resultados aqui encontrados são considerados confiáveis devido a atenção e os cuidados aplicados durante todo o processo e corroboram juntamente com os dados morfológicos, que ambas as espécies nominais representam apenas uma linhagem evolutiva.

O presente projeto não foi delineado para o estudo da estruturação e história da espécie, no entanto é possível destacar que há indícios de maior diferenciação genética em regiões extremas da distribuição como o oeste do Pará e Paraná e São Paulo, com a ressalva de que foi obtido apenas um indivíduo dessa região do Pará e nenhum da Argentina. De fato, as duas espécies representam uma única linhagem evolutiva, porém fica aparente existir um padrão filogeográfico, onde os representantes do morfotipo inteiramente preto tem maior predominância na região norte e nordeste, os representantes do morfotipo com 4 ou + faixas tendo predominância na região sul e a zona central sendo mais diversa com presença de todos os morfotipos encontrados nesse estudo. Existindo assim, a necessidade de um estudo mais amplo e com maior número de espécimes seria necessário para compor um estudo de estruturação populacional no futuro.

Nesse estudo, através dos dados genéticos, como similaridade entre as sequências, alta similaridade de distância genética entre os grupos dos morfotipos e as filogenias bayesianas provenientes dos alinhamentos, somados a simpatria das duas espécies e também dos dados morfológicos, revelou que de fato *X. suspecta* deve ser considerada sinônimo júnior de *X. nigrocineta*, corroborando a hipótese de que as duas espécies não constituem linhagens evolutivas distintas, o que nos leva a propor a sinonimização para as mesmas.

Proposta taxonômica

Xylocopa (Neoxylocopa) nigrocincta Smith, 1854

Xylocopa nigro-cincta Smith, 1854: 354. Holótipo: ♀, desconhecido, não depositado no BMNH. Holótipo: América do Sul.

Xylocopa schulthesii Dusmet & Alonso, 1924: 52; Sinonimizado por Hurd & Moure, 1963. Holotype: ♀, depositado no MNCN. Localidade tipo: Brasil, Rio Grande do Sul.

Xylocopa (Neoxylocopa) nigrocincta, Hurd & Moure, 1963: 151.

Xylocopa nigrocincta jujuyensis Brèthes, 1916: 410. Sinonimizado por Lucia *et al.* 2014. Sintípo: ♀, depositado no MACN. Localidade tipo: Argentina, Jujuy.

Xylocopa (Neoxylocopa) suspecta Moure & Camargo, 1988: 209. Holótipo: ♀, depositado no DZUP. Localidade tipo: Brasil, Ribeirão Preto. **Novo sinônimo.**

Diagnose: A fêmea dessa espécie pode ser facilmente separada de outras espécies do subgênero *Neoxylocopa* seguindo a seguinte combinação de caracteres: Cabeça com carena frontal entre os alvéolos antenais e sem carenas supraocelares; escutelo com faces dorsal e posterior bem definidas e carena arredondada; metassoma podendo ser preto ou com presença de faixas ferrugíneas do T1 a T6, metassoma com pontuação no disco do T2 sendo muito esparsa até moderadamente pontuada e pelos pretos relativamente curtos, as laterais do metassoma possuindo pelos longos e densos, asas castanho escuras possuindo um brilho esverdeado com leve tom dourado nos ápices ou violeta com tons azulados por toda sua extensão. Tamanho corporal médio, entre 2,7 e 1,8 cm.

Descrição geral baseada no conjunto de exemplares analisados: Comprimento corporal usualmente próximo a 2,3 cm (1,8 – 2,7 cm); comprimento da cabeça 0,65 (0,6 – 0,8 cm); Largura da cabeça 0,74 (0,6 – 0,8 cm); Comprimento do mesossoma 0,7 (0,5 – 0,9 cm); Largura do mesossoma 0,93 (0,6 – 1,3 cm); Comprimento metassoma 1,39 (1,1 – 1,8 cm); Largura metassoma 1 (0,9 - 1,3 cm). *Integumento:* na cabeça inteiramente preto; na região do mesossoma pode ser inteiramente preto, mas em alguns casos pode haver uma faixa levemente ferrugínea na porção apical do escutelo; na região do metassoma pode ser inteiramente preto ou com faixas ferrugíneas presentes na porção supramarginal do T1 até T6, enquanto que na porção apical dos tergos é presente uma faixa escura. Tégula preta e asas marrom escuro que possuem um brilho esverdeado com leve tom dourado nos ápices ou violeta com tons azulados por toda sua extensão. *Pilosidade:* a face é composta por pelos escuros, simples, de comprimento médio e levemente sobrepostos na região da fronte e cíleo, enquanto que na região do labro podem ter a coloração sutilmente dourada; na região do mesossoma; na região do metassoma são presentes pelos escuros (exceto no T6, pois possui uma leve mancha ferrugínea), sendo nas laterais uma mistura de pelos simples e plumosos de longo comprimento e muito densos. Na região do disco, a pilosidade é simples,

podendo ter comprimento curto ou médio e sua sobreposição ou não sobreposição depende da pontuação de cada tergo. No T1 na região dos discos são presentes pelos simples e plumosos. T2 – T4 com pelos simples e de comprimento curto ou mediano. Na região dos discos no T5 os pelos são simples, medianos e com uma sobreposição levemente densa. No T6 os pelos são simples e longos em toda a sua extensão. *Pontuação*: na cabeça é moderadamente densa em toda sua extensão, exceto na região do clipeo sendo muito densa. Porção superior do mesossoma liso. No metassoma a pontuação varia em cada tergo. No T1 pode ser moderadamente esparsa até moderadamente densa nos discos e densa nas laterais. No T2 pode ser muito esparsa até moderadamente densa nos discos e densa nas laterais. T3 e T4 moderadamente densa nos discos e densa nas laterais. T5 e T6 densa por toda a extensão. *Estrutura*: Presença da carena e/ou tubérculo frontal, sem proeminências acima dos ocelos e clipeo com um leve relevo nas margens. Escutelo anguloso e na maioria das vezes inteiramente preto, mas podendo aparecer manchas ferrugíneas na sua porção apical. Placa basitibial assimetricamente bífida e com a porção posterior apical arredondada e mais curta do que a porção anterior.

Notas taxonômicas:

Na análise de chaves de identificação e diagnoses das duas espécies nominais, em nenhum momento encontramos registros da presença de 1, 2 ou 6 faixas ferrugíneas presentes nos tergos metassomáticos. Como mencionado anteriormente na sessão “História taxonômica das espécies nominais *X. nigrocincta* e *X. suspecta*” a literatura menciona apenas abelhas com presença de faixas ferrugíneas até o T4. Porém, durante a observação dos espécimes foi notificado a presença de indivíduo que continha apenas uma faixa ou até seis faixas ferrugíneas metassomáticas, sendo mencionadas nesse trabalho como formas intermediárias. A coloração das asas para as espécies nominais, *X. nigrocincta* e *X. suspecta*, era somente mencionada como sendo marrom escuro com forte brilho violáceo e às vezes com brilho violáceo próximo à margem anterior, respectivamente. Entretanto, foi possível observar uma grande variação nos dois morfotipos de coloração. Foram encontrados indivíduos de asas com forte brilho violeta por toda sua extensão e em alguns casos contendo manchas azuladas; outros indivíduos apresentavam asas com brilho verde metálico em toda sua extensão e em alguns casos contendo brilho levemente dourado nos ápices. A placa basitibial possui variações com relação ao formato da porção apical anterior, não tendo valor taxonômico.

Distribuição (são citadas referências de literatura no caso de países ou províncias que não tivemos acesso a material):

Brasil: Acre, Amazonas, Roraima, Amapá, Pará, Maranhão, Piauí, Paraíba, Pernambuco, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Tocantins, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. **Bolívia.** **Argentina:** Chaco, Corrientes, Entre Rios, Formosa, Jujuy, Misiones, Santa Fé, Salta, Tucumán (Lucia *et al.* 2014). **Uruguai** e **Paraguai** (Moure 2012).

7. REFERÊNCIAS

- Agapow, P.M., Bininda-Emonds, O.R.P., Crandall, K.A., Gittleman, J.L., Mace, G.M, Marshall, J.C., Purvis, A. 2004. The impact of species concept on biodiversity studies. **The Quarterly Review of Biology**. **79**,(2): 161-179.
- Almeida, E.A.B., Packer, L. & Danforth, B.N. 2008. Phylogeny of the Xeromelissinae (Hymenoptera: Colletidae) based upon morphology and molecules. **Apidologie**. **39**: 75–85.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**. **215**(3): 403–410.
- Bandelt, H. J., Forster, P., Rohl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**. **16**: 37-48.
- Batalha-Filho, H., Waldschmidt, A.M., Campos, L.A.O., Tavares, M.G., Fernandes-Salomão, T. M. 2010. Phylogeography and historical demography of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. **Apidologie**. **41**: 534–547
- Bernardino, A. S., Gaglianone, M. C. 2008. Nest distribution and nesting habits of *Xylocopa ordinaria* Smith (Hymenoptera, Apidae) in a restinga area in the northern Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**. **52**(3): 434-440.
- Bertoni, A. W. 1918. Notas entomológicas (biológicas y sistemáticas). I. Himenopteros apoideos. **An. Cient. Paraguayos**. **2**(3): 219-231.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S. *et al.* 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**. **22**: 148–155.
- Bini, L.M., Diniz-Filho, J.A.F., Rangel, T.F.L.V.B., Bastos, R.P. & Pinto, M.P. 2006. Challenging Wallacean and Linnean shortfalls: knowledge gradients and conservation planning in a biodiversity hotspot. **Diversity Distribution**. **12**: 475–482.
- Bolton, B. 1995. **A New General Catalogue of the Ants of the World**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Buhay, J.E. 2009. “COI-like” Sequences Are Becoming Problematic in Molecular Systematic and DNA Barcoding Studies, **Journal of Crustacean Biology** , 29(1,): 96-110,
- Cabanne, G.S., Santos, F.R., Miyaki, C.Y. 2007. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): Vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**. **91**(1):73–84.
- Carolan, J.C., Murray, T.E., Fitzpatrick, Ú., Crossley, J., Schmidt, H., Cederberg, B., McNally, L., Paxton, R.J., Williams, P.H., Brown, M.J.F. 2012 Colour patterns do not diagnose species: quantitative evaluation of a DNA barcoded cryptic bumblebee complex. **PLoS One** **7**(1): e29251.

- Cameron S.A., Hines H.M. & Williams P.H. 2007. A comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*). **Biological Journal of the Linnean Society**. **91**:161–188.
- Camillo, E., Garofalo, C. A., Muccillo, G. 1986. On the bionomics of *Xylocopa suspecta* in the southern brazil: nest construction and biological cycle (Hymenoptera, anthophoridae). **Revista Brasileira de Biologia**. **46**(2): 383-93
- Cardoso, P., Erwin, T.L., Borges, P.A.V., New, T.R. 2011. The seven impediments in invertebrate conservation and how to overcome them. **Biological Conservation**. **144**: 2647-2655.
- Carvalho, D.M., Aguiar, C.M.L., Santos, G.M.M. 2013. Food Niche Overlap Among Neotropical Carpenter Bees. **Sociobiology**. **60**(3): 283 – 288.
- Ceccarelli, F.S., Sharkey, M.J. & Zaldívar-Riverón, A. 2012. Species identification in the taxonomically neglected, highly diverse, neotropical parasitoid wasp genus *Notiospathius* (Braconidae: Doryctinae) based on integrative molecular and morphological approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. **62**: 485-495.
- Chaves-Alves, T.M., Junqueira, C.N., Rabelo, L.S., Oliveira, P.E.A.M., Augusto, S.C. 2011. Recursos ecológicos utilizados por las especies de *Xylocopa* (Hymenoptera, Apidae) en el área urbana. **Revista Colombiana de Entomología**. **37**: 313-317.
- Choi, S.C. 2016. Methods for delimiting species via population genetics and phylogenetics using genotype data. **Genes & Genomics**, **38**: 905-915.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, **9**: 1657-1659.
- Conix, S. 2018. Integrative taxonomy and the operationalization of evolutionary independence. **European Journal for philosophy of Science**. **8**(3): 587 – 603.
- Cronquist, A. 1978. **Once again, what is a species?** In: L. Knutson, ed. *BioSystematics in Agriculture*. Alleheld Osmun, Montclair, NJ.
- Dalla Torre, C. G. 1896. **Catalogus Hymenopterorum hucusque descriptorum systematicus et synonymicus**. Lipsiae. Guilelmi Engelmann. 10: 643.
- Davison, P.J. & Field, J. 2016. Social polymorphism in the sweat bee *Lasioglossum (Evyllaesus) calceatum*. **Insectes Sociaux**, **63**: 327-338.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**. **85**: 407-415.
- Dick, C.W., Roubik, D.W., Gruber, K.F. & Bermingham, E. 2004. Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. **Molecular Ecology**. **13**(12):3775–85
- Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., *et al.* 2011. Geneious v5. 4. Disponível em: < <http://www.geneious.com>

- Dusmet & Alonso 1924. Las "*Xylocopa*" (Hymen. Apidae) en las colecciones de Madrid. **Trabajo del Museu Nacional de Ciencia Naturale de Madrid**. **49**: 5-58
- Ellis, J.S., Knight T.M., Carvell, C. & Goulson, D. 2006. Cryptic species identification: a simple diagnostic tool for discrimination between two problematic bumblebee species. **Molecular Ecological Notes**. **6**:540–542.
- Ellis, J.S., Knight, M.E. & Goulson, D. 2005. Delineating species for conservation using mitochondrial sequence data: the taxonomic status of two problematic *Bombus* species (Hymenoptera: Apidae). **Journal Insect Conservation**. **9**:75–83.
- Ferrari, B.R., & Melo, G.A. 2014. Deceiving colors: recognition of color morphs as separate species in orchid bees is not supported by molecular evidence. **Apidologie**. **45**(5): 641-652.
- Figueiredo, N., Gimenes, M., de Miranda, M. D., & Oliveira-Rebouças, P. 2013. *Xylocopa* bees in tropical coastal sand dunes: Use of resources and their floral syndromes. **Neotropical Entomology**. **42**: 252– 257.
- Françoso, E. & Arias, M.C. 2013. Cytochrome c oxidase I primers for corbiculate bees: DNA barcode and mini-barcode. **Molecular Ecological Resource**. **13**: 844–50.
- Françoso, E., Gomes, F. & Arias, M.C. 2015. Protocol for isolating insect mitochondrial genomes: a case study of NUMT in *Melipona flavolineata* (Hymenoptera: Apidae). **Mitochondrial DNA**. 1–4.
- Françoso, E., Zuntini, A.R., Carnaval, A.C. & Arias, M. C. 2016. Comparative phylogeography in the Atlantic forest and Brazilian savannas: pleistocene fluctuations and dispersal shape spatial patterns in two bumblebees. **BMC Evolutionary Biology**. **16**: 267.
- Freitas, F.V., Santos Júnior, J.E., Santos, F.R. & Silveira, F.A. 2018. Species delimitation and sex associations in the bee genus *Thygater*, with the aid of molecular data, and the description of new species. **Apidologie**. **49**: 484-496.
- Gerling, D., Velthuis, H.H.W. & Hefetz, A. 1989. Bionomics of the large carpenter bees of the genus *Xylocopa*. **Annual Review of Entomology**. **34**: 163–190.
- 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**(2): 209–223.
- Gibbs, J. 2009. Integrative taxonomy identifies new (and old) species in the *Lasioglossum* (*Dialictus*) *tegulare* (Robertson) species group (Hymenoptera, Halictidae). **Zootaxa**. **2032**: 1–38.
- Gibbs, J. 2018. DNA barcoding a nightmare taxon: assessing barcode index numbers and barcode gaps for sweat bees. **Genome**. **61**(1): 21-31
- Goldstein, P.Z., Desalle, R. 2010. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: Determination, discovery, and description. **Bioessays**, **33**: 135-147.

- Grazziotin, F.G., Monzel, M., Echeverrigaray, S. & Bonato, S.L. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): Past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**. **15**(13):3969–82.
- Hasegawa, M. Kishini, K. & T. Yano. 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**. **22**: 160– 174.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & De Waard, J.R. 2003 Biological identification through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B. **Biological Sciences**, **270**: 313–321.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H. & Hallwachs, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. **101**: 14812-14817.
- Hines, H.M. & Williams, P.H. 2012. Mimetic colour pattern evolution in the highly polymorphic *Bombus trifasciatus* (Hymenoptera: Apidae) species complex and its comimics. **Zoological Journal of Linnean Society**. **166**(4): 805–826.
- Hogg, I.D. & Hebert, P.D.N. 2004 Biological identification of springtail (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology**. **82**: 749–754.
- Huang, J.-X., Wu, J., An, J.-D. & Williams, P.H. 2015. Newly discovered colour-pattern polymorphism of *Bombus koreanus* females (Hymenoptera: Apidae) demonstrated by DNA barcoding. **Apidologie** **46**(2): 250–261.
- Hurd, P.D. JR. & Moure, J.S. 1963. A classification on the large carpenter bees (Xylocopini) (Hymenoptera: Apoidea). **Entomology**. **29**: 1–365.
- Hurd, P.D. Jr. 1978. Bamboo-nesting carpenter bees (genus *Xylocopa* Latreille) of the subgenus *Stenoxylocopa* Hurd and Moure. **Journal of the Kansas Entomological Society**. **51**:746-764.
- Hurtado-Burillo M., Ruiz, C., May-Itz-a, W.J., Quezada-Eu-an, J.J.G. & De la Rua, P. 2013. Barcoding stingless bees: genetic diversity of the economically important genus *Scaptotrigona* in Mesoamerica. **Apidologie**. **44**: 1–10.
- Isaac, N. J., Mallet, J. & Mace, G. M. 2004. Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**. **19**: 464 – 469.
- Jobe, R.T. & White, P.S. 2009. A new cost-distance model for human accessibility and an evaluation of accessibility bias in permanent vegetation plots in Great Smoky Mountains National Park, USA. **Journal of Vegetation Science**. **20**(6): 1099-1109.
- Johnson, N.K. & Cicero, C. 2004. New mitochondrial DNA data affirm the importance of Pleistocene speciation in North America birds. **Evolution**. **58**: 1122-1130.
- Jones, O.R., Purvis, A., Baumgart, E., D.L.J. 2009. Using taxonomic revision data to estimate the geographic and taxonomic distribution of undescribed species richness in the Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea). **Insect Conservation Diversity**. **2**: 204 – 212.

- Jörger, K.M., Schrödl, M. 2013. How to describe a cryptic species? Practical challenges of molecular taxonomy. **Frontiers in Zoology**, **10**(59): 2-27.
- Jones, O. R., Purvis, A. & Quicke, D. L.J. 2012. Latitudinal gradients in taxonomic overdescription rate affect macroecological inferences using species list data. **Ecography**. **35**: 333 – 340.
- Kawakita, A., Sota, T., Ascher, J., Ito, M., Tanaka, H. & Kato, M. 2003. Evolution and Phylogenetic Utility of Alignment Gaps Within Intron Sequences of Three Nuclear Genes in Bumble Bees (*Bombus*). **Molecular Biology and Evolution**. **20**: 87-92.
- Keasar, T. 2010. “Large Carpenter Bees as Agricultural Pollinators,” **Psyche**. Article ID 927463.
- Koch, H. 2010 Combining morphology and DNA barcoding resolves the taxonomy of Western *Malagasy Liotrigona* Moure, 1961 (Hymenoptera Apidae: Meliponini). **African Invertebrates**. **51**: 413–421.
- Kvist S., Laumer C.E., Junoy J. & Giribet G. 2014. New insights into the phylogeny, systematics and DNA barcoding of Nemertea. **Invertebrate Systematics**. **28**: 287-308.
- Lepeco, A. & Gonçalves, R. B. 2018. The color and the shape: Morphological variation on a facultatively eusocial bee *Augochlora* (*Augochlora*) *amphitrite* (Schorotky). **Sociobiology**. **65** (4): 662-670.
- Lewis, O.T. 2006. Climate change, species area curves and the extinction crisis. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. **Biological**. **361**(1465): 163-171.
- Leys, R., Cooper, S.J. & Schwarz, M.P. 2000. Molecular phylogeny of the large carpenter bees, genus *Xylocopa* (Hymenoptera: apidae), based on mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. **17**(3): 407-18.
- Leys, R., Cooper, S.J., Schwarz & M.P. 2002. Molecular phylogeny and historical biogeography of the large carpenter bees, genus *Xylocopa* (Hymenoptera: Apidae). **Biological Journal of the Linnean Society**. **77**: 249-266.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**. **25**: 1451-1452.
- Linsley, E.G., Rick, C.M & Stephen, S. G. 1966. Observations on the floral relationships of the Galapagos carpenter bee (Hymenoptera, Apoidea). **Pan-Pacific Entomologist**. **42**: 1-18.
- Løken, A. 1984. Scandinavian species of the genus *Psithyrus* Lapeletier (Hymenoptera: Apidae). **Entomological Scandinavia**. **23**: 1–45.
- Lucia, M., Alvarez, L.J. & Abrahamovich, A.H. 2014. Large carpenter bees in Argentina: systematics and notes on the biology of *Xylocopa* subgenus *Neoxylocopa* (Hymenoptera: Apidae). **Zootaxa**. **3754**: 201–238.
- Lucia, M. & Gonzalez, V.H. 2017 New species and designation of primary types in Neotropical carpenter bees of the genus *Xylocopa* Latreille (Hymenoptera, Apidae). **Journal of Hymenoptera Research**. **61**: 31–48.

- Lucia, M., Abrahamovich, A.H., Alvarez, L.J. 2009. A gynandromorph of *Xylocopa nigrocincta* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Neotropical Entomology**. **38**:(1) 155-157.
- Magnacca, K.N. & Brown, M.J.F. 2012. DNA barcoding a regional fauna: Irish solitary bees. **Molecular Ecology Resources**. **12**: 990–998.
- Mallet, J. 2010. Why was Darwin’s view of species rejected by twentieth century biologists? **Biology and Philosophy**. **25**: 497–527.
- Marchi, P. & Alves-dos-Santos, I. 2013. As abelhas do gênero *Xylocopa* Latreille (Xylocopini, Apidae) do Estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropical**. **13**(2): 249-269.
- Mawdsley, J.R. 2018. **New records and diagnostic notes on large carpenter bees (Hymenoptera: Apidae: genus *Xylocopa* Latreille), from the Amazon River basin of South America.**
- Maydem, R.L. A. 1997. hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In: CLARIDGE, M.F.; DAWA, H.A.; WILSON, M.R. (eds.). **Species: The Units of Biodiversity**. Londres, Chapman & Hall. p. 381-424.
- Meier, R., Zhang, G., Ali, F. 2008. The Use of Mean Instead of Smallest Interspecific Distances Exaggerates the Size of the “Barcoding Gap” and Leads to Misidentification. **Systematic Biology**. **57**(5): 809–813.
- Michel-Salzat, A., Cameron, S.A., & Oliveira, M.L. 2004. Phylogeny of the orchid bees (Hymenoptera: Apinae: Euglossini): DNA and morphology yield equivalent patterns. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. **32**(1): 309-323.
- Michez, D. & Eardley, C .2007. Monographic revision of the bee genus *Melitta* Kirby 1802 (Hymenoptera: Apoidea: Melittidae). **Annales de la Societe Entomologique de France (n.s.)**. **43**: 379–440.
- Michez, D., Patiny, S. & Danforth, B.N. 2009. Phylogeny of the bee family Melittidae (Hymenoptera: Anthophila) based on combined molecular and morphological data. **Systematic Entomology**. **34**: 574-597.
- Michener. C.D. 2007. **The bees of the world**, 2nd edn. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Minckley, R.L. 1998. A cladistic analysis and classification of the subgenera and genera of the large carpenter bees, tribe Xylocopini (Hymenoptera: Apidae). **Scientific Papers Natural History Museum The University of Kansas**. **9**: 1–47.
- Moure, J.S. & Camargo, J.M.F. 1988. Uma nova espécie de *Xylocopa* (*Neoxylocopa*) do Brasil (Hymenoptera, Apoidea). **Revista Brasileira de Entomologia**. **32**(2): 209-214.
- Moure, J.S. 2012. Xylocopini Latreille, 1802. In Moure, J.S., Urban, D. & Melo, G.A.R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region** - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acessado em: dezembro/2019.

- Murray, T.E., Fitzpatrick, U., Brown, M.F.F. & Paxton, R.J. 2008 Cryptic species diversity in a widespread bumble bee complex revealed using mitochondrial DNA RFLPs. **Conservation Genetics**. **9**: 653–666.
- Nabout, J.C., Bini, L.M., & Diniz-Filho, J.A. 2010. Global literature of fiddler crabs, 15 genus *Uca* (Decapoda, Ocypodidae): trends and future directions. *Iheringia*. **Zoologia**. **100**(4): 463-468.
- Nei, M., & Kumar, S. 2000. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford University Press.
- Nemésio, A., Santos, J.E. & Santos Júnior, F.R. 2013. *Eufriesea zhangii* sp. n. (Hymenoptera: Apidae: Euglossina), a new orchid bee from Brazil revealed by molecular and morphological characters. **Zootaxa**. **3609**: 568–582.
- Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I. & Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology**. **7**: 16.
- Pamilo, P., Varvio-Aho, S. & Pekkariinen, A. 1984. Genetic variation in bumblebees (*Bombus*, *Psithyrus*) and putative sibling species of *Bombus lucorum*. **Hereditas** **101**: 245–251. Pante, E., Schoelinc, C. & Puillandre, N. 2015. From integrative taxonomy to species description: One step beyond. **Systematic Biology**. **64**:152–160.
- Pérez, J. 1901. Contribution à l'étude des Xylocopes. **Actes de la Société Linnéenne de Bordeaux**. **56**: 1-128
- Polzin, T. & Daneshmand, S.V. 2003. On steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. **Operations Research Letters**. **31**(1): 12 - 20
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**. **25**:1253-1256
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S. & Achaz G. 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology**. **21**: 1864–1877.
- Rapini, A. 2004. Classes or Individuals? The Paradox of Systematics Revisited. *Studies in History and Philosophy of Science*. **Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**. **35**:675–695.
- Rehan, S.M., Chapman, T.W., Craigie, A.I., Richards, M.H., Cooper, S.J.B., Schwarz, M.P. 2010. Molecular phylogeny of the small carpenter bees (Hymenoptera:Apidae: Ceratinini) indicates early and rapid global dispersal. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. **55**: 1042 - 1054.
- Ridley, M. **Evolução**. 3ª edição. Artmed Editora, 2006.
- Rodríguez, F., Oliver, J.L., Marín, A., Medina, J.R. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. **Journal of Theoretical Biology**. **142**: 485–501.
- Ronquist, F. & J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** **19**: 1572-1574.

- Sabadini, C.P., Machado, C.B., Vilhena, P.S, Garófalo, C.A. & Del Lama, M.A. 2020. Species delimitation and phylogenetic relationships in the genus *Trypoxylon* (Hymenoptera: Crabronidae) using molecular markers: an alternative to taxonomic impediment. **Systematics and Biodiversity**. **18**(4): 315-327.
- Santos Júnior, J.E., Santos, F.R., Silveira, F.A. 2015. Hitting an Unintended Target: Phylogeography of *Bombus brasiliensis* Lepeletier, 1836 and the First New Brazilian Bumblebee Species in a Century (Hymenoptera: Apidae). **PLoS One**. **10**(5): e0125847.
- Sakagami, S.F. & Laroca, S. 1971. Observations on the bionomics of some neotropical xylocopine bees, with comparative and biofaunistic notes (Hymenoptera, Anthophoridae). **Journal of the Faculty Science, Hokkaido University. Series VI. Zoology**. **18**(1): 57-127
- Schlick-Steiner B.C., Steiner F.M., Seifert B., Stauffer C., Christian E. A & Crozier, R.H. 2010. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring Biodiversity. **Annual Review of Entomology**. **55**:421-438.
- Schlundwein, C., Schlumpberger, B., Wittmann, D. & Moure, J.S . 2003. O gênero *Xylocopa* Latreille no Rio Grande do Sul, Brasil (Hymenoptera, Anthophoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**. **47**(1): 107-118.
- Schrottky, C. 1902. Ensaio sobre as abelhas solitárias do Brazil. **Revista do Museu Paulista**. **5**: 330-613
- Sheffield, C.S., Hebert, P.D.N., Kevan, P.G. & Packer, L. 2009 DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies. **Molecular Ecology Resources**. **9**(1): 196–207.
- Sheffield, C., Heron, J & Musetti, L. 2020. *Xylocopa sonorina* Smith, 1874 from Vancouver, British Columbia, Canada (Hymenoptera: Apidae, Xylocopinae) with comments on its taxonomy. **Biodiversity Data Journal**. **8**: e49918.
- Shi, T., Toda, M.J., Takano, K.T., Yafuso, M., Suwito, A., Wong, S.Y., Shang, S-Q & Gao, J-J. 2019. A review of taxonomy and flower-breeding ecology of the *Colocasiomyia toshiokai* species group (Diptera: Drosophilidae), with description of a new species from Indonesia. **European Journal of Entomology**. **116**: 341-361.
- Sigovini, M., Keppel, E & Tagliapietra D. 2016. Open nomenclature in the biodiversity era. **Methods in Ecology and Evolution**. **7**(10): 1217-1225.
- Silveira F.A., Melo, G.A.R. & Almeida, E.A.B. 2002. **Abelhas Brasileiras Sistemática e identificação**. Composição & Arte, Belo Horizonte.
- Simon, C., Frati, F., Becknbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**. **87**: 651-701.

- Slownski, J.B. & Page, R.D.M. 1999. How should species phylogenies be inferred from sequence data? **Systematic Biology**. **48**(4): 814-825.
- Smith, F. 1854. Catalogue of the hymenopterous insects in the collection of the British Museum, pt. 2, **Apidae**. 199-465.
- Smith-Pardo, A.H. 2010. Taxonomic review of the species of *Neocorynura* (Hymenoptera: Halictidae: Augochlorini) inhabiting Argentina and Paraguay. **Zootaxa**, **68**: 44-68.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**. **28**(10): 2731-2739.
- Tarrio, R., Rodriguez-Trelles, F., ayala, F.J., 2001. Shared nucleotide composition biases among species and their impact on phylogenetic reconstructions of the Drosophilidae. **Molecular Biology and Evolution**. **18**: 1464–1473.
- Tavares, E.S. & Baker A.J. 2008. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. **BMC Evolutionary Biology**. **8**: 81.
- Vecchione, M., Mickevich, M.F., Fauchald, K., Collette, B.B., Williams, A.B., Munroe, T.A., Young, R.E. 2000. Importance of assessing taxonomic adequacy in determining fishing effects on marine biodiversity. **Journal of Marine Science**. **57**(3): 677–681.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**. **10**(4): 506-513.
- Waldschmidt, Ana M., Barros, Everaldo G. de, & Campos, Lucio A.O. 2000. A molecular marker distinguishes the subspecies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Genetics and Molecular Biology**. **23**(3): 609-611.
- Watmough, R.H. 1974. Biology and behavior of carpenter bees in Southern Africa. **Journal of the Entomological Society of Southern Africa**. **37**: 261-281.
- Wiemers, M., Fiedler, K. 2007. Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). **Frontier Zoology**. **4**:8.
- Will, K.W., Mishler, B.D. & Wheeler, Q.D. 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. **Systematic Biology**. **54**:844-851.
- Williams, P.H. & Hernandez, L.M. 2000. **Distinguishing females of the bumble bees *Bombus ruderatus* (F.) from *Bombus hortorum* (L.)** in Britain: a preliminary application of quantitative techniques. In: Report to the UK biodiversity action plan bumblebee working group. The Natural History Museum, London.
- Williams, P. 2007. The distribution of bumblebee color patterns worldwide: possible significance for thermoregulation, crypsis, and warning mimicry. **Biological Journal of the Linnean Society**. **92**(1): 97–118.

- Williams, P.H., Brown, M.J.F., Carolan, J.C. *et al.* 2012 Unveiling cryptic species of the bumblebee subgenus *Bombus* s. str. worldwide with COI barcodes (Hymenoptera: Apidae). **Systematics and Biodiversity**. **10**: 21–56.
- Wittmann, D. & Scholz, E. 1989. Nectar dehydration by male carpenter bees as preparation for mating flights. **Behavioral Ecology and Sociobiology**. **25**: 387.
- Yamamoto, M., Oliveira, P.G. & Gaglianone, M.C. 2014. **Uso sustentável e restauração da diversidade dos polinizadores autóctones na agricultura e nos ecossistemas relacionados: planos de manejo**. Rio de Janeiro, Funbio.
- Yang, Z. 1996. Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Likelihood Methods. **Journal of Molecular Evolution**. **42**: 294–307.
- Yeates, D.K., Seago, A., Nelson, L. *et al.* 2011. Integrative taxonomy, or iterative taxonomy? **Systematic Entomology**. **36**: 209–217.
- Zander, R.H. 2007. Paraphyly and the species concept, a reply to Ebach & al. **Taxon**. **56**: 642–644.

ANEXO I - MATERIAL EXAMINADO

Forma sem faixas ferrugíneas no metassoma

Inteiramente preta (0)

BRASIL, **Amazonas** 1♀, Humaitá, Amazonas, 08°08'17,7"S 63°44'19,0"W, 05-13/VII/2005, N. Bittencourt leg., MPEG. 1♀, Rio Negro, 21-22/VI/1999, Camargo, Pedro, Mazucato leg., RPSP, X. (*Neoxylocopa*) *suspecta*, R. C. Decima det, 2013. 1♀, Benjamim Constant, X/1964, w.c., MZSP, X. (*Neoxylocopa*) *cfr. amazonica*, P. C. Zama det, 2016. **Acre** 1♀, Rio Branco, 10°30'S 69°30'W, 19/IX/2006, M. Soto-Araya leg, INPA, X. (*Neoxylocopa*) *cfr. suspecta*, F. A. Silveira det, 2013. 1♀, Rio Branco, 10°02'12.2'S 67°40'54,9'W, 26/V/2009, L. S. M. Costa leg., UFMG, X. (*Neoxylocopa*) *suspecta*, P. C. Zama det, 2014. **Rondônia** 1♀, Guajará Mirim, 16/VI/1995, M. L. Oliveira leg., RPSP. 1♀, Guajará Mirim, 08/IX/1995, F. M. Dantas leg., RPSP. 1♀, Guajará Mirim, 10°48'S 65°22'W, 12-14/X/2001, Oliveira, Morato & Cunha leg., INPA. 1♀, Guajará Mirim, 10°48'S 65°22'W, 12-14/X/2001, Oliveira, Morato & Cunha leg., UFMG, X. (*Neoxylocopa*) *cfr. suspecta*, F. A. Silveira, 2013 det. 1♀, Porto Velho, 04/I/2012, w.c., UFMG, P. C. Zama, det. 2016. 1♀, Porto Velho, 04/I/2012, w.c., UFMG, X. (*Neoxylocopa*) *suspecta*, P. C. Zama, det. 2016. **Pará** 1♀, Belterra, -3.0777S -54.583W, 02/II/2019, F. C. V. Zanella & Oliveira leg., UNILA. 1♀, São Francisco, 14/I/1978, S. A. Santos leg., MPEG. 1♀, Curionópolis, Pará, 5°56'59.5"S 49°38'36.3"W, 09/IX/2014, R. B. Martines leg., MPEG. 1♀, Tucuruí, 17/VIII/1980, Nunes de Mello leg., INPA, X. (*Neoxylocopa*) *cfr. suspecta*, F. A. Silveira det 2013. 1♀, Rondon do Pará, 27/VI/2002, E. Almeida & J. Almeida leg., UFMG, X. inc. sp., E. A. B. Almeida det. 1♀, Tauari, 3°5'S 21-55°7'W, 29/I – 01/II/1979, Camargo leg., RPSP. 1♀, Gorotire Xingu, Pará, 18/IV/1983, W. Overal leg., MPEG. 1♀, Bragança, 06/IX/1978, R. B. Neto leg., MPEG. **Paraíba** 1♀, Areia, 6°58'33,2"S 35°44'55,3"W, 29/IX/2011, F. C. V. Zanella & P. E. Santos Neto leg., UNILA, F. C. V. Zanella det. 1♀, Areia, 6°58'33,2"S 35°44'55,3"W, 27/IX/2011, F. C. V. Zanella & P. E. Santos Neto leg., UNILA. 1♀, João Pessoa, 02/II/1977, Elias leg., INPA. 1♀, Areia, 6°57'54,6"S 35°41'52,37"W, 01/X/2011, F. C. V. Zanella leg., UNILA. 1♀, João Pessoa, 18/IX/2008, L. T. S. Carneiro & C. F. Martins, UNILA, X. *suspecta*, F. C. V. Zanella det. 2009. 1♀, João Pessoa, 13/IV/2005, M. S. Silveira leg., UFPB. 1♀, Rio Tinto, 07/XI/2001, M. C. M. Silva leg., UFPB. 1♀, Rio Tinto, 6°46'21"S 34°55'13"W, 15/III/2003, M. C. M. Silva leg., UFPB. 1♀, Rio Tinto, 02/II/2002, M. C. M. Silva leg., UFPB. 1♀, Rio Tinto, 15/III/2003, M. C. M. Silva leg., UFPB. 1♀, Cuité, 09/IX/2012, F. C. V. Zanella & Martins leg., UNILA. 1♀, Araruna, 24/X/2003, F. C. V. Zanella leg., UNILA. 1♀ 1♀, Rio Tinto, 24/V/ 2003, M. C. M Silva leg., UNILA. **Pernambuco** 1♀, Camaragibe, 16/I/2011, Burkart leg., UFPE, X. (*Neoxylocopa*) *suspecta*, F. C. V. Zanella det, 2011. 1♀, Camaragibe, 28/XII/2010, Burkart leg., UFPE, X. (*Neoxylocopa*) *suspecta*, F. C. V. Zanella det, 2011. 2♀, Camaragibe, 11/I/2011, Burkart leg., UFMG, X (*Neoxylocopa*) *suspecta*, F. C. V. Zanella det, 2011. 1♀, Igarassu, 10/XI/2008, Schlindwein & Nobre leg., UFMG, X. (*Neoxylocopa*) *ordinaria*, Maise-Silva det, 2008. 1♀, Igarassu, 10/XI/2008, Schlindwein & Nobre leg., UFMG, X. (*Neoxylocopa*) *suspecta*, Maise-Silva det, 2008, X. (*Neoxylocopa*) *suspecta*, Schlindwein det, 2011. 1♀, Igarassu, 10/XI/2008, Schlindwein & Nobre leg., UFMG, X. (*Neoxylocopa*) *suspecta*, Maise-Silva det, 2008. **Mato Grosso** 1♀, Rondonópolis, 16°27'53"S 54°33'41.1"W, 31/III/2005, UFMG, X. (*Neoxylocopa*) *suspecta*, C. F. Cardoso det 2006. **Maranhão** 4♀, Tabocas, 25/III/2005, B. Serra leg., UNILA, X.

carbonaria. 2♀, Tabocas, 25/III/2005, B. Serra leg., UNILA, *X. sp.* 1♀, Tabocas, 25/III/2005, B. Serra leg., UNILA, *X. carbonaria*, *X. suspecta*, Zanella det 2009. 1♀, Tabocas, 16/IV/2005, B. Serra leg., UNILA, *X. sp.* 3♀, Tabocas, 04/III/2005, B. Serra leg., UNILA, *X. sp.* 3♀, Tabocas, 31/I/2005, B. Serra leg., UNILA, *X. carbonaria*. 1♀, Tabocas, 31/I/2005, B. Serra leg., UNILA, *X. sp.* 1♀, Cajueiro, 24/III/2005, B. Serra leg., UNILA, *Xylocopa sp.* 1♀, Cajueiro, 03/III/2005, B. Serra leg., UNILA, *X. carbonária*. 1♀, Marimbus, 12/XII/2002, PROBIO leg., UNILA. 1♀, São Luís, 21/III/1982, Mazucato & Camargo leg., RPSP. 1♀, São Luís do Maranhão, 26/VI/1991, Apocalypse – Rodrigues leg., UNILA, *X. suspecta*, F. C. V. Zanella det 2009. 2♀, Barreirinhas, 11/II/2005, UNILA, *X. suspecta*, F. C. V. Zanella det 2009. **Tocantins** colocar as 4 de tocantins **Goiás** 1♀, Catalão, 22/XII/2012, J. Mesquita Neto leg., UFMG, *X. (Neoxylocopa) suspecta*, P. C. Zama det 2016. 1♀, Mundo Novo, 13°55'49"S 49°58'08.5"W, 07/II/2012, V. C. Pires leg. UFMG, *X. (Neoxylocopa) suspecta*, P. C. Zama det 2014. **Distrito Federal** 1♀, Deodoro, 24/IX/1934, W. Zikán leg., INPA, *X. (Neoxylocopa) cfr suspecta*, F. A. Silveira det 2013. **Mato Grosso do Sul** 15♀, Campo Grande, 10/VI/2000, 22-23/I, 07-21/II/2001, H. N. Consolaro leg., UFMS. 1♀, Serra da Bodoquenha, 21°32'46"S 56°55'29"W, II/2008, V. Carbonari & T. Auko leg., UFGD, *X. suspecta*, GAR Melo det. 2009. **Piauí** 1♀, Caracol, 01/IV/2007, C. Schindwein leg., UFMG, *X. (Neoxylocopa) suspecta*, F. C. V. Zanella det, 2011. **Ceará** 1♀, Ubajara, 03°50'S 40°53'W, 26/X/2011, F. C. V. Zanella & P. E. Santos Neto leg., UNILA. 1♀, Ubajara, 3°50'50"S 40°53'23"W, 22/X/2011, F. C. V. Zanella leg., UNILA. 1♀, Ubajara, 03°49'57,2"S 40°53'59,4"W, 23/X/2011, A. Ferreira Jr. leg., UNILA. 1♀, Ubajara, 3°50'53"S 40°54'56"W, 08/V/2014, Almeida, Lucena, Tavares leg., RPSP. **Sergipe** 1♀, Aracaju, 31/VIII/2002, E. R. F. Michelette leg., RPSP. 1♀, Serra de Itabaiana, 21/X/2004, C. D. S. Silva leg., RPSP. 1♀, Laranjeiras, 03/IV/1999, E. R. F. Michelette leg., RPSP. **Bahia** 1♀, Abaete, 04/X/1996, E. L. Neves leg., UFMG, *X. (Neoxylocopa) inc sp.*, A. A. Azevedo det. 1♀, Santa Terezinha, 08/XI/2010, A. T. Carvalho leg., UFPE, *X. (Neoxylocopa) suspecta*, F. C. V. Zanella det 2011. 1♀, Pituaçu, 24/II/2000, Maise leg., UFBA. 1♀, Pituaçu, 09/II/2001, M. Barreto leg., UFBA, *Xylocopa (Neoxylocopa) nigrocincta*, M. Barreto det. 1♀, Morro do Chapéu, 17/I/1985, Camargo leg., RPSP. 1♀, Dunas Stiep, Salvador, 15°59'S 38°26'W, 21/III/2003, Equipe ecopol leg., UFBA. **Minas Gerais** 1♀, Itumirim, 21.289130S 44.799275W, F. C. V. Zanella leg., UNILA. 1♀, Cássia, 10/X/1999, E. A. B. Almeida leg., UFMG, *X. inc sp.*, E. A. B. Almeida det. 1♀, São Sebastião da Vitória, 21°14'48"S 44°23'52"W, J. C. Agostini leg., UNILA. 1♀, Prados, 21°03'08"S 44°05'30"W, 06/I/2019, J. C. Agostini leg., UNILA. 1♀, Belo Horizonte, 12/VI/2000, M. Pompeu leg., UFMG, M. Pompeu det. 1♀, Belo Horizonte, 22/I/1997, R. M. Carmo leg., UFMG, *X. (Neoxylocopa) cfr suspecta*, F. A. Silveira det 1997. 1♀, Itabira, 19°36'58.0"S 43°30'42,3"W, 22/II/2016, R. B. Martinez & A. Cordeiro leg., UFMG, *X. (Neoxylocopa) inc sp.*, P. C. Zama det 2016. 1♀, Coroas, 21°2'27"S 44°2'50"W, 06/I/2019, J. C. Agostini leg., UNILA. 1♀, Viçosa, 15/IX/1980, Lucio leg., RPSP. 1♀, Serra da Canastra, 03 – 04/VII/1988, A. Camargo leg., RPSP. 1♀, Congonhas, 20.587535S 43.893882W, 08/I/2019, F. C. V. Zanella leg., UNILA. 4♀, Resende Costa, 20°55'44"S 44°13'47"W, 06/I/2019, J. C. Agostini leg., UNILA. **Espírito Santo** 1♀, Conceição da barra, 18°24'17.1"S 39°41'49.7"W, 10/XI/2013, A. L. M. Receptuti leg., UFMG, F. A. Silveira det 2014. **Rio de Janeiro: Material da UENF. São Paulo** 1♀, Ribeirão Preto, 26/IX/1987, G. M. Faria leg., RPSP. 1♀, Teodoro Sampaio, 10/III/2009, F. Francisco leg., UNILA. 1♀, Teodoro Sampaio, 11/III/2009, F. Francisco leg., UNILA. 1♀, Teodoro Sampaio, 22°33'S 52°19'W, 14 – 17/II/1999, M. L. Oliveira leg., UNILA,

X. suspecta, F. C. V. Zanella det 2009. 1♀, 1♀, Apiaí, 23/I/2009, F. Francisco leg., UNILA. 1♀, Apiaí, 24/VIII/2009, F. Francisco leg., UNILA. 2♀, Altinópolis, -20.987999S -47.465232W, 11/I/2019, F. C. V. Zanella, UNILA. 1♀, Boa Esperança do Sul, 28/XI/1963, K. Lenko leg. MZSP. 1♀, Ribeira, 25/I/2009, F. Francisco leg., UNILA. 1♀, Sorocaba, 27/XII/2018, F. C. V. Zanella leg., UNILA. 1♀, Cajuru, 29/I/1988, Mazucato leg., RPSP. 1♀, Luís Antônio, 24/II/1999, M. A. Batista leg., UFBA. 1♀, Luís Antônio, 19/VIII/1998, M. C. Gaglianone leg., RPSP. 1♀, Luiz Antônio, 21°33'18"S 47°42'16"W, 05/III/1999, M. L. Oliveira leg., INPA, X. (*Neoxylocopa*) *cfr suspecta*, F. A. Silveira det 2013. 1♀, Cajuru, 15/I/1988, S. R. M. Pedro leg., RPSP. **Paraná** 1♀, Medianeira, 16/III/2009, F. Francisco leg., UNILA. 2♀, Marechal Cândido Rondon, 24°33'32"S 24°03'24"W, 06/IV/2018, Luz leg., UNILA. 1♀, Foz do Iguaçu, 25°32'29,07"S 54°34'9.84"W, F. C. V. Zanella leg., UNILA, J. C. Agostini det, 2018. 2♀, Corbélia, 24.582373S 53.184096W, 13/I/2019, F. C. V. Zanella leg., UNILA. 2♀, Borborema, -21.608100S -49.133473W, 12/I/2019, F. C. V. Zanella leg., UNILA. **BOLÍVIA:** 1♀, S. Antonio, 18 – 19/VII/1964, B. Malkin, MZSP.

Formas com faixas ferrugíneas no metassoma

Uma faixa (1)

Paraná: 1♀, Foz do Iguaçu, 25°32'29.07"S 54°34'9.84"W, 20/11/2018, F. C. V. Zanella & J. C. Agostini leg., UNILA.

Duas faixas (2)

Paraná: 1♀, Foz do Iguaçu, 25°32'29.07"S 54°34'9.84"W, 20/11/2018, F. C. V. Zanella & J. C. Agostini leg., UNILA. **Minas Gerais:** 1♀, Belo Horizonte, 12/VI/2000, M. Pompeu leg, UFMG, X. (*Neoxylocopa*) *cfr suspecta*, M. Pompeu det. 1♀, Itabira, 19°37'05.7"S 43°13'09.1"W, 25/II/2016, R. B. Martines & A. Cordeiro leg., UFMG, X. (*Neoxylocopa*) *inc. sp.*, P. C. Zama det 2016. **Mato Grosso do Sul:** 1♀, Campo Grande, 20/II/2001, H. N. Consolaro leg., UFMS. 1♀, Campo Grande, 30/IV/2001, H. N. Consolaro leg., UFMS. **São Paulo:** 1♀, Jabotical, 19/IV/1973, Rujero leg., RPSP.

Três faixas (3)

Pará: 1♀, Rondon do Pará, 27/VI/2002, E. Almeida & J. Almeida leg., UFMG, X. (*Neoxylocopa*) *inc. sp.*, E. A. B. Almeida det, X. (*Neoxylocopa*) *sp.*, P. C. Zama det. 2016. **Bahia:** 1♀, Abaeté, 1/IX/1996, E. L. Neves leg, UFMG, X. (*Neoxylocopa*) *nigrocincta*, A. A. Azevedo det, X. (*Neoxylocopa*) *sp.*, P. C. Zama det 2016. 1♀, Itamaraju, 18/I/2009, A. Nemésio leg., UFMG, X. *inc. sp.*, A. Nemésio, X. (*Neoxylocopa*) *sp.* P. C. Zama det. 2016. **Minas Gerais:** 1♀, Rio Pardo de Minas, 15°36'55.8"S 42°4'00.8"W, 13/VI/2015, F. M. dos Santos Soares leg., UFMG, X. (*Neoxylocopa*) *nigrocincta*, F. A Silveira, det. 2015, X (*Neoxylocopa*) *sp.*, P. C. Zama det 2016. 1♀, Almenara, 16°11'01"S 40°45'47"W, 08/I/2014, M. F. B. Almeida leg., UFMG, X. (*Neoxylocopa*) *nigrocincta*, P. C. Zama det. 2014, X. (*Nexylocopa*) *sp.* P. C. Zama det 2016. 1♀, Conceição do Mato Dentro, 2005, A. B. N. Oliveira & A. R. R. Ferrari leg., UFMG, X. (*Neoxylocopa*) *sp.*, P. C. Zama det 2016. **Mato Grosso:** 1♀, Barra do Tapirapés, 25 – 27/I/1964, B. Malkin leg., MZSP. **Mato Grosso do Sul:** 3♀, Campo Grande, 26/XII/2000 e 22/I, 07/II/2001, H. N. Consolaro leg., UFMS. **Paraná:** 1♀, Foz do Iguaçu, 25°29'4.56"S 54°34'9.84"W,

15/IX/2018, F. C. V. Zanella & J. C. Agostini leg., UNILA. 3♀, Foz do Iguaçu, 25°32'29.07"S 54°34'9.84"W, 20/11/2018, F. C. V. Zanella & J. C. Agostini leg., UNILA. 1♀, Marechal Cândido Rondon, 24°33'22.00"S 54° 3'24.00"W, 06/IV/2018, Luz leg., UNILA. 1♀, Santa Terezinha de Itaipu, 16/III/2009, F. Francisco leg., UNILA. 2♀, Corbélia, 24°34'56.54"S 53°11'2.75"W, 13/I/2019, F. C. V. Zanella leg., UNILA. 1♀, Capitão Leonidas Marques, 17/III/2009, F. Francisco leg., UNILA. **São Paulo:** 1♀, Parque Estadual Morro do Diabo, Teodoro Sampaio, 22°33'S 52°19'W, 14 – 17/XI/1999, M. L. Oliveira leg., UNILA, X. *cf. nigrocincta*, F. C. V. Zanella det. 2009. 1♀, Jaboticabal, 19/IV/1973, Rujero leg., RPSP.

Quatro faixas (4)

Bahia: 1♀, Dunas stiep, Salvador, 15°59'S 38°26'W, 23/I/2003, Equipe ecopol leg., UFBA. **Paraná:** 3♀, Foz do Iguaçu, 25°31'21.39"S 54°34'36.30"W, 02/XII/2018, F. C. V. Zanella & J. C. Agostini leg., UNILA. 1♀, Foz do Iguaçu, 25°29'4.56"S 54°34'9.84"W, 15/IX/2018, F. C. V. Zanella & J. C. Agostini leg., UNILA. 1♀, Foz do Iguaçu, 25°29'02.8"S 54°33'27.9"W, 03/XI/2018, G. Pinheiro leg., UNILA. 3♀, Foz do Iguaçu, 25°32'29.07"S 54°34'9.84"W, 20/11/2018, F. C. V. Zanella & J. C. Agostini leg., UNILA. 2♀, Corbélia, 24°34'56.54"S 53°11'2.75"W, 13/I/2019, F. C. V. Zanella leg., UNILA. **São Paulo:** 1♀, Teodoro Sampaio, 11/III/2009, UNILA. 1♀, Jaboticabal, 19/IV/1973, Rujero leg., RPSP, X. (*Neoxylocopa*) *nigrocincta*. **Minas Gerais:** 1♀, Almenara, 16°11'01"S 40°45'47"W, 08/I/2014, M. F. B. Almeida leg., UFMG, X. (*Neoxylocopa*) *nigrocincta*, P. C. Zama det 2014, X. (*Neoxylocopa*) *sp.*, P. C. Zama det 2016.

Cinco faixas (5)

Paraná: 1♀, Foz do Iguaçu, 25°32'29.07"S 54°34'9.84"W, 20/11/2018, F. C. V. Zanella & J. C. Agostini leg., UNILA. 1♀, Foz do Iguaçu, 25°29'02.8"S 54°33'27.9"W, 03/XI/2018, G. Pinheiro leg., UNILA. 1♀, Corbélia, 24°34'56.54"S 53°11'2.75"W, 13/I/2019, F. C. V. Zanella leg., UNILA. **Mato Grosso do Sul:** 1♀, Maracaju, 21°36'52"S 55°10'6"W, II/2008, Meotti, C. *et al.* leg., UFGD, X. (*Neoxylocopa*) *brasilianorum*, M. C. de Almeida det 2008, X. *suspecta*, G. A. R. Melo det 2009. 1♀, Dourados, 22°11'41"S 54°5'45"W, XI/2007, B. M. Trad et. Al. Leg., UFGD, X. *nigrocincta*, G. A. R. Melo det 2012. **Minas Gerais:** 1♀, Ponte Nova, 16/III/1990, F. A. Silveira leg., UFMG, X. (*Neoxylocopa*) *cf. nigrocincta*, F. A. Silveira det 1990, X. (*Neoxylocopa*) *sp.*, P. C. Zama det 2016. **Santa Catarina:** 1♀, Nova Teutônia, VII/1963, F. Plaumann leg., MZSP. **Rio Grande do Sul:** 1♀, São Leopoldo, 19/II/1965, Célio Valle leg., MZSP.

Seis faixas (6)

Mato Grosso do Sul: 1♀, Dourados, 22°11'41"S 54°55'45"W, XI/2007, Trad, B. M. *et al.* leg., UFGD, X. *nigrocincta*, G. A. R. Melo det. 2012.

ANEXO II - TABELA DE INDIVÍDUOS SEQUENCIADOS

Legenda: N_SP1 – N= *nigrocincta*, SP= São Paulo, 1= primeiro indivíduo.

S_PR3 – S= *suspecta*, PR= Paraná, 3= terceiro indivíduo.

Espécie	Código	Nº de bandas metassomais ferrugineas	Informação da espécie	Nº de acesso do Genbank	
				<i>CoI</i>	<i>CytB</i>
Grupo externo					
<i>X. (Stenoxyllocopa) micheneri</i>					AY005271
<i>X. (N.) frontalis</i>				KC853310	AY005275
<i>X. (N.) grisescens</i>				JQ230009	
<i>X. (N.) cubaecola</i>				KP253873	
<i>X. (N.) gualanensis</i>					AY005273
<i>X. (N.) sonorina</i>				KX055189	
<i>X. (Alloxylocopa) appendiculata</i>				LC492865	EU722495
Grupo interno					
	S_CE1	0	CE, Ubajara, UNILA, 22 de novembro de 2011		
	S_CE2	0	CE, Ubajara, UNILA, 23 de outubro de 2011		
	S_CE3	0	CE, Ubajara, RPSP, 8 de maio 2014		
	S_PB1	0	PE, Rio Tinto, UFMG		

Forma *suspecta*

S_PB2	0	PE, Areias, UNILA, 1 de outubro 2011
S_PB3	0	PE, Areias, UNILA, 27 de setembro 2011
S_PB4	0	PE, Cutié, UNILA, 9 de setembro 2012
S_PB5	0	PE, Rio Tinto, UFMS, 15 de março 2003
S_AC1	0	AC, Rio Branco, INPA, 19 de junho 2006
S_AC2	0	AC, Rio Branco, UFMG, 26 de maio 2009
S_AC3	0	AC, Rio Branco
S_AM1	0	AM, Humaitá, MPEG
S_PA1	0	PA, Belterra, UNILA, 2 de fevereiro 2019, F. Zanella
S_PA2	0	PA, Curionópolis, MPEG, 3 de outubro 2014
S_PA3	0	PA, Rondon do Pará, UFMG, 27 de junho 2002
S_PA4	0	PA, Bragança, MPEG
S_PA5	0	PA, Garoto Xingu, MPEG
S_MA1	0	MA, Tabocas, UNILA, 4 de março 2005
S_MA2	0	MA, Chapadinha, UFMG
S_MA3	0	MA, Barreirinhas, UNILA
S_MA4	0	MA, Tabocas, UNILA
S_PR1	0	PR, Sta. Terezinha de Itaipu, UNILA, 16 de março 2009, F. Francisco
S_PR2	0	PR, Medianeira, UNILA, 16 de março 2009, F. Francisco
S_PR3	0	PR, Corbélia, UNILA, 13 de janeiro de 2019, F. Zanella
S_PR4	0	PR, Corbélia, UNILA, 13 de janeiro de 2019, F. Zanella
S_MS1	0	MS, Campo Grande, UFMS, 15 de novembro

2010		
S_MS2	0	MS, Campo Grande, UFMS, 22 de janeiro 2001
S_MS3	0	MS, Campo Grande, UFMS, 8 de abril 2001
S_MS4	0	MS, Campo Grande
S_SP1	0	SP, Teodoro Sampaio, UNILA, 10 de março 2009, F. Francisco
S_SP2	0	SP, Borborema, UNILA, 12 de janeiro 2019, F. Zanella
S_SP3	0	SP, Altinópolis, UNILA, 11 de janeiro 2019, F. Zanella
S_SP4	0	SP, Apiaí, UNILA, 24 de agosto 2019, F. Francisco
S_SP5	0	SP, Borborema, UNILA, 12 de janeiro 2019, F. Zanella
S_SP6	0	SP, Teodoro Sampaio, UNILA, F. Francisco
S_SP7	0	SP Ribeira, UNILA, 25 de janeiro 2009, F. Francisco
S_SE1	0	SE, Serra de Itabaiana, RPSP, 21 de outubro 2004
S_SE2	0	SE, Aracaju, RPSP, 31 de agosto 2002
S_PI1	0	PI, Caracol, UFMG, 1 de abril 2007
S_MG1	0	MG, Itabira, UFMG, 22 de fevereiro 2016
S_MG2	0	MG, Resende Costa, UNILA, 6 de janeiro 2019, J. Agostini
S_MG3	0	MG, Resende Costa, UNILA, 6 de janeiro 2019, J. Agostini
S_MG4	0	MG, Resende Costa, UNILA, 6 de janeiro 2019,

		J. Agostini
S_MG5	0	MG, Resende Costa, UNILA, 6 de janeiro 2019, J. Agostini
S_MG6	0	MG, Itumirim, UNILA, 6 de janeiro 2019, F. Zanella
S_MG7	0	MG, Coroas, UNILA, 6 de janeiro 2019, J. Agostini
S_MG8	0	MG, Prados, UNILA, 6 de janeiro 2019, J. Agostini
S_MG9	0	MG, Congonhas, UNILA, 8 de janeiro 2019, F. Zanella
S_MT1	0	MT, Rondonópolis, UFMG, 31 de março 2005,
N_SP1	4	SP Teodoro Sampaio, UNILA, 11 de março 2009, F. Francisco
N_SP2	2	SP, Altinópolis, UNILA, 11 de janeiro 2019, F. Zanella
N_PA1		PA, Rondon do Pará, UFMG, 27 de junho 2002,
N_PR1	5	PR, Capitão Leonidas Marques, UNILA, 17 de março 2009, F. Francisco
N_PR2	5	PR, Foz do Iguaçu, UNILA, 20 de novembro 2018, F. Zanella & J. Agostini
N_PR3	5	PR, Foz do Iguaçu, UNILA, 20 de novembro 2018, F. Zanella & J. Agostini
N_PR4	4	PR, Foz do Iguaçu, UNILA, 20 de novembro 2018, F. Zanella & J. Agostini
N_PR5	4	PR, Foz do Iguaçu, UNILA, 20 de novembro 2018, F. Zanella & J. Agostini

Forma *nigrocincta*

N_PR6	5	PR, Foz do Iguaçu, UNILA, 20 de novembro 2018, F. Zanella & J. Agostini
N_PR7	3	PR, Foz do Iguaçu, UNILA, 20 de novembro 2018, F. Zanella & J. Agostini
N_PR8	2	PR, Foz do Iguaçu, UNILA, 20 de novembro 2018, F. Zanella & J. Agostini
N_PR9	4	PR, Foz do Iguaçu, UNILA, 20 de novembro 2018, F. Zanella & J. Agostini
N_PR10	3	PR, Foz do Iguaçu, UNILA, 15 de setembro 2018, G. Pinheiros
N_PR11	4	PR, Foz do Iguaçu, UNILA, 15 de setembro 2018, G. Pinheiros
N_PR12	5	PR, Foz do Iguaçu, UNILA, 3 de novembro 2018, F. Zanella & J. Agostini
N_PR13	5	PR, Foz do Iguaçu, UNILA, 3 de novembro 2018, F. Zanella & J. Agostini
N_PR14	5	PR, Foz do Iguaçu, UNILA, 2 de dezembro 2018, F. Zanella & J. Agostini
N_PR15	4	PR, Foz do Iguaçu, UNILA, 2 de dezembro 2018, F. Zanella & J. Agostini
N_PR16	4	PR, Foz do Iguaçu, UNILA, 2 de dezembro 2018, F. Zanella & J. Agostini
N_PR17	3	PR, Sta. Terezinha de Itaipu, UNILA, 16 de março 2009, F. Francisco
N_PR18	4	PR, Corbélia, UNILA, 13 de janeiro 2019, F. Zanella
N_PR19	4	PR, Corbélia, UNILA, 13 de janeiro 2019, F.

		Zanella
N_PR20	3	PR, Corbélia, UNILA, 13 de janeiro 2019, F. Zanella
N_PR21	3	PR, Corbélia, UNILA, 13 de janeiro 2019, F. Zanella
N_PR22	5	PR, Corbélia, UNILA, 13 de janeiro 2019, F. Zanella
N_BA1	4	BA, Itamaraju, UFMG, 18 de janeiro 2009
N_MG1	3	MG, Itabira, UFMG, 25 de fevereiro 2016
N_MG2	4	MG, Almenara, UFMG, 8 de janeiro 2014
N_MS1	3	MS, Campo Grande, UFMS, 30 de abril 2001

**ANEXO III – TABELA DE MEDIDAS DE CARACTERES PARA AS FORMAS
NIGROCINCTA E SUSPECTA**

Indivíduo	CMT	LMT	CMS	LMS	CT	CC	LC
<i>Xylocopa suspecta</i>							
Ufms 0605	1,6cm	1 cm	0,7 cm	0,9 cm	2,7 cm	0,6 cm	0,8 cm
Unila 2820	1,5 cm	1 cm	0,7 cm	0,9 cm	2,6 cm	0,7 cm	≅ 0,8 cm
Unila 2886	1,3 cm	≅ 1 cm	0,7 cm	0,9 cm	2,3 cm	0,6 cm	0,7 cm
Unila 10146	1,3 cm	0,9 cm	0,6 cm	0,6 cm	2,2 cm	0,6 cm	≅ 0,7 cm
Unila 10051	1,4 cm	1 cm	≅ 0,7 cm	0,6 cm	2,5 cm	0,6 cm	0,7 cm
Rpsp BA	1,1 cm	1 cm	0,7 cm	≅ 1 cm	2,2 cm	0,7 cm	≅ 0,8 cm
Ufmg 1402091	1.1 cm	0,9 cm	0,6 cm	0,8 cm	2 cm	0,6 cm	0,7 cm
Unila 9978	1,5 cm	1 cm	≅ 0,8 cm	1 cm	2,5 cm	0,7 cm	0,8 cm
Rpsp Viçosa	1,8 cm	1 cm	0,7 cm	≅ 1 cm	2,7 cm	0,7 cm	0,7 cm
Unila 10014	1,4 cm	1 cm	0,8 cm	1 cm	2,2 cm	0,7 cm	≅ 0,8 cm
Unila 10064	1,5 cm	1 cm	0,7 cm	1 cm	≅ 2,3 cm	0,6 cm	0,7 cm
Rpsp Ribeirão	1,2 cm	0,9 cm	0,5 cm	≅ 0,9 cm	2,1 cm	0,6 cm	0,7 cm
Unila 9999	1,4 cm	1 cm	0,7 cm	≅ 1 cm	2,2 cm	0,7 cm	0,7 cm
Ufmg 1521134	1,3 cm	1 cm	0,8 cm	0,9 cm	≅ 2,5 cm	0,7 cm	≅ 0,8 cm
Mpeg PA	1,3 cm	1 cm	0,7 cm	1 cm	2,1 cm	≅ 0,7 cm	≅ 0,8 cm
Unila 2822	1,4 cm	1 cm	0,7 cm	0,9 cm	2,4 cm	≅ 0,7 cm	≅ 0,8 cm
Unila 2788	1,5 cm	0,9 cm	0,7 cm	0,9 cm	2,3 cm	0,6 cm	0,7 cm
Unila 2870	≅ 1,2 cm	1 cm	0,7 cm	0,9 cm	2,3 cm	0,6 cm	≅ 0,8 cm
<i>Xylocopa nigrocincta</i>							
Ufms 0608	1,4 cm	1 cm	0,8 cm	0,9 cm	2,4 cm	0,6 cm	0,8 cm
Ufmg 1610075	1,4 cm	1 cm	0,7 cm	≅ 1 cm	2,4 cm	0,8 cm	≅ 0,8 cm
Unila 10026	1,4 cm	1 cm	0,7 cm	1 cm	2,4 cm	0,7 cm	0,8 cm
Rpsp Jabotibal	1,4 cm	0,9 cm	0,6 cm	0,9 cm	2,2 cm	0,6 cm	≅ 0,7 cm
Mzusp N. Teutônia	1,3 cm	1,1 cm	0,7 cm	≅ 1 cm	2,5 cm	0,7 cm	≅ 0,8 cm
Ufgd 314 a	1,3 cm	1,1 cm	0,8 cm	1 cm	≅ 2,4 cm	0,7 cm	0,7 cm
Unila 9972	1,5 cm	1,2 cm	0,7 cm	1 cm	2,5 cm	≅ 0,7 cm	≅ 0,8 cm
Unila 10133	≅ 1,4 cm	1 cm	0,7 cm	0,8 cm	2,3 cm	0,6 cm	0,7 cm
Unila 10053	1,2 cm	0,9 cm	0,6 cm	0,8 cm	≅ 2,1 cm	≅ 0,6 cm	≅ 0,6 cm
Unila 2767	≅ 1,6 cm	≅ 0,8 cm	≅ 0,7 cm	0,8 cm	1,8 cm	0,5 cm	≅ 0,7 cm
Unila 9973	1,4 cm	1,2 cm	0,7 cm	≅ 1 cm	2 cm	≅ 0,7 cm	≅ 0,7 cm
Ufmg 1401514	1,3 cm	1,1 cm	0,6 cm	1 cm	2,3 cm	0,6 cm	0,7 cm

ANEXO IV – ARTIGO A SER SUBMETIDO NA REVISTA *APIDOLOGIE*

O artigo a ser submetido na Revista *Apidologie* está em fase final de escrita e estruturação. Os anexos do manuscrito referente a Lista de Material Sequenciado e a Lista de Material Examinado foram excluídos desse documento por serem iguais ao ANEXO I e ANEXO II. As normas para submissão se encontram no Anexo IV.

Morphological and molecular characters reveal a new synonymy in a Neotropical subgenus bee, *Xylocopa* (*Neoxylocopa*) Michener (Apidae: Xylocopini)

Running title: New synonymy in species of the subgenus *Neoxylocopa*

Authors:

Júlia Colombelli Agostini^{1*}

Elaine Françoso²

Maria Cristina Arias²

Fernando César Vieira Zanella¹

¹Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical, Instituto Latino-Americano de Ciências da Natureza – Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), Avenida Tarquínio Joslin dos Santos, Foz do Iguaçu/Paraná/Brasil

²Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo (USP), Rua do Matão, São Paulo/SP/Brazil

juliacolombelli@gmail.com, francoso.e@gmail.com, mcarias@ib.usp.br and
fcvzanella@gmail.com

*Corresponding author: J. C. Agostini, juliacolombelli@gmail.com

Abstract:

Xylocopa nigrocincta Smith, 1854 and *Xylocopa suspecta* Moure & Camargo, 1988 are two nominal species found within the subgenus *Neoxylocopa*, being one of the most diverse in genus *Xylocopa*. The two nominal species present a sympatric geographic distribution and the first is recognize by the presence of reddish metasomatic bands, while that the other one is entirely black. The aim of this research was analyzed the identity of these nominal species using morphological and molecular data to evaluate the hypothesis that these are not two different evolutionary lineages. Females of both species were collected in the Pará, Minas Gerais, São Paulo e Paraná States and also specimens were obtained on loan from museums and collections representing a large part of the morphotypes distribution. The specimens were associated with the nominal species by identification keys of the subgenus *Neoxylocopa*. A search for possible diagnostic characters was made in the external morphology. The mitochondrial fragments of the *Cytochrome C Oxidase Subunit I (COI)* and *Cytochrome B (CytB)* were sequenced, edited and analyzed. The genetic distance was made between the fragments, separated by different morphotypes, including representatives of external group. Phylogenies were made by Inference Bayesian for both genes fragments and posteriorly, the number of haplotypes, polymorphic sites and the haplotype network. The distribution maps were made according to the literary references and morphotypes found. Continuous variations were observed in the number of metasomal bands, in the pattern punctuation of second metasomal tergal, in the basitibial plate had variations on the shape of posterior apexes and anterior apical region in both morphotypes and in the iridescence of wings had different pattern colors in both morphotypes. The phylogenetic hypotheses for both molecular markers presented several polytomies, with no grouping by morphotypes. The clades formed by the *COI* region had low bootstrap value, showing how the topologies within internal group are uncertain, but well supported by your ancestral node. The evidence does not support the hypothesis that the two nominal species are distinct evolutionary lineages, and it is necessary to establish the synonymy between *X. nigrocincta* and *X. suspecta*.

Keywords: *Xylocopa nigrocincta*/ *Xylocopa suspecta*/ DNA Barcode/ Morphology/ Synonymy.

1. Introduction

The genus *Xylocopa* Latreile, 1802 (Apidae, Xylocopini) is a common group of tropical large bees usually called *mamangava* or carpenter bees (Hurd & Moure 1963; Michener 2007). They build their nests diggind dead woods or other plant materials. There are a little more than 470 species accommodated in 31 subgenus, mainly in tropical and neotropical regions (Leys *et al.* 2002; Michener 2007). Recently, the carpenter bees have been received attention for being important to pollination of cultivated plants of different families, like passion fruit, pumpkin, tomato, brazilian nuts and eggplants (Kearar 2010; Yamamoto *et al.* 2014; Giannini *et al.* 2015).

From the twelve to seventeen subgenus cited for the Neotropical Region, *Neoxylocopa* Michener, 1954 is the most diverse, with 50 species (Michener 2007; Moure 2012). Among the nominal species of this subgenus, *Xylocopa nigrocincta* Smith, 1854 are easily distinguished from similar species by the presence of metasomal reddish bands, although there is difference in its diagnosis related to the number of bands in recent regional fauna studies (see Schlindwein *et al.* 2003; Marchi & Alves-dos-Santos 2013; Lucia *et al.* 2014).

In the original description of *X. nigrocincta* Smith (1854), based in one female from South America but with no record of a specific location, the author mention the ferruginous metasoma and the tergas apical margins with black bands, but with a black apical segment, and the wings dark-fusco ferruginous having a splendid violet iridescence. Moure & Hurd (1963) stablished the synonym with *X. schultessi* Dusmet & Alonso, 1924 described based in a specimen with similar morphological characteristics, collected in Rio Grande do Sul state, Brazil. More recently, Lucia *et al.* (2014) used a similar diagnosis for the specimes of Argentina, but Marchi & Marchi & Alves-dos-Santos (2013) cites three or four reddish bands for São Paulo State individuals and Schlindwein *et al.* (2003) mention only the presence of reddish bands, without citing its number.

When describing *X. suspecta*, Moure & Camargo (1988) stressed its difference to what they considered black, similar and sympatric species: *Xylocopa ordinaria* Smith, 1874, *X. carbonaria* Smith, 1854 e *X. submordax* Cockerel, 1935 (synonymy of *X. transitoria* Pérez 1901). Characteristics such as body size, sparse punctuation on the disc of T2 with short pubescence and wings with a greenish iridescence were highlighted to recognize it. They did not compare it with *X. nigrocincta*, possibly because of the clear absence of metasomal reddish bands.

A preliminary analysis of individuals previously identified as *X. nigrocincta* or *X. suspecta* allowed to recognize the presence of wider variation in the number of reddish bands and of other diagnostic characters, this, together with the broad sympatry, from Argentina to Central and Eastern Brazil (see Moure 2012), lead us to investigate the hypothesis that they do not have different evolutionary histories and are thus synonyms. During this project, Lucia & Gonzalez (2017) claimed that *X. nigrocincta* and *X. suspecta* could be coespecific, because they considered male and female specimens tagged as *X. suspecta* and collected in Bolivia (El Beni) as indistinguishable from *X. nigrocincta*, reinforcing the necessity of an reexamination based on a great number of individual and a wider geographical representation.

Isaac *et al.* (2004) affirm that exist a taxonomic inflation related by the overestimation of subspecies at the level of species. According to Jones *et al.* (2009), this conflict is usually resolved by taxonomic revision of the genus, thus being able to reduce the number of recognized species through by grouping of two or more nominal species into a single specie (synonymy) and the “creation” of new species can also occur by description of a new material or by dividing an existing species in two or more. Thus, in biology, the most important tasks are the correct description and identification of species, due to the fact that scientists can not publish empirical data or access information (even if was published) about a study organism until it’s correctly named (Bertsch 2009).

In the biology area, there are numerous debates about how to delimit a species theoretically and in practical terms (Rapini 2004; Zander 2007; Mallet 2010). The methods related to species delimitation are linked to the tools used to understand variations that occur within study object. An integrative approach can use different data sources and methods has been shown to be indispensable for understanding the limits and recognition of species, due the biological complexity involved (Dayrat 2005; Pante *et al.* 2015). To face this kind of problem, behavioral, ecological and molecular tools (Will *et al.* 2005) have been associated with traditional morphology and, thus helping to increase knowledge of variation levels in natural populations that can't be differentiated from traditional Aristotelian and Linnean criteria morphospecies (Cronquist 1978).

The taxonomic researches have been implemented with a molecular tool which can help more easily and with more reliable, identify or diagnose species and to discover new species (Bertsch 2009). This tool is knowing as DNA Barcode, is based in gene regions of cytochrome oxidase subunit I (*CoI*) sequences, a fragment with approximately 648 pb of length and your original concept is based in universal applicability, because most group of animals have *CoI* (Hebert *et al.* 2003). In relation to bees, this approach has been proved a huge success to contributing for identification and delimitation of species (Gibbs 2009; Sheffield *et al.* 2009; Koch 2010; Magnacca & Brown 2012), identification of cryptic species (Williams & Hernandez 2000, Cameron *et al.* 2007; Murray *et al.* 2008; Williams *et al.* 2012; Hurtado-Burillo *et al.* 2013) and sex association of males and females within species (Sheffield *et al.* 2009).

We thus reanalyzed the morphological characters of individuals associated previously with both nominal species, *Xylocopa nigrocincta* e *X. suspecta*, also recognizing possible intermediates and checking for new characters in female's representative of almost all its broad distribution. This analysis was complemented by a survey of molecular data that could be analyzed as evidence that both forms are unique lineages or that morphological characters are not able to recognize different

natural groups. Therefore, this approach has never been applied to subgenus *Neoxylocopa* and represents the first integrative research to solve taxonomic problem of this kind.

2. Material and Methods

Examined Specimens

205 specimens examined belong to the “Coleção Entomológica da UNILA”, loaned from other institutions (see acknowledgments) and also obtained by complementary collects which were performed in Pará, Paraná, Minas Gerais and São Paulo States (see additional data in the Complementary Material I). These latter specimens were sacrificed with potassium cyanide and stored in identified pots with ethanol alcohol 70% in a freezer at -4°C. The pots were identified by location, coordinate, date, collector and collect’s methods.

Morphology

All females were screened and analyzed following the identification keys for bees of the subgenus *Neoxylocopa* proposed by Schindwein *et al.* (2003), Marchi & Alves dos Santos (2013), Lucia *et al.* (2014) e Mawdsley (2018) with a Stereoscopic Loupe Zeiss Discovery V8 at the “Enedina Marques de Souza” Multi-User Laboratory (Itaipu/PTI/Unila). There was made an exhaustive search in all specimens to register variation in the characters states of the external morphology, especially those previously mentioned in taxonomic works, in addition to the original descriptions of Smith (1854) and Moure & Camargo (1988). Images were taken at a Zeiss V12 using the Axion Vision SE 64.4 software. Photos of the whole body specimens were obtained with a Canon 6Di camera. The photos were edited in the Adobe Photoshop CC 2017 and the imagens board was made in the Adobe Illustrator CC 2017.

The nomenclature of the anatomy of bees was taken from Michener (2007), Silveira *et al.* (2002) and Hurd & Moure (1963). The following measurements were obtained using a digital caliper: TBL

(total body length), MetL (metassomal length), MetW (metasomal width), MesL (mesosomal length), MesW (mesosomal width), HL (head length), HW (head width). Additional structures are abbreviated as: T (metasomal tergum) and BP (basitibial plate).

Maps production

The geographic coordinates were obtained directly from specimens labels, or when only the name of the municipality and locality was available, through consultation and plotting on the map using Google Earth Pro Version 9.3.3.1.5, taking care to check for the possible presence of homonyms. Files with the coordinates and location data were saved in KMZ format, being transformed into a Shape file through the website <http://www.zonums.com/online/kml2shp.php> and then exported to ArcMap 10.2.2 software for construction of the maps. In the absence of coordinates, the headquarters location of the municipality or locality was used. The Brazil's Shape file, Argentina's provinces and countries of South America were obtained from the IBGE website (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), <https://www.indec.gov.ar/indec/web/Institucional-Indec-Codgeo> and <http://forest-gis.com/>, respectively.

DNA extraction, PCR amplification and sequencing

Macerated legs of 71 specimens were used to extract genetic material (Table I). DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Austin, TX, USA) was used for dry individuals from entomological collections and Chelex (Bio-Rad) (Walsh *et al.* 1991) for fresh samples.

Two mitochondrial gene fragments were partially amplified: cytochrome *c* oxidase subunit I (*CoI*) using Barbeef and MtD9 (Françoso & Arias 2013; Simon *et al.* 1994) and cytochrome *b* (*CytB*) using mtD-26 and mtD28 (Simon *et al.* 1994) primers. GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI) was used to amplify part of the COI gene, using 1,5 µl DNA sample in a final volume of 15 µl, containing 7,5 µl de GoTaq[®], 0,3 µl of each primer and 5,4 µl Milli-Q autoclaved water.

To CytB gene we used 2 µl DNA sample in a final volume of 20 µL, containing 2 µl of 10^x PCR buffer (Invitrogen), 0,6 µl of MgCl₂ (50mM), 2 µl of dNTPs (10mM), 0,4 µl of each primer, 0,3 µl of Platinum[®] Taq DNA polymerase and 8,3 µl Milli-Q autoclaved water.

For PCR amplification we used Mastercycler Pro (Eppendorf) and it was carried out using a thermocycler program consisting of 5 min denaturation step at 94 °C; followed by 35 cycles at 94 °C for 1 min, 42 °C (*CoI*) and 38,4 °C (*CytB*) for 1 min and 20 seg and 64 °C for 2 min; and a final extension at 64 °C for 10 min. PCR products were separated on a 0.8% agarose gel, stained with Gel Red 10.000X (Biotium, USA) and visualized under UV light. The successful PCR products were purified by digestion with 0.5 µL of ExoSAP-IT[®] (USB Corporation) following the manufacturer's recommendations and sent to “Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa” - CEFAP-USP, São Paulo, Brazil, for sequencing in automatic sequencer 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

An abbreviation for sequencing individuals identification was created, consisting in the abbreviation of the name of the morph (N for *nigrocincta*, here considered when presents one or more red bands and S for *suspecta*, for entirely black individuals), the abbreviation of the name of Brazilian states where it was collected and the individuals number, e.g. N_PR1.

Sequence analysis

The electropherograms were analyzed and aligned, and the nucleotide sequences were edited using the program Geneious R7 (Drummond *et al.* 2010). They were also analyzed with the *BLAST* tool against the GenBank databases (Altschul *et al.* 1990). These procedure were used to verify contamination during amplification and possible numts (Leite *et al.* 2012). The sequences obtained were deposited in GenBank and their respective accession number can be found in Table I.

Phylogenetic analysis

The genetic distance between sequences grouped by different morphotypes (entirely black, one band, two bands, three bands, four or more metasomal bands) and representatives of outgroup were

analyzed using MEGA software version 5.05 (Tamura *et al.* 2011), with the *Kimura-two-parameter* (K2P) (Nei & Kumar 2000). The Bayesian inference (BI) reconstruction was performed in Mr. Bayes 3.2.7 (Ronquist & Huelsenback 2003) and was conducted under the HKY+I model for *Col* and *CytB* sequences, which were suggest to be the best-fit substitution model to both by the Akaike Information Criterion (AIC) in jModeltest 2.1.7 software (Posada 2008). Posterior distributions of parameters, including tree topology and branch lengths, were estimated using Markov chain Monte Carlo sampling. Two parallel runs with four chains were performed each for 5.000.000 generations and the samples from posterior distribution were drawn every 500 generations and the first 20% of samples were discarded as burn-in.

The sequences representatives of the outgroup for each gene segment were selected in the GenBank databases, including species from *Neoxylocopa*, that is strongly supported as a monophyletic group (Minckley 1998; Leys 2000; 2002), and two species from a subgenus near to *Neoxylocopa* for rotting the trees.

3. Results

Morphology

It was observed a continue variation in the number of ferruginous metasomal bands, including intermediate specimens with one or two bands (Fig. 1), that were not clearly associated with one of the nominal species under analysis, following to the diagnosis given in the literature (Marchi & Alves dos Santos 2003; Schlindwein 2003; Lucia *et al.* 2014). The punctuation pattern of T2 do not allow a recognition of each morph, because it is variable in both, *nigrocincta* and *suspecta*, being very sparse, sparse or moderately dense (Fig. 2). The iridescence of the wings also showed a huge variation in both morphs. There are individuals in both with a strong violet iridescence in all wing extension, but some can present a bluish spot, as well as other colors like metallic greenish and slightly golden in the apical region. The only kind of wing iridescence color exclusive of some

entirely black individuals was the predominantly bluish (Fig. 3). Beside the above characters that are traditionally used we also observed variation in the shape of the basitibial plate (Fig. 4) in both morphs, and found no character to consistently recognize each morph.

Distribution of morphs

The entirely black morph was predominant or exclusive in the examined material, grouped with some literature data of selected works, from São Paulo and Mato Grosso do Sul states to the north (Fig. 5), except in Rio de Janeiro and Espírito Santo. In contrast, Lucia *et al.* (2014), analyzed 259 specimens from Argentina, all with four metasomal ferruginous bands or more. In Brazilian states the predominance of this typical *nigrocincta* morph was observed in Southern region, beside Rio de Janeiro. Intermediate specimens with one, two or three ferruginous metasomal bands were recorded in a somewhat intermediate region, from Western Paraná to Pará and Bahia states to the North, and from Mato Grosso and Mato Grosso do Sul to Rio de Janeiro and Espírito Santo to the East.

The distribution of individual with different T2 density of punctuation do not allow to recognize any possible pattern of distribution (Fig 6). The only Brazilian States where there is only one morph are those with lower number of examined specimens. It is possible that all the three morphs were present in all the recorded distribution, if more individuals are examined.

Molecular data

From the initial 77 specimens, 47 were successfully amplified for the *COI* fragment with 300 pb, and from the initial 23 specimens for the *CyBb* fragment, only 19 were successfully amplified with 268 pb (Table I). In both fragments was observed a high percentage of A and T bases, 44,2 e 32,6% to *COI* fragment and 35,1 and 46,8% to *CytB* fragment, what is already described as common for the insects mitochondrial genes (Tarrío *et al.* 2001).

Phylogenetics reconstructions based on Bayesian Inference for *COI* and *CytB* fragments exhibited no consistent internal resolution to the clade grouping all the individuals of the ingroup (Figs. 7 and 8), giving no support for separation between the two morphs currently assigned to *X. nigrocincta* and *X. suspecta*. The groups within this clade have low *bootstrap* value, possibly by small number of characters besides the eventual contradiction between them. Additionally, it was observed the presence of individuals of different morphs within the great polytomy of the group under analysis and also within each clade with more than three individuals.

There was found fourteen haplotypes for the *COI* sequences and nine haplotypes for the *Cytb* sequences. The haplotypes for *COI*, H2 was the most frequently in the samples. Different morphs by *nigrocincta* and *suspecta* presented the same haplotype, as seen in H2, H5, H6, H8, H12 e H13. Exclusives haplotypes also has been observed, these being within the limits of the studied specimens: H1 and H9 (Pará state), H3 and H4 (Pernambuco state), H7 (Ceará state), H10, H11 and H14 (Paraná state). The most distant haplotype from the others in *COI* sequences are H1 (Pará state) and H10 (Paraná state), corresponding to five and three mutational steps, respectively. The remaining haplotypes were closer when compare to the number of mutational steps. Whereas, in *CytB* haplotypes sequences, the most frequently was H7. The exclusive haplotypes were H1 (Pará state), H5 and H6 (Paraná state), H8 and H9 (São Paulo state). The most distant haplotype also were H1 (Pará state), H3 (Minas Gerais state) and H4 (São Paulo e Minas Gerais states).

Apparently there is a certain special pattern in the haplotype network as well as in the morphs indicated in Figure 9 which may allow a potential to evaluate the phylogeography of the shapes. However, the number of samples in this research is small to do a phylogeographic analysis with major security.

The comparison between the different morphs, defining by the presence of ferruginous metasomal bands and entirely black, revealed a small genetic distance, varying between 0,7 – 1,4% for *COI*

and next to 1,2% for *CytB*, and when compared to representatives of outgroups the divergence was higher, between 5 – 5,7% to CoI and 13,8 – 14,3% to *CytB*.

5. Discussions

The traditional morphological approach is the easiest and most common method to define species (Løken 1984; Bolton 1995; Michez & Eardley 2007), but morphological characters whom accurately reflects taxonomic units generally are difficult to determinate (Bickford *et al.* 2007), because individuals may exhibit in morphological characters, which this variation is called polymorphism. If this polymorphics characters are used to identify species, the same evolutionary unit can be considered as more than one different species, causing a overestimation of diversity (Sigovini *et al.* 2016). Incorrect species identification can be frequent when cryptic or polymorphic species are present in a population. Also, the incorrect identification can be common when only morphological taxonomic keys are used for identification (Padial *et al.* 2010).

The easiness of recognizing the presence of metasomal ferruginous bands probably lead to Moure & Camargo (1988) not to consider the possibility that the entirely black individuals they are describing as *X. suspecta* could be a variation within the nominal species described as *X. nigrocincta* by Smith (1854). In spite that Schlindwein *et al.* (2003) diagnose *X. nigrocincta* by the presence of any number of bands, there is no mention in literature of the existence of individuals with less than three.

According to Meier *et al.* (2008) the Hymenoptera mean intraspecific variation is 1,8%. In the results founded here, the values for the both mitochondrial genes among individuals with different morph, all below 1,5% are compatible with those expected for a variation within a single species. This result is close to what was found by Ferrari & Melo (2014) in their research made with individuals of three species of *Euglossa* genus. Besides this, the combination of two genes for species delimitation already been used for several authors (Ceccarelli *et al.* 2012; Santos Junior *et*

al. 2015; Sabadini *et al.* 2020) and showed to be an efficient approach to solve this questions with high confidence.

6. References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**. **215**(3): 403–410.
- Bertsch, A. 2009. Barcoding cryptic bumblebee taxa: *B. lucorum*, *B. crytarum* and *B. maanus*, a case study (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*). *Beitrage zur Entomologie*. **59**(2): 287-310.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S. *et al.* 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**. **22**: 148–155.
- Bolton, B. 1995. **A New General Catalogue of the Ants of the World**. Havard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Ceccarelli, F.S., Sharkey, M.J. & Zaldívar-Riverón, A. 2012. Species identification in the taxonomically neglected, highly diverse, neotropical parasitoid wasp genus *Notiospathius* (Braconidae: Doryctinae) based on integrative molecular and morphological approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. **62**: 485-495.
- Cronquist, A. 1978. **Once again, what is a species?** In: L. Knutson, ed. *BioSystematics in Agriculture*. Alleheld Osmun, Montclair, NJ.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**. **85**: 407-415.
- Dick, C.W., Roubik, D.W., Gruber, K.F. & Bermingham, E. 2004. Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. **Molecular Ecology**. **13**(12):3775–85
- Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., *et al.* 2011. Geneious v5. 4. Disponível em: < <http://www.geneious.com>
- Dusmet & Alonso 1924. Las "*Xylocopa*" (Hymen. Apidae) en las colecciones de Madrid. **Trabajo del Museu Nacional de Ciencia Naturale de Madrid**. **49**: 5-58.
- Estoup, A., Solignac, M., Cournuet, J.M., Goldet J & Choll, A. 1996. Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. **Molecular Ecology**. **5**(1): 19-31.

- Ferrari, B.R., & Melo, G.A. 2014. Deceiving colors: recognition of color morphs as separate species in orchid bees is not supported by molecular evidence. **Apidologie**. **45**(5): 641-652.
- Françoso, E. & Arias, M.C. 2013. Cytochrome c oxidase I primers for corbiculate bees: DNA barcode and mini-barcode. **Molecular Ecological Resource**. **13**: 844–50.
- 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**(2): 209–223.
- Gibbs, J. 2009. Integrative taxonomy identifies new (and old) species in the *Lasioglossum* (*Dialictus*) *tegulare* (Robertson) species group (Hymenoptera, Halictidae). **Zootaxa**. **2032**: 1–38.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & De Waard, J.R. 2003 Biological identification through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B. **Biological Sciences**, **270**: 313–321.
- Hurd, P.D. JR. & Moure, J.S. 1963. A classification on the large carpenter bees (Xylocopini) (Hymenoptera: Apoidea). **Entomology**. **29**: 1–365.
- Hurd, P.D. Jr. 1978. Bamboo-nesting carpenter bees (genus *Xylocopa* Latreille) of the subgenus *Stenoxycopa* Hurd and Moure. **Journal of the Kansas Entomological Society**. **51**:746-764.
- Hurtado-Burillo M., Ruiz, C., May-Itz-a, W.J., Quezada-Eu-an, J.J.G. & De la Rua, P. 2013. Barcoding stingless bees: genetic diversity of the economically important genus *Scaptotrigona* in Mesoamerica. **Apidologie**. **44**: 1–10.
- Isaac, N. J., Mallet, J. & Mace, G. M. 2004. Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**. **19**: 464 – 469.
- Jones, O.R., Purvis, A., Baumgart, E., D.L.J. 2009. Using taxonomic revision data to estimate the geographic and taxonomic distribution of undescribed species richness in the Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea). **Insect Conservation Diversity**. **2**: 204 – 212.
- Keasar, T. 2010. “Large Carpenter Bees as Agricultural Pollinators,” **Psyche**. Article ID 927463.
- Koch, H. 2010 Combining morphology and DNA barcoding resolves the taxonomy of Western Malagasy *Liotrigona* Moure, 1961 (Hymenoptera Apidae: Meliponini). **African Invertebrates**. **51**: 413–421.
- Leite, L.A.R. 2012. Mitochondrial pseudogenes in insect DNA barcoding: differing points of view on the same issue. **Biota Neotropical**. **12**(3).
- Leys, R., Cooper, S.J. & Schwarz, M.P. 2000. Molecular phylogeny of the large carpenter bees, genus *Xylocopa* (Hymenoptera: apidae), based on mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. **17**(3): 407-18.
- Leys, R., Cooper, S.J., Schwarz & M.P. 2002. Molecular phylogeny and historical biogeography of the large carpenter bees, genus *Xylocopa* (Hymenoptera: Apidae). **Biological Journal of the Linnean Society**. **77**: 249-266.

- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**. **25**: 1451-1452.
- Løken, A. 1984. Scandinavian species of the genus *Psithyrus* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae). **Entomological Scandinavia**. **23**: 1–45.
- Lucia, M., Alvarez, L.J. & Abrahamovich, A.H. 2014. Large carpenter bees in Argentina: systematics and notes on the biology of *Xylocopa* subgenus *Neoxylocopa* (Hymenoptera: Apidae). **Zootaxa**. **3754**: 201–238.
- Lucia, M. & Gonzalez, V.H. 2017 New species and designation of primary types in Neotropical carpenter bees of the genus *Xylocopa* Latreille (Hymenoptera, Apidae). **Journal of Hymenoptera Research**. **61**: 31–48.
- Lucia, M., Abrahamovich, A.H., Alvarez, L.J. 2009. A gynandromorph of *Xylocopa nigrocincta* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Neotropical Entomology**. **38**(1) 155-157.
- Magnacca, K.N. & Brown, M.J.F. 2012. DNA barcoding a regional fauna: Irish solitary bees. **Molecular Ecology Resources**. **12**: 990–998.
- Mallet, J. 2010. Why was Darwin’s view of species rejected by twentieth century biologists? **Biology and Philosophy**. **25**: 497–527.
- Marchi, P. & Alves-dos-Santos, I. 2013. As abelhas do gênero *Xylocopa* Latreille (Xylocopini, Apidae) do Estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropical**. **13**(2): 249-269.
- Mawdsley, J.R. 2018. **New records and diagnostic notes on large carpenter bees (Hymenoptera: Apidae: genus *Xylocopa* Latreille), from the Amazon River basin of South America.**
- Meier, R., Zhang, G., Ali, F. 2008. The Use of Mean Instead of Smallest Interspecific Distances Exaggerates the Size of the “Barcoding Gap” and Leads to Misidentification. **Systematic Biology**. **57**(5): 809–813.
- Michez, D. & Eardley, C. 2007. Monographic revision of the bee genus *Melitta* Kirby 1802 (Hymenoptera: Apoidea: Melittidae). **Annales de la Societe Entomologique de France (n.s.)**. **43**: 379–440.
- Michener, C.D. 2007. **The bees of the world**, 2nd edn. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Minckley, R.L. 1998. A cladistic analysis and classification of the subgenera and genera of the large carpenter bees, tribe Xylocopini (Hymenoptera: Apidae). **Scientific Papers Natural History Museum The University of Kansas**. **9**: 1–47.
- Moure, J.S. & Camargo, J.M.F. 1988. Uma nova espécie de *Xylocopa* (*Neoxylocopa*) do Brasil (Hymenoptera, Apoidea). **Revista Brasileira de Entomologia**. **32**(2): 209-214.
- Moure, J.S. 2012. Xylocopini Latreille, 1802. In Moure, J.S., Urban, D. & Melo, G.A.R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region** - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acessado em: dezembro/2019.

- Nei, M., & Kumar, S. 2000. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford University Press.
- Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I. & Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology**. **7**: 16.
- Pante, E., Schoelinck, C. & Puillandre, N. 2015. From integrative taxonomy to species description: One step beyond. **Systematic Biology**. **64**:152–160.
- Pérez , J. 1901. Contribution à l'étude des Xylocopes. **Actes de la Société Linnéenne de Bourdeaux**. **56**: 1-128
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**. **25**:1253-1256
- Rapini, A. 2004. Classes or Individuals? The Paradox of Systematics Revisited. Studies in History and Philosophy of Science. **Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**. **35**:675–695.
- Ronquist, F. & J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** **19**: 1572-1574.
- Sabadini, C.P., Machado, C.B., Vilhena, P.S, Garófalo, C.A. & Del Lama, M.A. 2020. Species delimitation and phylogenetic relationships in the genus *Trypoxylon* (Hymenoptera: Crabronidae) using molecular markers: an alternative to taxonomic impediment. **Systematics and Biodiversity**. **18**(4): 315-327.
- Santos Júnior, J.E., Santos, F.R., Silveira, F.A. 2015. Hitting an Unintended Target: Phylogeography of *Bombus brasiliensis* Lepeletier, 1836 and the First New Brazilian Bumblebee Species in a Century (Hymenoptera: Apidae). **PLoS One**. **10**(5): e0125847.
- Schlundwein, C., Schlumpberger, B., Wittmann, D. & Moure, J.S . 2003. O gênero *Xylocopa* Latreille no Rio Grande do Sul, Brasil (Hymenoptera, Anthophoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**. **47**(1): 107-118.
- Schrottky, C. 1902. Ensaio sobre as abelhas solitárias do Brazil. **Revista do Museu Paulista**. **5**: 330-613
- Sheffield, C.S., Hebert, P.D.N., Kevan, P.G. & Packer, L. 2009 DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies. **Molecular Ecology Resources**. **9**(1): 196–207.
- Sigovini, M., Keppel, E & Tagliapietra D. 2016. Open nomenclature in the biodiversity era. **Methods in Ecology and Evolution**. **7**(10): 1217-1225.
- Silveira F.A., Melo, G.A.R. & Almeida, E.A.B. 2002. **Abelhas Brasileiras Sistemática e identificação**. Composição & Arte, Belo Horizonte.
- Simon, C., Frati, F., Becknbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**. **87**: 651-701.

- Smith, F. 1854. Catalogue of the hymenopterous insects in the collection of the British Museum, pt. 2, **Apidae**. 199-465.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**. **28**(10): 2731-2739.
- Tarrio, R., Rodriguez-Trelles, F., ayala, F.J., 2001. Shared nucleotide composition biases among species and their impact on phylogenetic reconstructions of the Drosophilidae. **Molecular Biology and Evolution**. **18**: 1464–1473.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**. **10**(4): 506-513.
- Watmough, R.H. 1974. Biology and behavior of carpenter bees in Southern Africa. **Journal of the Entomological Society of Southern Africa**. **37**: 261-281.
- Will, K.W., Mishler, B.D. & Wheeler, Q.D. 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. **Systematic Biology**. **54**:844-851.
- Williams, P.H. & Hernandez, L.M. 2000. **Distinguishing females of the bumble bees *Bombus ruderatus* (F.) from *Bombus hortorum* (L.)** in Britain: a preliminary application of quantitative techniques. In: Report to the UK biodiversity action plan bumblebee working group. The Natural History Museum, London.
- Williams, P.H., Brown, M.J.F., Carolan, J.C. *et al.* 2012 Unveiling cryptic species of the bumblebee subgenus *Bombus* s. str. worldwide with COI barcodes (Hymenoptera: Apidae). **Systematics and Biodiversity**. **10**: 21–56.
- Yamamoto, M., Oliveira, P.G. & Gaglianone, M.C. 2014. **Uso sustentável e restauração da diversidade dos polinizadores autóctones na agricultura e nos ecossistemas relacionados: planos de manejo**. Rio de Janeiro, Funbio.
- Zander, R.H. 2007. Paraphyly and the species concept, a reply to Ebach & al. **Taxon**. **56**: 642– 644.

FIGURES

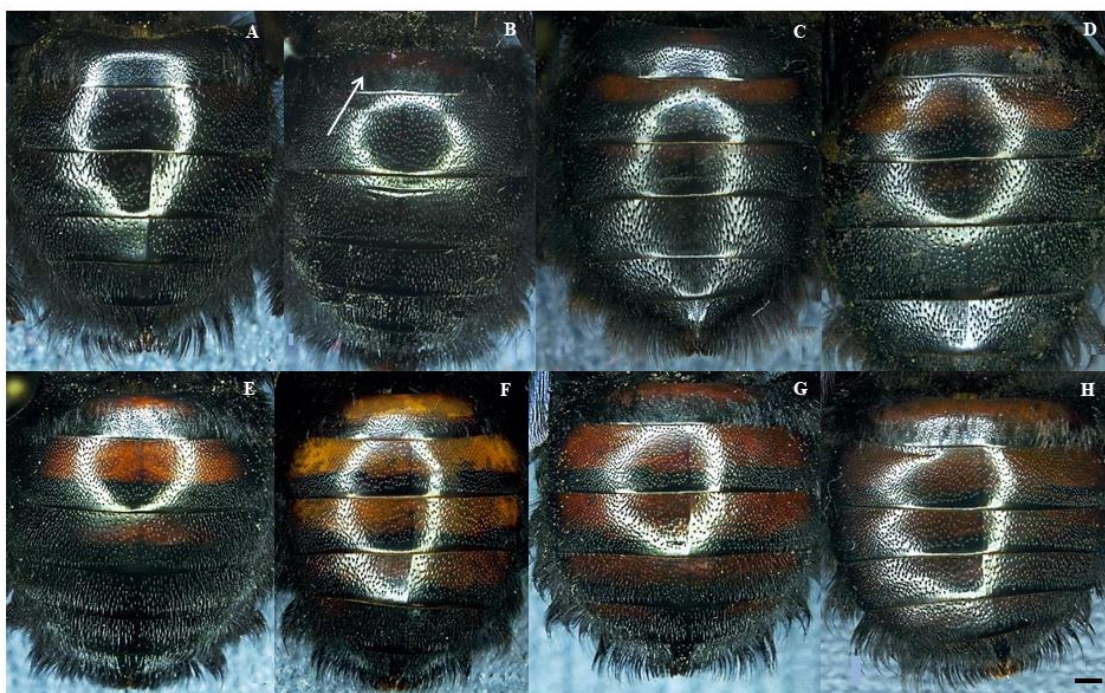


Figure 1. Variation in number of metasomal terga reddish bands present in *Xylocopa* forms, *nigrocincta* and *suspecta*. A: Metasomal terga entirely black. B: One band. C e D: Two bands, in which C have a little blot in T1 and entirely bands in T2 e T3. E: Three bands. F: Four bands. G: Five bands. H: Six bands. Scale bar: 1 mm.

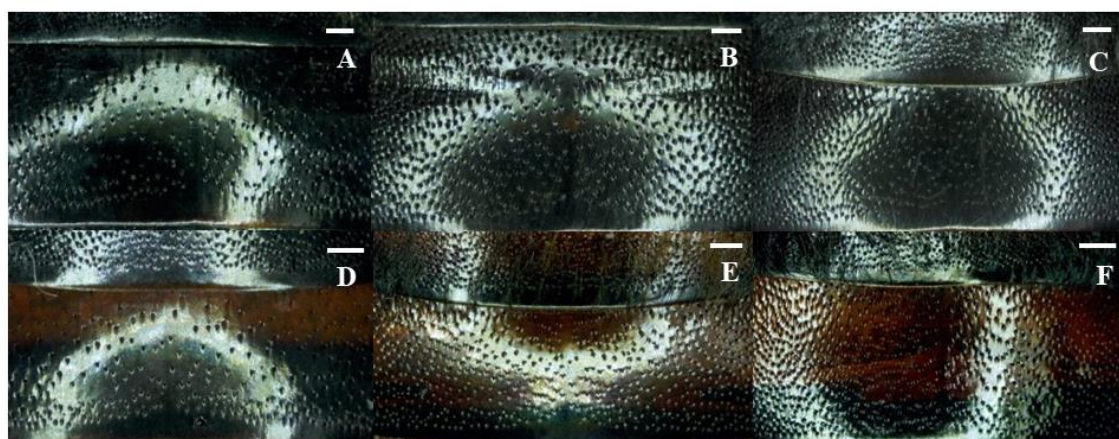


Figure 2. Variation in T2 metasomal punctuation on *nigrocincta* and *suspecta* forms. A and D: very sparse punctuation. B and E: sparse punctuation. C and F: Moderately dense punctuation. Scale bar: 1mm.



Figure 3. Pattern color variation of wings. A and B: *suspecta* morph. C: *nigrocincta* morph. Scale bar: 1cm.

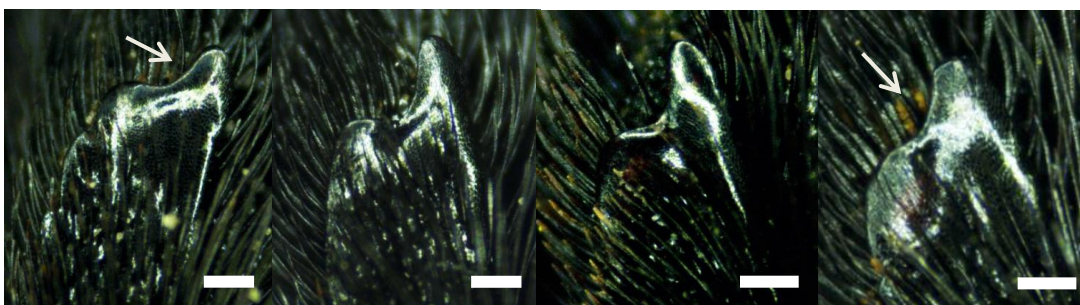


Figure 4. Variations in shape in the posterior and the anterior apical regions of the basitibial plate in *nigrocincta* and *suspecta* morphs. Scale bar: 1 mm.

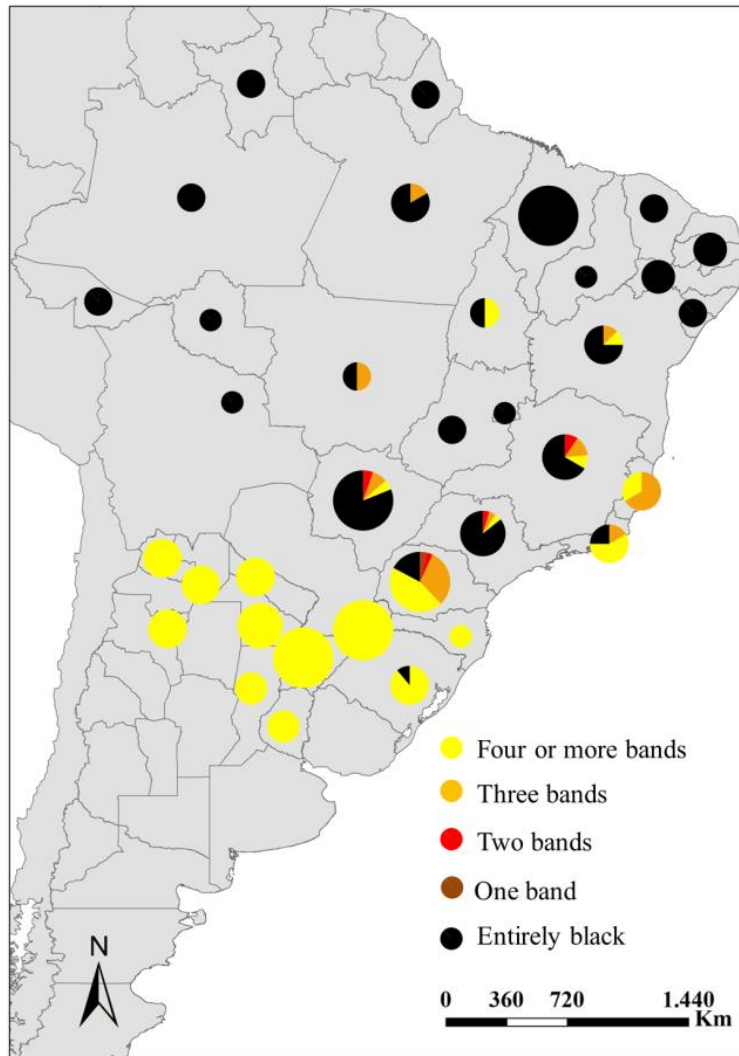


Figure 5. Morphological distribution based in number of T2 metasomal bands in *nigrocincta* and *suspecta* morphs into America do Sul, according to examined specimens, Moure & Camargo (1988), Schlindwein *et al.* (2003), Lucia *et al.* (2014) and Mawdsley (2018). The size of the circle represents the number of registered species in each state or province. The smallest circumference corresponds to one individual, the intermediaries 2 – 5, 6 -15, 16 – 25 and the biggest corresponds to 26 individuals or more. The division of colors in the circles correspond the patterns bands frequency observed.

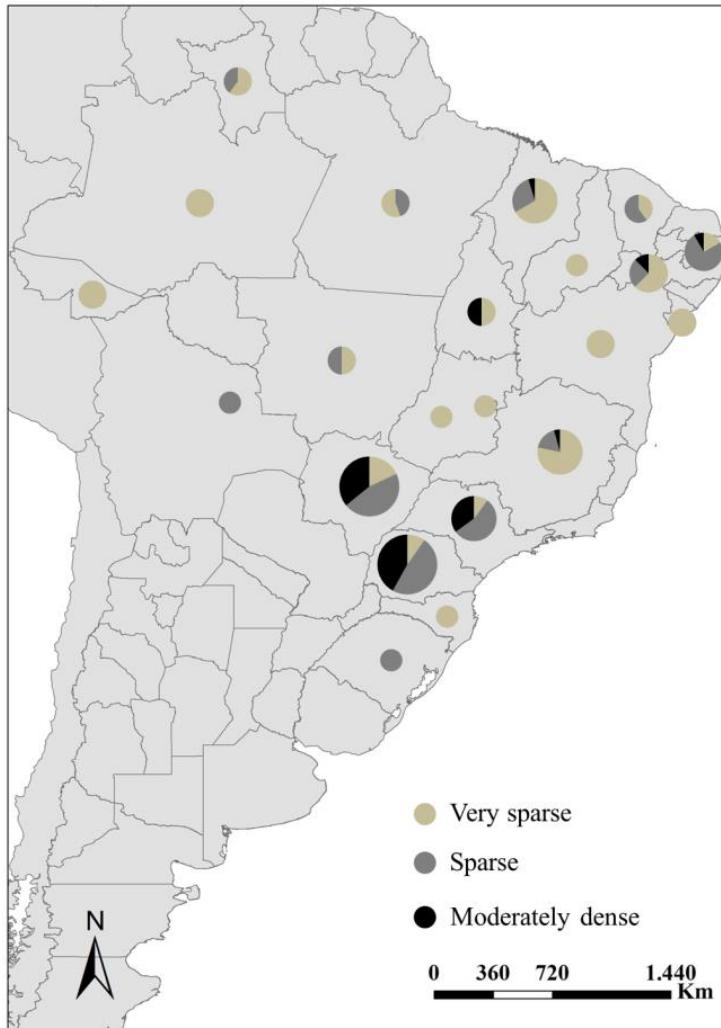


Figure 6. Morphological distribution based in T2 patterns punctuation in *nigrocineta* and *suspecta* forms. The size of the circle represents the number of registered species in each state or province. The smallest circumference corresponds to one individual, the intermediaries 2 – 5, 6 -15, 16 – 25 and the biggest corresponds to 26 individuals or more. The division of colors in the circles correspond the patterns bands frequency observed.

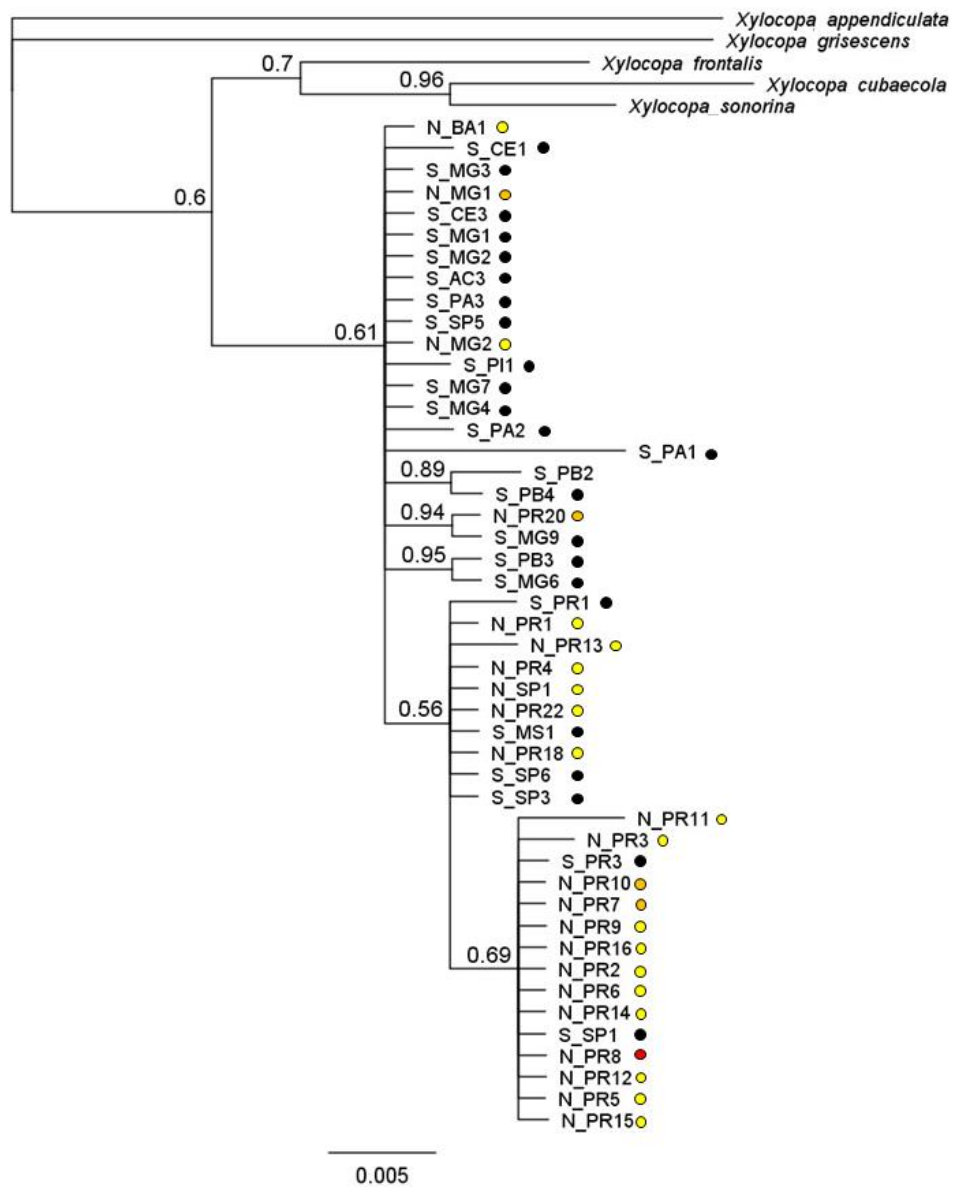


Figure 7. Consensus tree resulting from Bayesian analysis of molecular data from *COI* for the *nigrocincta* and *suspecta* morphs. Posterior probability support is indicated behind the *branches*. The circle color is based in a diagnose of the number of bands on the individuals. Black: entirely black. Red: two bands. Orange: three bands. Yellow: four or more bands.

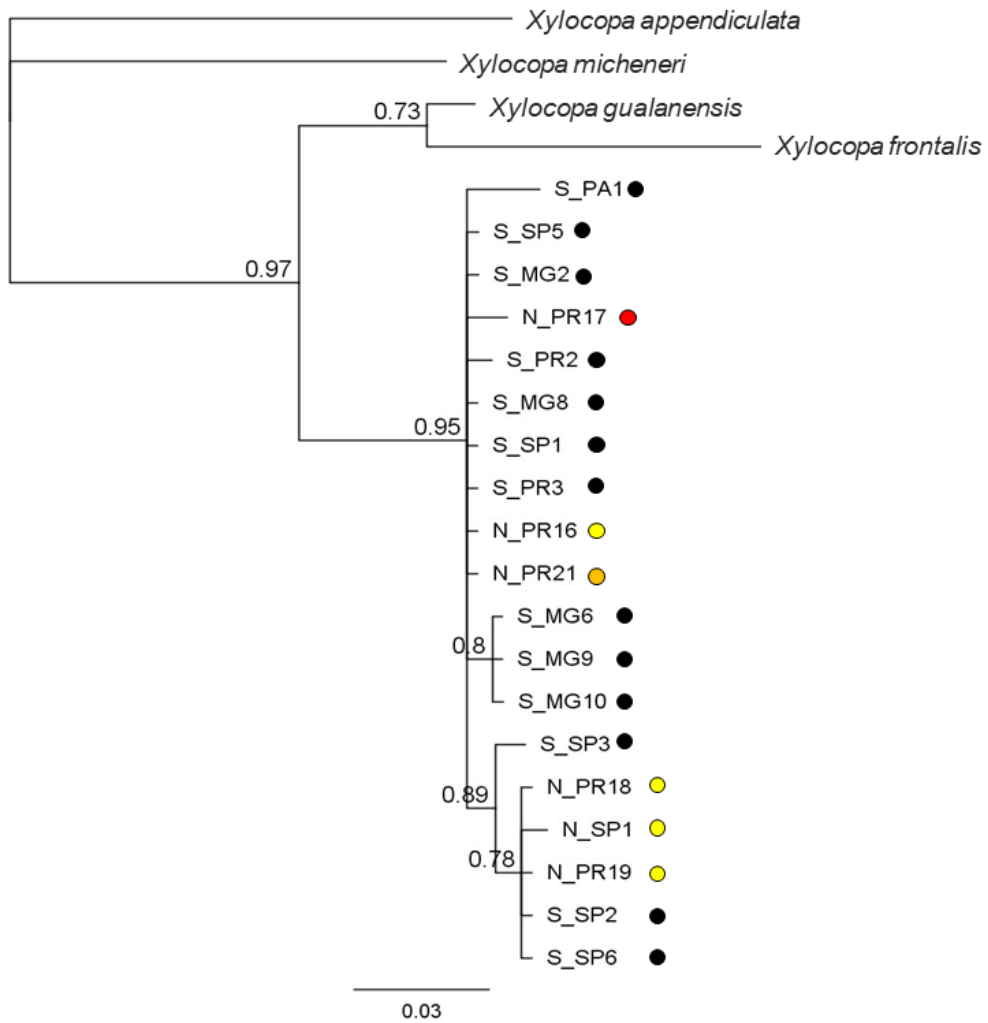


Figure 8. Consensus tree resulting from Bayesian analysis of molecular data from *CytB* for the *nigrocincta* and *suspecta* morphs. Posterior probability support is indicated behind the branches. The circle color is based in a diagnose of the number of bands on the individuals. Black: entirely black. Red: two bands. Orange: three bands. Yellow: four or more bands.

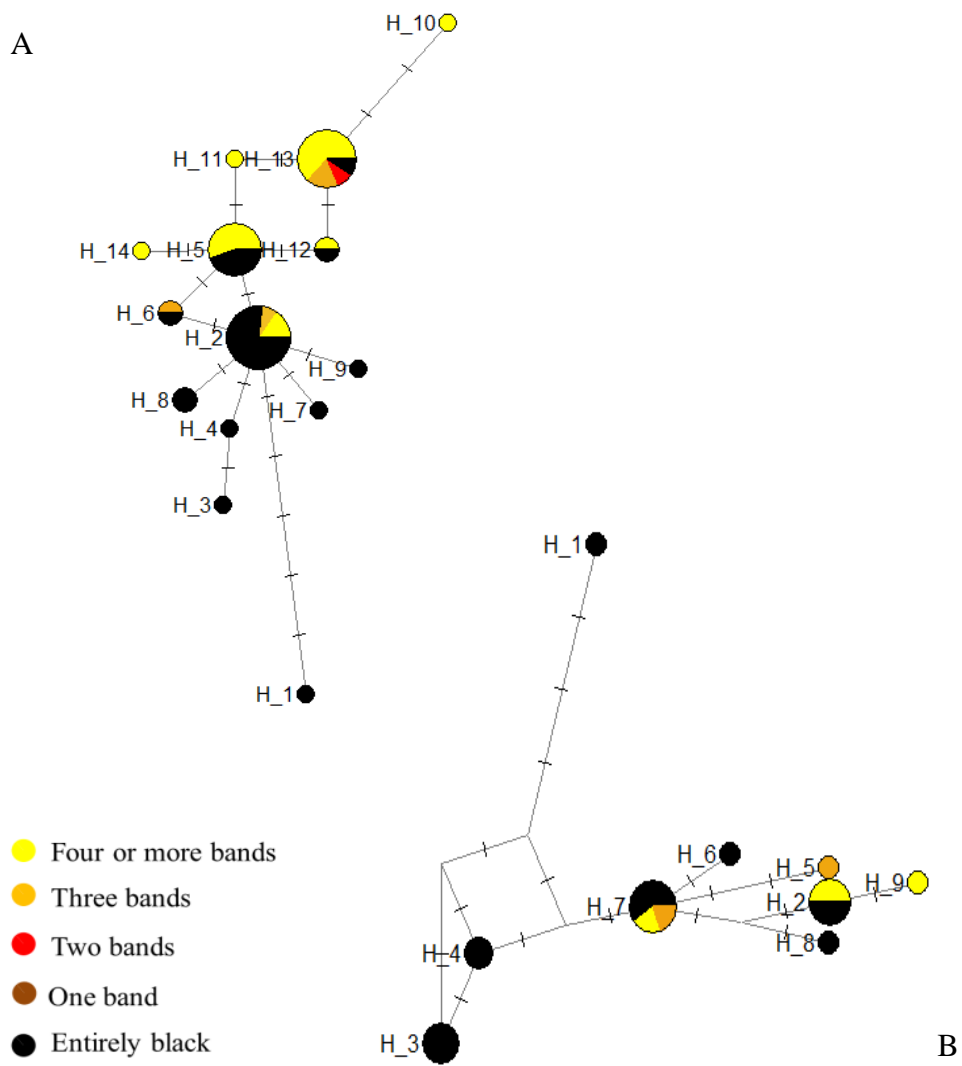


Figure 9. Haplotype network based in *COI* (A) and *CytB* (B) sequences regions.

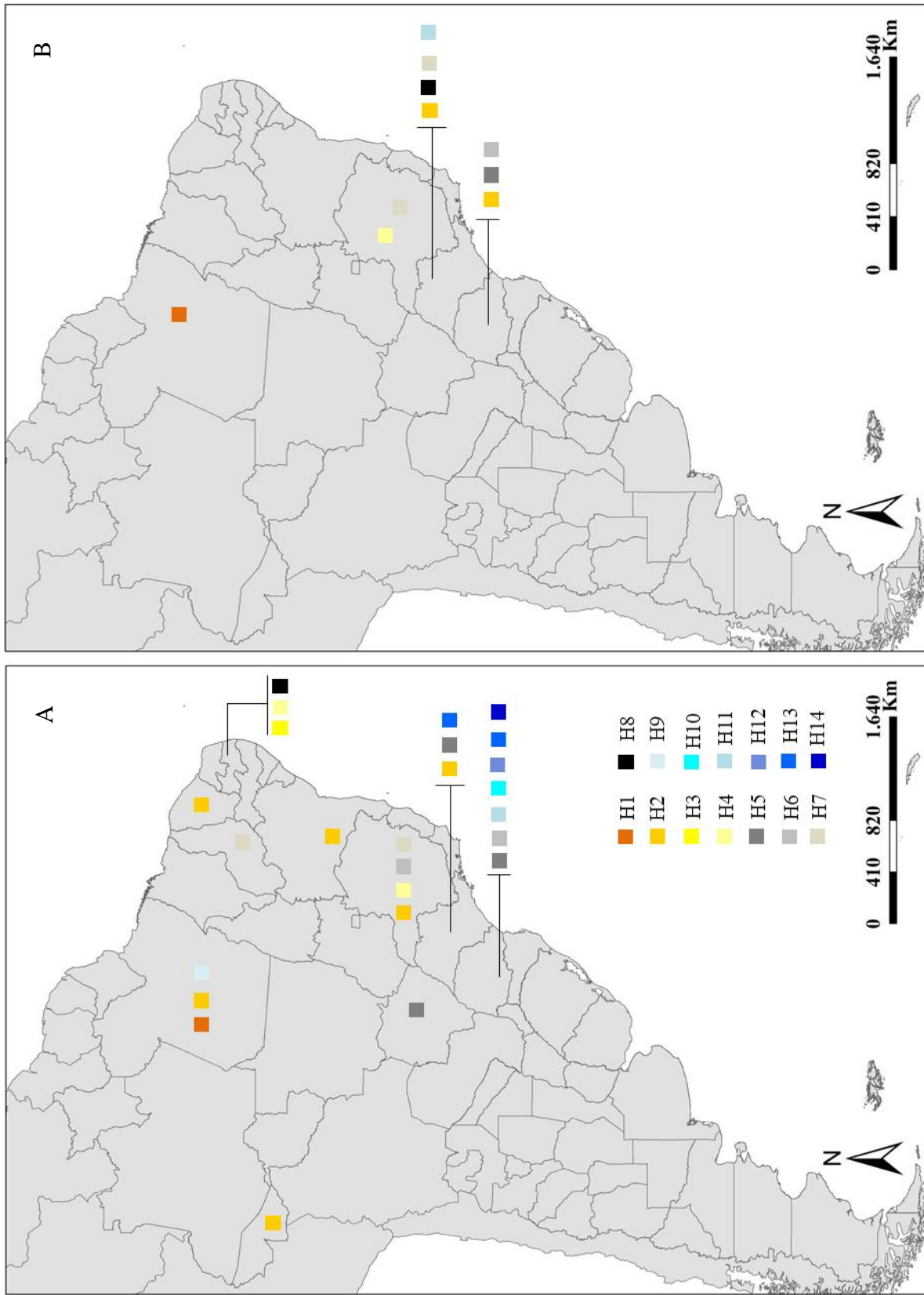


Figure 10. Map distribution to the network haplotypes. A: *COI* sequences. B: *Cyb* sequences. The distribution haplotypes color is based in latitude and longitude? The hottest colors represent north and northeast regions, the coldest colors represent the south region and the intermediaries colors represents southeast and midwest regions. .

Acknowledgments:

We are grateful to Marcio Oliveira (INPA), Orlando T. Silveira and Beatriz Coelho (MPEG), Kelly Ramos and Carlos Brandão (MZSP), Eduardo Almeida (RPSP), Mauro Ramalho and Maise Silva (UFBA), Maria Cristina Ganglione (UENF), Rogério Silvestre (UFGD), Fernando Silveira (UFMG), Gustavo Graciolli (UFMS), Luciana Ianuzzi (UFPE), Marcos Antônio de Lima Bragança (UFTO), Celso F. Martins (UFPB) to the loan of specimens. Special thanks are due to Carolina Minio, Luiz Roberto Faria, Hermes Schmitz, Elaine Soares and Luiz Henrique P. Garcia for the help with the enlightenment discussions to analyses, elucidation of several doubts and relevant contributions. We thank to UNILA for the master fellowship and aid provided.

ANEXO V – NORMAS PARA SUBMISSÃO NA APIDOLOGIE

APIDOLOGIE

Instructions to authors

Submission of a paper implies that it reports original unpublished work, that it has not been accepted and is not under consideration for publication elsewhere. All authors must have read and approved the manuscript.

Types of articles

The journal *Apidologie* publishes original articles, review articles, scientific notes, proceedings of scientific meetings, and extensive bibliographies in English. Original and review articles have an abstract in English and a general summary in German. Submission of a paper implies that it reports original unpublished work, that it has not been accepted and is not under consideration for publication elsewhere. All authors must have read and approved the manuscript.

A - Original articles: they should be no longer than ten pages as a rule, i.e. about 30 000 characters (spaces excluded), including tables and figures (see template for more information).

B - Review articles: Their length is limited to about 60 000 characters, spaces excluded. See template for more information but the usual division into 'materials and methods, results and discussion' may be replaced by a more adapted structure.

C - Proceedings of scientific meetings: Summaries of communications are limited to 1 700 characters, spaces excluded. They have no chapters, bibliographic references, tables nor acknowledgments and are published by prior arrangement with the Editorial Board.

D - Scientific notes: *Apidologie* publishes brief notes to report information and observation of preliminary nature 1) for which additional data cannot be easily obtained

or 2) which have an exceptional scientific interest. The length of such notes will be strictly restricted to two pages (about 5 500 characters, spaces excluded) and publication will depend on the availability of space in the journal and general interest to readers of *Apidologie*. This form is intended to augment scientific communication and is by no means for articles that are not of sufficient rigor to be published as full papers. All submissions must include 'scientific note' in the title. Only the title is translated into French and German.

E- Extensive bibliographies: A two page synopsis or introduction is published in the printed version, the bibliography itself being available online only. Before preparation and submission of such bibliographies, authors are advised to contact the Editorial office. References are published in HTML format in addition to PDF format.

Submission of manuscripts

Manuscripts should be submitted via the Manuscript Management System (MMS) at: <https://mms-inra.edpsciences.org/is/apido/>. Please follow the instructions displayed on the screen after accessing the website. To register your submission, you need to enter your author identifier (ID). This is a unique and confidential number that is attributed to you upon your first submission to *Apidologie*. If you publish regularly with us, please note your author ID for future reference. Manuscripts should comply with the Instructions (http://www.apidologie.org/doc_journal/instructions/apido_instructions.pdf) and be submitted as a unique PDF file containing text, references, tables and figures (RTF or Word files can be also accepted if need be). The file should be labelled with the corresponding author's name, for example: Martin-2007-apido.pdf. The manuscript should be typed in Times (12) double-spaced with margins of 3 cm at

top, bottom and sides for editor's markings. Lines and pages should be numbered. Use italics only for latin names of organisms The Editorial board requests that authors whose native language is not English have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. The Editorial Board maintains the option of returning, before evaluation, manuscripts which do not meet the instructions and/or acceptable standards of English.

Upon acceptance, the format required for text and tables is RTF or Word and for figures TIFF or EPS. Upload it through MMS at <https://mms-inra.edpsciences.org/is/apido>.

Peer review process

All manuscripts are examined initially by Apidologie scientific editors for their appropriateness to the journal. Those which do not match the scope of Apidologie or are of insufficient general interest are sent back promptly to their authors. Other manuscripts are sent to a minimum of two experts chosen by the handling editor. Reviewers are invited to present their comments and/or suggestions within 4 weeks after reception of the manuscript. Reviewers' comments are sent to the authors without their names to remain anonymous. Final acceptance is a decision of the handling editor and is based on the reviewers' reports and the editorial board advice. In case of revision, the authors must indicate in which ways the comments and suggestions were taken into account or why they were not taken into account. The corrected version should be returned to the handling editor within 3 months after the decision has been made. After this delay, it will be considered as a new manuscript. Depending on the handling editor's decision, revised manuscripts may be sent out to reviewers a second time.

Electronic-only material

Electronic-only material is designed to provide supplementary information that is either too voluminous for printing or that is designed specifically for the Web, such as illustration in colour. Electronic-only material may include but is not restricted to: (Large) tables; Appendices; Programmes; Images; Videos. This option should be used whenever possible to reduce the length of the printed papers. Electronic-only material must be submitted together with the body of the manuscript for evaluation. For more information on the submission of this material (file requirements, etc.), please contact the production office at: anglezio@edpsciences.org.

Open access option

To favour a broad and easy access to all published scientific information, **Apidologie** and its publisher EDP Sciences uses a service called **Open Access Option (OAO)**. It offers the possibility for authors to make their papers freely available to all interested readers (subscribers or non subscribers) as soon as the articles are published online. Otherwise, the policy of the journal is to have all articles made freely accessible 18 months after the print date. Authors who are interested in OAO should fill out the form that is sent with the proofs and return it with the corrected proofs. Authors (or their institution) should make a contribution, Price (550 d in 2008) covers only a fraction of the editing costs.

Proofs and reprints

Proofs will be sent by electronic mail to the author for correspondence indicated on the title page. They should be carefully corrected and returned to the publisher within 48 h of reception. If this period is exceeded, the galleys will be proofed only by the editorial staff of the publishing house and printed without the authors' corrections. Should substantial changes in the original manuscript be requested (other than typographical errors), they will be made at the author's expense. The PDF file is provided free of charge to the corresponding author. An order form for reprints – and, if required, for the publication of colour figures – will accompany the proofs.

Copyright

The author returns the signed transfer of copyright and publishing agreement form with the corrected proofs. Authors are allowed to make their articles available on personal sites, or their institution's website and Open Archive Initiative sites, provided the source of the published article is cited and the ownership of the copyright clearly mentioned. These sites must be non-profit sites. Reprint and postprint may be used (with the publisher's PDF). Authors are requested to create a link to the published article in the publisher's internet service. The link must be accompanied by the following text "The original publication is available at www.apidologie.org/. Requests for reproduction should be sent to the publisher: EDP Sciences 17, avenue du Hoggar P.A. de Courtaboeuf, BP 112 91944 Les Ulis Cedex A (France) edps@edpsciences.org.

Template for Apidologie

The manuscript should be typed in Times 12 double-spaced with margins of at least 3 cm at the top, bottom and sides for editor's markings. Lines and pages should be numbered.

Title

Authors: Forenames (in full) and SURNAMES of each author* Address of all authors
Email of all authors *Corresponding author: this author being identified by an asterisk:
detailed postal address, phone and fax numbers Short Title: no more than 45 characters,
including spaces. The manuscript should be arranged as follows: title page, abstract and
keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgments,
general summary (to be translated into German), references, figure captions, tables,
figures. Tables and figures, with their captions, should not appear in the text, but be
placed together on separate sheets at the end of the manuscript. Abbreviations should be
punctuated. Uppercase letters should be accentuated, small capital should not be used.

Abstract

The abstract (no more than 850 characters, spaces excluded) should be in a form suitable
for abstracting services. It should contain no paragraphs, footnotes, references,
crossreferences to figures and tables and undefined abbreviations.

Keywords

Up to five keywords should be supplied, they may be taken from the title, abstract or text.
The plural form and uppercase letters should be avoided. Keywords should be written in
bold lowercase letters, separated by slashes.

1.Introduction

Section headings should be numbered following the international numbering system
(1.,1.1., 1.1.1., etc.).

2.Materials

and

Methods

3.Results

4.Discussion

Acknowledgements

General summary (for translation into German)

This summary (10% of the length of the article, excluding abstract and references, but not to exceed 2500 characters, spaces excluded) is intended for a general audience and should be written in non-technical language. It should mention the aim of the study, place it in the scientific context, provide brief information about methods and sufficient information on results (with reference to the tables and figures), and lastly the discussion and conclusion. It should be written in English and will be translated into German by the editorial office.

References

In the text, refer to author(s) name(s) and year of publication. When there are more than two authors, give the first author's name followed by et al. References cited together in the text should be arranged chronologically. Ex.: (Smith, 1979, 1980; Anderson and Smith, 1982a; Anderson *et al.*, 1985). In the reference list, the references should appear in alphabetical order. If there is more than one author, the order is as follows: publications of a single author in chronological order; publications of the same author with one co-author in chronological order; publications of the author with more than one co-author in chronological order. Proceedings of articles submitted for publication, unpublished data, personal communications should not appear in the reference list but should be cited in the text as "unpubl. data". All entries in the reference list must correspond to references in the text and vice versa. The titles of journals should be abbreviated according to the rules

of Biosciences Information Service (Biosis) or those of the Listed'abréviations de mots des titres de publications en série (conforming to ISO 4, Centre international de ISSN, Paris). Words for which no abbreviation is given should be written in full. Examples are given below of the layout and punctuation to be used in the references: Article: Anderson D.L., Trueman J.W.H. (2000) *Varroa jacobsoni* (Acari:Varroidae) is more than one species, *Exp. Appl. Acarol.* 24, 165–189.

Book: Ruttner F. (1988) *Biogeography and taxonomy of honeybees*, Springer Verlag, Berlin. Chapter in a book: Southwick E.E. (1993) *Biology and social physiology of the honey bee*, in: Graham J.M. (Ed.), *The hive and the honey bee*, Dadant and Sons, Hamilton, Illinois, pp. 171–196. Electronic material: Bogdanov S. (1999) *Water content: comparison of refractometric methods with the Karl Fisher method*, *Annu. Meet. Int. Honey Comm. Dijon*, [online] (accessed on 16 August 2004). For all other kinds of documents, please contact the managing editor (apidologie@sophia.inra.fr).

Figures and Tables

Illustrations should be numbered in Arabic numerals for figures and Roman numerals for tables, and should be referred to in the text by their number: Fig. 1, Tab. I. Lettering (symbols, numbers, etc., preferably in Arial font,) should not differ from figure to figure and should be of sufficient size to remain legible after reduction (letters 1–2 mm high after reduction to either one (6.5 cm) or two column (13.5 cm) format). Figures should be presented in the form of drawings on drawing or tracing paper or as sharp glossy prints. Half-tones should contain good contrast and should be originals (i.e. not already reproduced); line drawings should have a white background. Photographs should be presented in the form of plates to be reproduced without reduction (maximum size 13.5 x

20 cm). The lettering should not be placed any closer to the edges than 1 cm. The figure captions should be explicit so that the illustrations are comprehensible without reference to the text. In the paper version of the journal, figures are in black and white (for colour, authors should make a contribution, prices on request), but they appear in colour in the electronic version. Tables should not exceed 84 characters per line (140 if in landscape format). The title of each table should be written above the corresponding table. Figures and tables published elsewhere cannot be accepted without the prior consent of the publisher and the author(s).