



WELLINGTON DONIZET FERREIRA

**UMA ABORDAGEM INTEGRATIVA PARA A
DELIMITAÇÃO DAS ESPÉCIES *PACHYMENES ATER* DE
SAUSSURE E *PACHYMENES GHILIANII* (SPINOLA)
(HYMENOPTERA, VESPIDAE, EUMENINAE)**

**LAVRAS – MG
2018**

WELLINGTON DONIZET FERREIRA

**UMA ABORDAGEM INTEGRATIVA PARA A DELIMITAÇÃO DAS ESPÉCIES
PACHYMENES ATER DE SAUSSURE E *PACHYMENES GHILIANII* (SPINOLA)
(HYMENOPTERA, VESPIDAE, EUMENINAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, área de concentração em Entomologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador
Dr. Marcel Gustavo Hermes
Co-orientador
Dr. Rodolpho S. T. Menezes

**LAVRAS – MG
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Ferreira, Wellington Donizet.

Uma abordagem integrativa para a delimitação das espécies
Pachymenes ater de Saussure e *Pachymenes ghiliani* (Spinola)
(Hymenoptera, Vespidae, Eumeninae) / Wellington Donizet
Ferreira. - 2018.

90 p. : il.

Orientador(a): Marcel Gustavo Hermes.

Coorientador(a): Rodolpho S. T. Menezes.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Sistemática. 2. Estudos filogenéticos. 3. Eumeninae. I.
Hermes, Marcel Gustavo. II. Menezes, Rodolpho S. T.. III. Título.

WELLINGTON DONIZET FERREIRA

**UMA ABORDAGEM INTEGRATIVA PARA A DELIMITAÇÃO DAS ESPÉCIES
PACHYMENES ATER DE SAUSSURE E *PACHYMENES GHILIANII* (SPINOLA)
(HYMENOPTERA, VESPIDAE, EUMENINAE)**

**AN INTEGRATIVE APPROACH FOR THE DELIMITATION OF THE SPECIES
PACHYMENES ATER DE SAUSSURE AND *PACHYMENES GHILIANII* (SPINOLA)
(HYMENOPTERA, VESPIDAE, EUMENINAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, área de concentração em Entomologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de fevereiro de 2017.

Dr. Marcel Gustavo Hermes – UFLA

Dra. Mírian Nunes Morales – UFLA

Dra. Kirstern Lica Follmann Haseyama – UFMG



Prof. Dr. Marcel Gustavo Hermes

Orientador

LAVRAS-MG

2018

RESUMO

Taxonomia integrativa é uma abordagem em que diferentes fontes de evidência são utilizadas para buscar solucionar problemas taxonômicos, incluindo a delimitação de espécies. Neste estudo foram utilizados os princípios dessa abordagem para estabelecer os limites específicos de duas espécies de vespas solitárias (Hymenoptera, Vespidae, Eumeninae): *Pachymenes ater* de Saussure e *Pachymenes ghiliani* (Spinola). A distribuição geográfica dessas duas espécies, que apresenta algum nível de sobreposição, foi utilizada para estimação de componentes do nicho ecológico (variáveis climáticas). Um estudo molecular, utilizando sequências de genes mitocondriais de DNA *barcoding* (COI e COII), foi realizado buscando testar a monofilia recíproca entre *P. ater* e *P. ghiliani*. Foi realizada a reavaliação de caracteres morfológicos discretos já estabelecidos para as duas espécies, além de estudos morfométricos explorando caracteres morfológicos contínuos. Através de 19 variáveis ecológicas não foi possível estabelecer os limites entre essas duas espécies havendo provável sobreposição de componentes do nicho ecológico. A monofilia recíproca entre *P. ater* e *P. ghiliani* foi recuperada para as sequências de COI, COII e em uma análise com os dados concatenados utilizado parcimônia, máxima verossimilhança e inferência bayesiana. As principais diferenças morfológicas entre *P. ater* e *P. ghiliani* estão relacionadas a caracteres que podem ser observados em machos, em especial, da genitália masculina e clípeo. Fêmeas das duas espécies podem ser distinguidas a partir de diferenças na extensão da carena pronotal. Caracteres morfológicos contínuos não foram suficientemente informativos para a distinção prática entre as duas espécies. A partir dos caracteres morfológicos fixados e da monofilia recíproca reconhecemos *P. ater* e *P. ghiliani* como espécies distintas.

Palavras-chave: filogenia; taxonomia; vespas solitárias.

ABSTRACT

Integrative taxonomy is an approach in which different sources of evidence are used to solve taxonomic problems, including species delimitation. In this study, the principles of this approach were used to establish the specific limits of two species of solitary wasps (Hymenoptera, Vespidae, Eumeninae): *Pachymenes ater* de Saussure and *Pachymenes ghiliani* (Spinola). The geographic distribution of these two species, which overlaps for some extent, was used to estimate components of the ecological niche (climatic variables). A molecular study using sequences of mitochondrial DNA barcoding genes (COI and COII) was performed to test the reciprocal monophyly between *P. ater* and *P. ghiliani*. The reevaluation of discrete morphological characters already established for both species was performed, as well as morphometric studies exploring continuous morphological characters. From 19 ecological variables it was not possible to establish the boundaries between these two species, with possible overlap of components of the ecological niche. The reciprocal monophyly between *P. ater* and *P. ghiliani* was recovered for the COI and COII sequences, using parsimony, maximum likelihood and Bayesian inference. The main morphological differences between *P. ater* and *P. ghiliani* are related to characters that can be observed in males, especially the genitalia and clypeus. Females of both species can be distinguished from differences in the extent of the pronotal carina. Continuous morphological characters were not informative enough for the practical distinction between the two species. From the fixed morphological characters and the reciprocal monophyly we recognize *P. ater* and *P. ghiliani* as distinct species.

Keywords: phylogeny; taxonomy; solitary wasps.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1 Problema espécie	9
2.2 Taxonomia integrativa: princípios e métodos	10
2.3 Hymenoptera, Vespidae, Eumeninae	12
2.4 Modelos de estudo	16
2.5 Conceito de espécie e hipóteses	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Amostragem	21
3.2 Distribuições geográficas, coloração do tegumento e PCA ecológica	23
3.3 Estudos moleculares	24
3.4 Reavaliação de caracteres morfológicos	27
3.5 Estudos morfométricos	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Distribuições geográficas, coloração do tegumento e PCA ecológica	31
4.2 Estudos moleculares	38
4.2.1 Procedimentos laboratoriais	38
4.2.2 Matrizes de dados e modelos de substituição	40
4.2.3 Análises filogenéticas	41
4.3 Reavaliação dos caracteres morfológicos	55
4.4 Estudos morfométricos	63
4.5 Integração dos dados	73
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXO A – Espécimes utilizados nos estudos moleculares	84
ANEXO B – Espécimes examinados nos estudos morfológicos	85

1 INTRODUÇÃO

Delimitar espécies tornou-se uma das grandes tarefas da taxonomia contemporânea. Além de nomearem as entidades que entendem como “espécies”, os taxonomistas buscam por evidências que podem nos fornecer pistas da realidade dessas entidades como linhagens evoluindo independentemente. Tradicionalmente essas pistas partiam da morfologia externa do corpo e pouco a pouco foram se estendendo para fontes mais diversas de dados, seja o comportamento, o nicho ecológico, estratégias reprodutivas, ou o material genético dos organismos em estudo. Qualquer uma dessas fontes de evidência teria influência nas decisões sobre reconhecer uma entidade biológica como uma espécie distinta da outra.

Denominamos taxonomia integrativa a abordagem em que diferentes linhas de evidência são utilizadas para delimitarmos as entidades que reconhecemos como espécies. Essa abordagem vem sendo aplicada nos mais diferentes grupos de organismos, como plantas, animais ou mesmo bactérias. Taxonomistas têm trabalhado no sentido de cada vez mais tornarem o reconhecimento de uma determinada espécie como bem suportado.

Obviamente o grupo com maior riqueza de espécies descrita, os insetos, sofreu influência desse novo paradigma taxonômico. Alguns besouros, borboletas, moscas e abelhas já foram investigados em uma abordagem integrativa. Todavia é interessante que essa abordagem também chegue a grupos pouco visitados e negligenciados historicamente. Dentre esses grupos, podemos citar as vespas solitárias construtoras de ninhos de barro, os Eumeninae (Vespidae, Hymenoptera). Mesmo que trabalhos voltados para a taxonomia e filogenia dessas vespas estejam se expandindo ainda existe uma necessidade de estudos mais amplos, explorando uma maior variedade de tipos de dados.

Nesse sentido, este trabalho surge como uma oportunidade de se aplicar os princípios da taxonomia integrativa utilizando como organismos modelo duas espécies de vespas solitárias da subfamília Eumeninae. Optou-se trabalhar com as espécies *Pachymenes ater* de Saussure e *Pachymenes ghiliani* (Spinola) que devido as suas distribuições geográficas, proximidade filogenética e caracteres morfológicos de difícil observação despontam como um bom estudo de caso em que a teoria e os métodos da taxonomia integrativa se aplicam.

Nesse estudo foram utilizados dados da distribuição geográfica, estimação do nicho ecológico, caracteres morfológicos discretos e contínuos, e sequências de genes mitocondriais para, por meio de uma variada fonte de evidências, estabelecer os limites entre *P. ater* e *P. ghiliani*. Este trabalho surge como uma oportunidade de se explorar variadas abordagens que auxiliam na delimitação e reconhecimento das entidades fundamentais para a sistemática: as

espécies; sendo um estudo que abre perspectivas para que novos conjuntos de caracteres sejam utilizados na taxonomia dos Eumeninae.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Problema espécie

Espécies são entidades biológicas fundamentais comparadas a genes, células e organismos (MAYR, 1982; DE QUEIROZ, 1998; 1999; 2005a; 2005b; 2005c; 2007; WHEELER; MEIER, 2000; WILEY; LIEBERMAN, 2011). Representam a base para o sistema de referência taxonômico, uma vez que estão associadas a nomes científicos utilizados em estudos de diferentes áreas, incluindo a biologia da conservação (AGAPOW et al., 2004; FRANKHAM et al., 2012) e a sistemática filogenética (CRACRAFT, 2000; WHEELER, 2004; DE QUEIROZ, 2005a). Apesar da centralidade da espécie para o pensamento biológico, a conceitualização do que são (DE QUEIROZ, 1998; 1999; WHEELER; MEIER, 2000; HEY, 2001; 2006; MALLET, 2005; HAUSDORF, 2011; WILKINS, 2011; ZACHOS, 2016b) e como podem ser delimitadas as espécies (SITES; MARSHALL, 2004; DE QUEIROZ, 2007; WIENS, 2007; PADIAL et al., 2010; FUJITA et al., 2012) são ainda duas das questões mais (re)visitadas pelos estudiosos da área.

As discussões relativas à natureza das espécies permeiam a validade delas enquanto hipóteses (FITZHUG, 2005; PANTE et al., 2015), categorias/classes (HEY, 2001; BAUM, 2009) ou indivíduos (WILEY; LIEBERMAN, 2011); a suposta distinção entre conceitos e critérios (DE QUEIROZ, 1998; 1999; 2005a; 2005b; 2005c; 2007; HEY, 2006; para um argumento oposto: HAUSDORF, 2011); e a aplicabilidade de conceitos/critérios em decisões taxonômicas (DE QUEIROZ, 2007; PADIAL et al., 2010; ZACHOS, 2016a). Desse modo, o “problema espécie” se estabelece não só no campo teórico, mas em muitos dos desafios que a taxonomia enfrenta na prática (CRACRAFT, 2000).

Se por um lado taxonomistas devem seguir um rigor empírico para estabelecer espécies e manter a estabilidade de seus nomes, por outro há uma demanda acelerada para descrição de novas espécies em virtude da crise da biodiversidade (AGAPOW et al., 2004; PADIAL et al., 2010; PANTE; SCHOELINK; PULLANDRE, 2015). Além disso, a chamada revolução molecular, especialmente o surgimento e a popularização das técnicas de DNA *barcoding* (HERBERT et al., 2003), tem revolucionado a taxonomia apontando para novos

caminhos teóricos e metodológicos neste campo (CARVALHO, 2007; CARVALHO, 2008; WHEELER, 2008).

A questão da descrição e reconhecimento de espécies tem sido debatida de forma acalorada por defensores de uma prática taxonômica mais autônoma e livre (CARVALHO et al. 2008; RAPOSO et al., 2017) e por aqueles que pensam que a taxonomia deveria ser regulada por normas mais rigorosas, e por instâncias externas a essa ciência (EVENHUIS, 2007; GARNETT; CHRISTIDIS; 2017). Os debates correntes tornam o campo frutífero para o levantamento de questionamentos inéditos e a busca por caminhos diferentes para se trabalhar com problemas taxonômicos (WHEELER, 2008).

Uma das respostas aos problemas quantitativos (quantas espécies existem?) e qualitativos (o que são as espécies?) que afetam a taxonomia foi a emergência de uma proposta que inclui no trabalho taxonômico a integração de dados de diferentes fontes (SCHILICK-STEINER et al., 2010; PADIAL et al., 2010; YEATES et al., 2011). Essa abordagem integrada, nomeada de taxonomia integrativa (DAYRAT, 2005; WILL et al., 2005), apresenta-se como uma ferramenta poderosa para testar hipóteses de espécies à luz de múltiplas linhas de evidência.

2.2 Taxonomia integrativa: princípios e métodos

O termo taxonomia integrativa foi cunhado, de modo independente, no mesmo ano, por diferentes autores (DAYRAT, 2005; WILL et al., 2005). Apesar das discordâncias na aplicação e intenção na proposição do termo (PADIAL et al., 2010; YEATES et al., 2011), ambos os trabalhos apontaram para uma prática taxonômica que utiliza vários caracteres, incluindo “sequências de DNA e muitos outros tipos de dados (p. ex., dados morfológicos, comportamentais e ecológicos) para delimitar, descobrir, e identificar espécies” (WILL et al., 2005, p. 844).

Desse modo, a taxonomia integrativa propõe o uso de diferentes fontes de evidência para delimitar espécies de um modo mais acurado (DAYRAT, 2005; WILL et al., 2005; SCHILICK-STEINER et al., 2010; YEATES et al., 2011). O estudo da biodiversidade, assim, é compreendido por “perspectivas múltiplas e complementares” (DAYRAT, 2005), integrando os métodos e evidências disponíveis para responder a diferentes tipos de questões relativas a natureza das espécies.

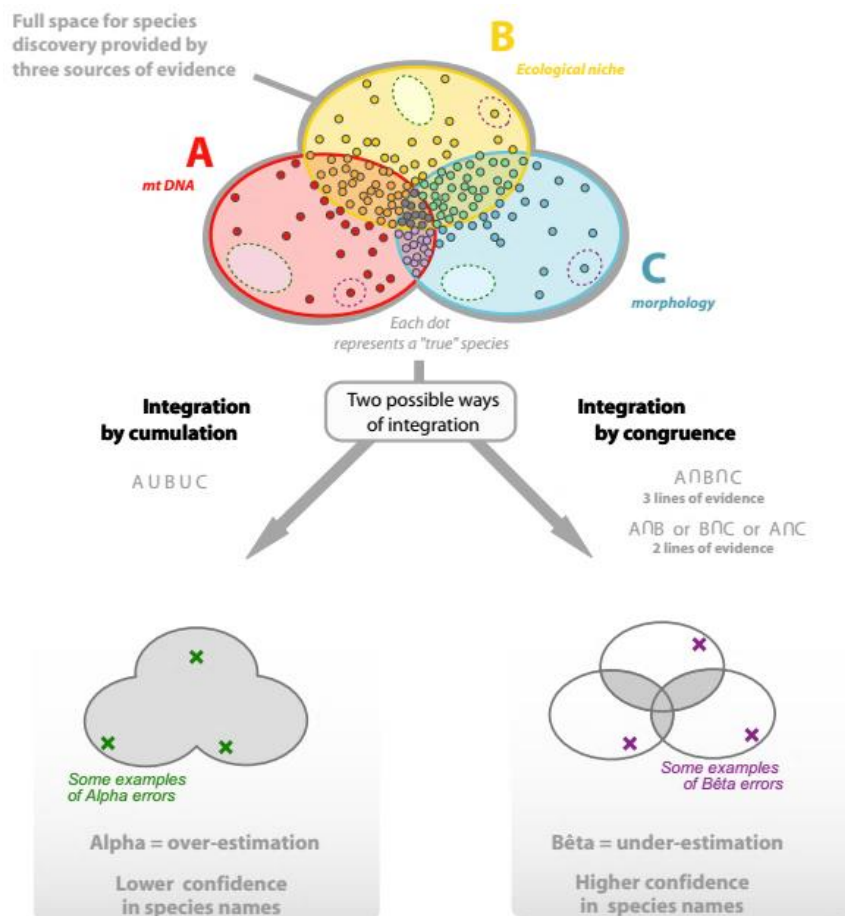
A partir de 2005, uma série de trabalhos foi publicada valendo-se do termo “taxonomia integrativa” – em que mais de uma fonte de evidência (no geral, dados

moleculares e morfológicos) foram utilizados para solucionar problemas taxonômicos (YEATES et al., 2011, p. 212; PANTE; SCHOELINCK; PULLANDRE, 2015, p. 156). 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).

Padial et al. (2010), distinguiram dois modelos de se proceder, tomando por base a integração de diferentes linhas de evidência (ver FIGURA 1):

- taxonomia integrativa por congruência, em que a concordância entre diferentes fontes de dados é desejada para a delimitação de uma espécie (PADIAL et al., 2010);
- taxonomia integrativa por acumulação, em que a divergência em qualquer tipo de caráter pode ser tomada como evidência para estabelecer espécies possivelmente distintas (PADIAL et al., 2010).

Figura 1 – Fluxograma representando as principais abordagens da taxonomia integrativa propostas por Padial et al. (2010).



Fonte: Padial et al. (2010).

Ambas as abordagens da taxonomia integrativa podem ser aplicadas, todavia incorrem no risco de superestimação (erro alfa – para taxonomia integrativa por acumulação) ou de subestimação (erro beta – para taxonomia integrativa por congruência) (PADIAL et al., 2010).

Além disso, o próprio estabelecimento das evidências para a delimitação de espécies é problemática. Enquanto que para dados moleculares é possível obter um nível de confiança estatístico para se testar hipóteses de espécie, isso não ocorre para dados morfológicos, em que nem mesmo uma amostragem muito grande é capaz de comprovar com confiança a fixação de caracteres morfológicos diagnósticos em uma dada espécie (WEINS, 2007).

Independente das dificuldades relacionadas a esse novo campo de estudo, é cada vez mais recorrente o uso de abordagens integrativas na taxonomia. Isso se mostra válido principalmente para grandes grupos, tais como os vertebrados, as embriófitas e os Hexapoda. Dentro deste último táxon, trabalhos com a ordem Hymenoptera representam quase 1/5 das pesquisas relacionadas à taxonomia integrativa (PANTE; SCHOELINCK; PULLANDRE, 2015). Apesar disso, algumas grandes linhagens de himenópteros, como os vespídeos, ainda carecem de pesquisas voltadas para uma análise mais ampla de diferentes tipos de dados.

2.3 Hymenoptera, Vespidae, Eumeninae

A ordem Hymenoptera, popularmente conhecida pelas abelhas, formigas e marimbondos, compreende uma riqueza de mais de 150000 espécies descritas (GRIMALDI; ENGEL, 2005; SHARKEY, 2007; AGUIAR et al., 2013). Representa uma linhagem irmã de todos os outros insetos holometábolos com uma história evolutiva de mais de 300 milhões de anos (MISOF et al., 2014; PETERS et al., 2017). A diversificação dos Hymenoptera conta com eventos-chave como o surgimento do parasitoidismo, da eussocialidade e da interação mutualística com angiospermas por meio da polinização (CARDINAL; DANFORTH, 2013; BANK et al., 2017; BRANSTETTER et al., 2017; PETERS et al., 2017). Além disso, esses insetos têm importância econômica relevante, seja como agentes de controle biológico ou como pragas na agricultura (GULAN; CRANSTON, 2014; ZHANG; RIDENBAUH; SHARANOWSKI, 2017).

As filogenias baseadas em dados genômicos estão mudando nossa compreensão sobre as relações de parentesco entre as principais linhagens de Hymenoptera (JOHNSON et al., 2013; BRANSTETTER et al., 2017; PETERS et al. 2017). Mesmo com confirmações bem embasadas, como a parafilia de “Symphyta” (*sawflies*) em relação à Apocrita (vespas com cintura), outros relacionamentos e grupos tradicionalmente reconhecidos vêm sendo

contestados à luz de novas evidências. Um exemplo disso são os “Vespoidea”, uma superfamília historicamente estabelecida, recuperada como monofilética em análises cladísticas utilizando dados morfológicos (CARPENTER, 1982). Com o uso de regiões ultraconservadas do genoma (UCEs) e transcriptomas foi levantada a hipótese de algumas linhagens tradicionalmente reconhecidas nessa superfamília, como as formigas (Formicidae), serem mais relacionadas às abelhas (Apoidea) (JOHNSON et al., 2013; BRANSTETTER et al., 2017). O uso de dados moleculares trouxe questionamentos em níveis menos abrangentes e no caso dos “Vespoidea”, uma linhagem desponta como um interessante caso em que existe conflito entre as diferentes fontes de evidência, a família Vespidae.

Os vespídeos são tão conhecidos quanto às formigas e abelhas quando citamos os himenópteros. A palavra “vespa”, no geral, é associada aos conspícuos insetos que formam colônias e constroem ninhos (BUCK et al., 2012). Entretanto a riqueza comportamental e morfológica desse grupo não está restrita apenas às espécies sociais. Vespidae compreende cerca de 5000 espécies, com linhagens com uma variedade de níveis de socialidade (vespas solitárias, com compartilhamento de ninhos, e com sociedades elaboradas), hábitos alimentares (há tanto espécies predadoras, quanto polívoras) e diversidade morfológica (um exemplo é a variedade de conformações do primeiro tergo metassomal) (CARPENTER, 1982; PICKETT; CARPENTER, 2010; HERMES; MELO; CARPENTER, 2014; PERRARD; GRIMALDI; CARPENTER, 2017). Além do interesse óbvio como um grupo para se estudar a evolução do comportamento social e estratégias de nidificação, os vespídeos podem ser explorados no manejo integrado de pragas (JÚNIOR et al., 2012) ou mesmo na indústria farmacêutica (LEITE et al., 2015).

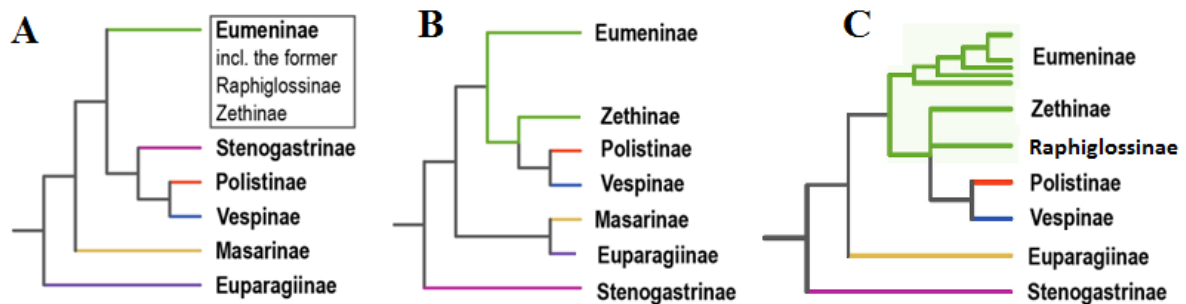
A monofilia de Vespidae é bem suportada tanto por dados morfológicos quanto por dados moleculares (CARPENTER, 1982; PICKETT; CARPENTER, 2010). Entretanto, a discussão quanto às relações de parentesco entre as principais linhagens de vespídeos ainda motiva debates (HINES, 2007; PICKETT; CARPENTER, 2010; BANK et al., 2017). O principal deles é gerado por hipóteses concorrentes para a origem da eussocialidade em Vespidae [FIGURA 2; para discussão mais detalhada: PICKETT; CARPENTER (2010) vs HINES et al. (2007); BANK et al. (2017)].

Tradicionalmente, são reconhecidas seis subfamílias de vespídeos com representantes na fauna atual: Euparagiinae (10 spp.), Masarinae (370 spp.), Eumeninae (3746 spp.), Stenogastrinae (63 spp.), Vespinae (70 spp.) e Polistinae (1003 spp.) (CARPENTER, 1982; PICKETT; CARPENTER, 2010; PERRARD; GRIMALDI; CARPENTER, 2017). Além da

diversidade recente existem 58 espécies de vespídeos encontradas no registro fóssil, incluindo duas subfamílias atualmente extintas (PERRARD; GRIMALDI; CARPENTER, 2017).

A divisão de Vespidae nas subfamílias citadas está apoiada principalmente em estudos filogenéticos, utilizando dados morfológicos e comportais ou abordagens de evidência total, incluindo poucos loci gênicos (CARPENTER, 1982; PICKETT; CARPENTER, 2010). O estudo de Hines et al. (2007) apresentou uma proposição diferente de relacionamento entre os vespídeos, incluindo o desmembramento da subfamília Eumeninae em duas subfamílias baseando-se em dados moleculares. As principais críticas ao trabalho de Hines et al. (2007) são o uso de poucos genes e a baixa amostragem utilizada nas análises (ver discussão em PICKETT; CARPENTER, 2010). Bank et al. (2017), utilizando uma abordagem “filogenômica”, apresentam um novo cenário filogenético para Vespidae, incluindo novamente o desmembramento de Eumeninae dessa vez em três subfamílias (Eumeninae, Zethinae e Raphiglossinae).

Figura 2 – Classificações propostas para Vespidae: A. proposição de Carpenter (1982), considerando seis subfamílias para a fauna recente: origem única da eussocialidade no clado formado por (Stenogastrinae + (Polistinae + Vespinae)); B. proposição de Hines et al. (2007), considerando uma nova subfamília (Zethinae), antes incluída em Eumeninae *sensu* Carpenter (1982): origem independente da eussocialidade em Stenogastrinae e no clado formado por (Polistinae + Vespinae); C. proposição de Bank et al. (2017).



Fonte: adaptado de Bank et al. (2017).

Eumeninae *sensu* Carpenter (1982) é uma subfamília de vespas solitárias de distribuição cosmopolita e que são reconhecidas por seus intrincados ninhos construídos com barro (HERMES; MELO; CARPENTER, 2014). A subfamília apresenta alta riqueza, concentrando cerca de 75% das espécies de vespídeos (PERRARD; GRIMALDI; CARPENTER, 2017). A elevada riqueza de espécies se traduz em uma variedade de comportamentos de nidificação, interações ecológicas com outros organismos e diversidade morfológica (HERMES; MELO; CARPENTER, 2014; HERMES; ARAÚJO; ANTONINI,

2015; PEREIRA et al., 2016). A taxonomia da subfamília tem um histórico conturbado, sendo a proliferação de nomes e o pouco cuidado nas descrições de espécies problemas recorrentes (HERMES; MELO; CARPENTER, 2014). Um exemplo nesse contexto são os vários trabalhos de revisão taxonômica do autor italiano Giordani Soika publicados ao longo do século XX (HERMES; FERREIRA, 2016).

A monofilia de Eumeninae e a divisão da subfamília em três tribos foi proposta pelo trabalho marco de Hermes, Melo e Carpenter (2014). Os autores naquele estudo utilizaram uma abordagem cladística valendo-se de dados morfológicos, sendo reconhecidas três tribos para Eumeninae: Odynerini, Eumenini e Zethini – todas monofiléticas. A monofilia de Eumeninae, assim como das tribos Odynerini e Zethini, não foi corroborada por Bank et al. (2017), utilizando dados genômicos. As implicações deste último estudo não afetam somente a classificação tribal de Eumeninae, como também levanta novamente a questão da origem única da eussocialidade em Vespidae (BANK et al., 2017).

Mesmo em um contexto de alterações em níveis taxonômicos mais abrangentes devido aos resultados advindos de estudos moleculares com uma quantidade massiva de dados, os estudos de taxonomia em Eumeninae vêm avançando, principalmente com o uso de ferramentas filogenéticas. Nesse contexto, bons exemplos podem ser traçados para região Neotropical, devido aos esforços de vários pesquisadores: filogenias baseadas em dados morfológicos, com uma abordagem cladística, foram propostas nos últimos anos (GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015; HERMES; OLIVEIRA, 2016), e o número de trabalhos voltados para a taxonomia alfa vem aumentando (FERREIRA et al., 2015; HERMES; FERREIRA, 2016; FERREIRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017). Além disso, estudos focados em interações ecológicas com outros organismos (VARGAS et al., 2014; PEREIRA et al., 2016) e comportamento de nidificação em Eumeninae (HERMES; SOMAVILLA; GARCETE-BARRETT, 2013; AUKO; TRAD; SILVESTRE, 2015; HERMES; ARAÚJO; ANTONINI, 2015) despontam como fontes de conhecimento adicional sobre o modo de vida das espécies que compõem a subfamília.

Contudo, trabalhos taxonômicos utilizando uma abordagem integrativa, valendo-se de fontes de dados variadas além da morfologia ainda não estabeleceu raízes nesse grupo de vespídeos. Com a publicação de revisões taxonômicas abrangentes e hipóteses filogenéticas em uma abordagem cladística, como a do gênero *Pachymenes* (de Saussure) (GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015), há uma abertura maior para pesquisas em níveis de generalidade mais específicos, como é o caso de estudos focados em problemas de delimitação de espécies.

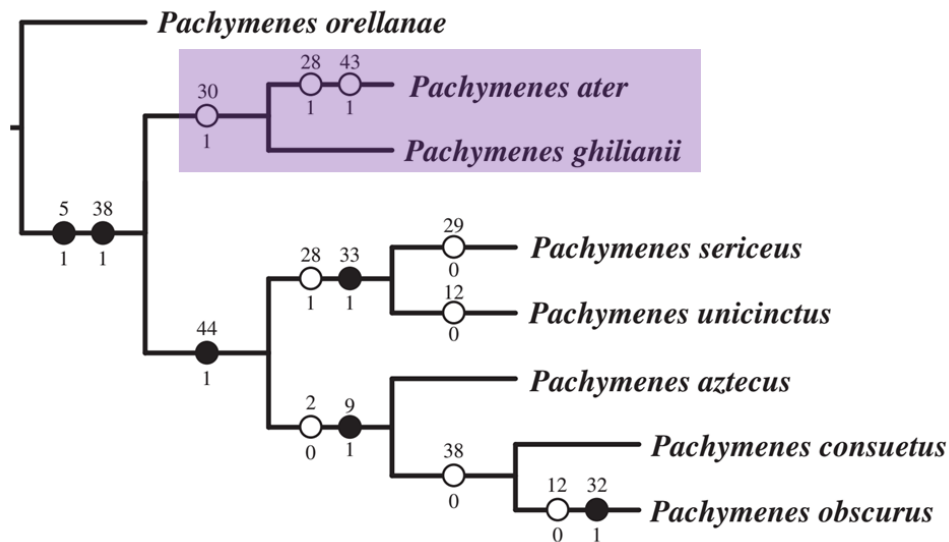
2.4 Modelos de estudo

Pachymenes (de Saussure) é um gênero com distribuição exclusivamente Neotropical (GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015), já reportado para fragmentos da Mata Atlântica e Cerrado no Brasil (AUKU; SILVESTRE, 2013; GRANDINETE; NOLL 2013). Giordani Soika (1990), em um trabalho de revisão taxonômica abrangente, reconheceu 11 espécies no gênero, distinguindo este do gênero *Santamenes* (Giordani Soika). A presença de uma lamela no segundo terço metassomal nas quatro espécies de *Santamenes* foi apontada como a principal diferença entre os gêneros (GIORDANI SOIKA, 1990). *Pachymenes* e *Santamenes* foram recuperados como grupos-irmãos no estudo de Hermes, Melo e Carpenter (2014); todavia, nem todas as espécies dos gêneros foram consideradas naquele trabalho.

Uma revisão taxonômica aliada a um estudo cladístico foi realizada para os dois gêneros em conjunto, incluindo todas as espécies e utilizando dados morfológicos, por Grandinete, Hermes e Noll (2015). *Santamenes* e *Pachymenes* (*sensu* GIORDANI SOIKA, 1990) não foram recuperados como grupos naturais nas análises filogenéticas realizadas por esses autores. Com base em seus resultados, Grandinete, Hermes e Noll (2015) propuseram que *Santamenes*, na verdade, trata-se de um sinônimo júnior de *Pachymenes*. Com a sinonimização, *Pachymenes* conta atualmente com 18 espécies reconhecidas, três delas descritas no trabalho de Grandinete, Hermes e Noll (2015). O reconhecimento de subespécies para o gênero também é criticada por estes mesmos autores, apoiados em estudos que desencorajam a prática do reconhecimento de subespécies baseando-se na coloração do tegumento para vespídeos (CARPENTER, 1987; CARPENTER, 2003).

Uma resolução das relações de parentesco e dos principais problemas taxonômicos em *Pachymenes* abriu espaço para pesquisas em níveis de menor generalidade e estudos mais específicos. Uma das questões que pode ser levantada a partir do trabalho de Grandinete, Hermes e Noll (2015) é a delimitação mais acurada entre as espécies *Pachymenes ater* de Saussure e *Pachymenes ghilianii* (Spinola). As duas espécies foram recuperadas como grupos-irmãos sendo o clado que as abriga sustentado por uma homoplasia: presença de pontuação no segundo terço metassomal (GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015) (FIGURA 3). Contudo, a determinação de espécimes das duas espécies a partir da chave de identificação apresentada pode não ser tão clara.

Figura 3 – Parte da hipótese de relacionamento das espécies do gênero *Pachymenes* (de Saussure), com destaque para o clado formado por *Pachymenes ater* de Saussure e *Pachymenes ghiliani* (Spinola).



Fonte: Grandinete; Hermes; Noll (2015).

Na prática, os caracteres morfológicos para a delimitação destas espécies são de difícil comparação ou levam a uma identificação ambígua (FIGURA 4). *Pachymenes ater* e *P. ghiliani* são distinguidos devido a caracteres presentes em machos, tais como o formato do clipeo em vista lateral e diferenças sutis na genitália (GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015, p. 365–366). O principal caráter morfológico que distingue as duas espécies, e é aplicável para ambos os sexos, diz respeito ao formato da carena pronotal [“fracamente” desenvolvida e às vezes presente apenas medialmente (*P. ater*) ou “mais desenvolvida” e presente em toda a superfície dorsal do pronoto (*P. ghiliani*)] (GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015). É interessante salientar, todavia, que este caráter pode se mostrar confuso, principalmente quando não se tem exemplares para a comparação direta, uma vez que a chave de identificação não apresenta ilustrações nesse passo (GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015, p. 365–366).

Um segundo caráter que permitira a distinção entre as duas espécies e é aplicável para ambos os sexos seria: presença de pontuação grosseira na metade apical do tergo metassomal I (*P. ater*) ou tergo metassomal I liso ou com pontuação incipiente (*P. ghiliani*) (GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015). Entretanto este passo também mostra ambiguidade ao explicitar que “geralmente” cada uma dessas duas condições ocorre em cada uma das espécies. Não é deixado claro se para *P. ater* pode existir pontuação incipiente, assim

como em *P. ghiliani*. A circunscrição desse caráter abre margem para a identificação errônea de *P. ater* ou *P. ghiliani*, uma vez que nem toda a variação é contemplada.

Figura 4 – Trecho da chave de identificação das espécies de *Pachymenes* (de Saussure). Grifo no uso de expressões que tem sentido apenas comparativamente ou que levam a uma identificação ambígua de espécimes de *P. ater* de Saussure e *P. ghiliani* (Spinola).

11. Pronotal carina slightly developed, sometimes present only medially; T1 often with coarse punctation on apical half; male clypeus with outer margin, in lateral view, truncate (Fig. 57); projection of the gonocoxite with two to five apical projections (Fig. 66); digitus with long bristles (Figs 63, 66)
 *Pachymenes ater* de Saussure
- 11'. Pronotal carina more developed and present all along the dorsal surface of pronotum; T1 often with shallow or incipient punctation; apex of male clypeus, in lateral view, acutely angled (Fig. 58); projection of the gonocoxite with a single apical projection; digitus with short or incipient bristles
 *Pachymenes ghiliani* (Spinola)

Fonte: adaptado de Grandinete, Hermes e Noll (2015).

Além disso, a variação intraespecífica cromática reconhecida para *P. ghiliani* pode ser um fator que leva a uma confusão na delimitação das duas espécies. A maioria dos espécimes de *P. ghiliani* apresenta tegumento amarelo-acastanhado, com algumas manchas negras distribuídas principalmente no metassoma, mas há exemplares com tegumento castanho e poucas manchas amarelas e espécimes melânicos. Os últimos, especificamente, assemelham-se a exemplares determinados como *P. ater*, espécie que apresenta menor variação quanto à coloração do tegumento. Exemplares desta espécie possuem tegumento enegrecido, com poucas manchas acastanhadas ou amarelas (GIORDANI SOIKA, 1990; GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015).

Existe ainda provável sobreposição distribucional entre as duas espécies se considerarmos seus principais pontos de ocorrência relatados na literatura (GIORDANI SOIKA, 1990; GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015). Em alguns casos espécimes de *P. ater* e *P. ghiliani* encontrados na mesma região podem ser morfológicamente similares tanto em termos de coloração quanto em relação aos caracteres taxonômicos propostos como diagnósticos para as duas espécies.

Desse modo, apesar de serem reconhecidas como espécies distintas, *P. ater* e *P. ghiliani* não apresentam seus limites específicos bem definidos. Um novo conjunto de

caracteres, assim como uma reavaliação dos caracteres apresentados por Grandinete, Hermes e Noll (2015), poderia auxiliar na melhor delimitação dessas espécies. O uso de fontes de evidência variadas (como dados moleculares ou caracteres morfométricos) poderia suportar com mais robustez a distinção entre as duas espécies, seguindo a abordagem da taxonomia integrativa (PADIAL et al., 2010; PADIAL; LA RIVA, 2010). É sugestivo, portanto, o uso da taxonomia integrativa para testar os limites entre essas duas espécies e definir a validade das mesmas.

Trabalhos com essa abordagem vêm sendo utilizados para alguns grupos de himenópteros, principalmente parasitoides. Como estudos que explicitamente utilizam uma abordagem integrativa podemos citar os trabalhos de Gibbs (2009); Baur et al. (2014); Neumeyer et al. (2014); Schwarzfeld e Sperling (2014); Schmid-Egger et al. (2017); e Zhang, Ridenbaur e Sharanowski (2017). Neumeyer et al. (2014) e Schmid-Egger et al. (2017) merecem destaque por focarem em Vespidae e representarem avanços no uso da taxonomia integrativa para este grupo. Os autores dos estudos citados utilizaram dados moleculares e morfometria para resolver problemas taxonômicos no grupo de vespas sociais *Polistes* Latreille (Vespidae, Polistinae).

Existe, todavia, uma escassez de trabalhos que exploram uma fonte variada de evidências para estudos taxonômicos em vespídeos solitários, como os Eumeninae. A taxonomia neste grupo é voltada ainda para o uso de caracteres morfológicos qualitativos, portanto, explorando apenas uma fonte de evidências. No presente estudo outros tipos de dados foram explorados visando entender o potencial informativo para a resolução de um problema de delimitação de espécies. Como modelos de estudo para este problema utilizamos as espécies: *Pachymenes ater* e *P. ghilianii*, devido as questões deixadas em aberto por Grandinete, Hermes e Noll (2015).

2.5 Conceito de espécie e hipóteses

Adotamos, para este estudo, o conceito geral de espécie como linhagem defendido por de Queiroz (1998, 1999, 2005a, 2005b, 2005c, 2007). De Queiroz (2007) define espécies como segmentos de linhagens de (meta)populações evoluindo separadamente, isto é, com história evolutiva própria. Esta definição se aproxima do conceito evolutivo de espécie (CEE) advogado por Simpson, Wiley e Mayden (NAOMI, 2011). O diferencial da proposta de de Queiroz é a argumentação de que muitos dos conceitos de espécie contemporâneos, na verdade, referem-se a critérios para a delimitação de espécies e podem ser suprimidos vista a

reconciliação trazida pelo conceito unificado de espécies como linhagens (DE QUEIROZ, 1998, 1999, 2005a, 2005b, 2005c, 2007; ver também HEY, 2006).

Seguimos a recomendação de Zachos (2016a) explicitando o conceito de espécie adotado no presente estudo, mesmo que tal recomendação tenha sido proposta, em outro contexto, para comunidade de Mastozoologia. Optamos por este conceito porque o mesmo desfaz as confusões entre conceitos e critérios, e devido sua natureza consensual vem sendo adotado, principalmente, por sistematas (WEINS, 2007). Existe um consenso entre vários autores sobre o uso desse conceito, devido sua flexibilidade ao lidar com os diferentes critérios (evidências) que podem pautar a distinção entre espécies (WEINS, 2007; PADIAL et al., 2010; ZACHOS, 2016b).

Desse modo, assumimos critérios que podem auxiliar na delimitação entre *P. ater* e *P. ghilianii*, considerando o conceito de espécies como linhagens. Esses critérios são baseados em diferentes fontes de evidência e não é necessário, segundo a proposição de de Queiroz (1998, 1999, 2005a, 2005b, 2005c, 2007), que exista congruência entre todos estes critérios para que o *status* de espécie seja alcançado por uma determinada linhagem. Nesse sentido, nossa abordagem vai de encontro aos pressupostos da taxonomia integrativa por acumulação (PADIAL et al., 2010). Os critérios assumidos, assim como as respectivas fontes de evidência, utilizadas em nosso estudo para a distinção entre as duas espécies, são resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Critérios estabelecidos e fontes de evidências para distinção entre *Pachymenes ater* de Saussure e *Pachymenes ghilianii* (Spinola).

Critérios	Fontes de evidência
<i>caracteres morfológicos diagnósticos</i>	caracteres discretos e/ou contínuos fixados nas amostras das populações avaliadas
<i>monofilia recíproca</i>	sequências de marcadores moleculares mitocondriais, para os quais estudos para a delimitação de espécies já foram realizados (DNA <i>barcoding</i>)
<i>nichos ecológicos distintos</i>	distribuição geográfica associada a variáveis ambientais de regiões em que as populações das espécies são encontradas

Fonte: Do Autor (2018)

Assumimos como hipótese de trabalho que *P. ater* e *P. ghilianii* são espécies distintas, conforme já reconhecido nas revisões para o gênero *Pachymenes* (GIORDANI SOIKA, 1990; GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015). O principal critério já explorado para a distinção entre as duas espécies foi o uso de caracteres morfológicos discretos, portanto, buscamos por

outras fontes de evidência que poderiam dar suporte e maior robustez a hipótese de trabalho. As hipóteses suplementares que foram estabelecidas para suportar essa hipótese principal e testadas independentemente:

H1. *P. ater* e *P. ghiliani* não apresentam sobreposição quanto a variáveis ambientais climáticas que compõem seus nichos ecológicos.

H2. *P. ater* e *P. ghiliani* apresentam monofilia recíproca para os loci de genes mitocondriais testados.

H3. *P. ater* e *P. ghiliani* apresentam caracteres morfológicos discretos distintivo-diagnósticos que não se sobrepõem.

H4. Fêmeas de *P. ater* e *P. ghiliani* apresentam alguma diferença estatisticamente significativa para caracteres contínuos.

Com o uso da taxonomia integrativa por acumulação (PADIAL et al. 2010) a corroboração de qualquer uma dessas hipóteses somaria-se como uma fonte de evidência adicional para sustentar o reconhecimento *P. ater* e *P. ghiliani* como espécies distintas, aumentando o poder explanatório de nossa hipótese de trabalho. Realizamos estudos independentes visando explorar cada fonte de evidência e determinar quais delas seriam informativas ou não para a delimitação de *P. ater* e *P. ghiliani*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Foram utilizados espécimes de múltiplas localidades, com registros de coleta conhecidos, buscando cobrir os principais pontos de ocorrência de *P. ater* de Saussure e *P. ghiliani* (Spinola). Tanto espécimes preservados a seco quanto preservados em etanol (90%) foram utilizados nos estudos moleculares (TABELA 2; mais informações: ANEXO A – Espécimes utilizados nos estudos moleculares). Os estudos morfológicos, incluindo morfometria, foram conduzidos a partir de espécimes preservados a seco (ANEXO B – Espécimes examinados nos estudos morfológicos). Para as análises moleculares, a espécie *P. sericeus* (de Saussure) foi utilizada como grupo-externo, sendo incluído um exemplar dessa espécie.

Tabela 2 – Lista de espécimes utilizados nos estudos moleculares com: código utilizado no presente estudo; determinação; ano de coleta; e localidade.

Código	Espécie	Ano de coleta	Localidade	Coordenadas geográficas
PAAT01	<i>P. ater</i>	2016	Brasil, MG, Ingaí	21°20'47"S 44°59'27"O
PAAT02	<i>P. ater</i>	2016	Brasil, MG, Ingaí	21°20'47"S 44°59'27"O
PAAT03	<i>P. ater</i>	2011	Brasil, SP, Ribeirão Grande	24°16'28"S 48°25'20"O
PAAT04	<i>P. ater</i>	2015	Brasil, MG, Ingaí	21°20'47"S 44°59'27"O
PAAT05	<i>P. ater</i>	2016	Brasil, MG, Ingaí	21°20'47"S 44°59'27"O
PAAT06	<i>P. ater</i>	2008	Brasil, PR, Curitiba	25°25'47"S 49°16'19"O
PAAT07	<i>P. ater</i>	2015	Brasil, MG, Ingaí	21°20'47"S 44°59'27"O
PAGH01	<i>P. ghiliani</i>	2013	Brasil, MG, Itanhandu	22°17'45"S 44°56'06"O
PAGH02	<i>P. ghiliani</i>	2007	Paraguai, Concepcion	23°24'13"S 56°31'18"O
PAGH03	<i>P. ghiliani</i>	2008	Brasil, AM, Presidente Figueiredo	02°03'44"S 59°58'28"O
PAGH04	<i>P. ghiliani</i>	2012	Brasil, RO, Itapuã do Oeste	09°12'08"S 63°10'48"O
PAGH05	<i>P. ghiliani</i>	2011	Brasil, AM, Iranduba	03°17'06"S 60°11'09"O
PAGH06	<i>P. ghiliani</i>	2011	Brasil, AM, Iranduba	03°17'06"S 60°11'09"O
PAGH07	<i>P. ghiliani</i>	2015	Brasil, MG, Ingaí	21°20'47"S 44°59'27"O
PAGH08	<i>P. ghiliani</i>	2012	Brasil, RO, Itapuã do Oeste	09°12'08"S 63°10'48"O
PAGH09	<i>P. ghiliani</i>	2009	Brasil, SP, Barretos	20°33'25"S 48°34'04"O
PAGH10	<i>P. ghiliani</i>	2015	Brasil, MG, Ingaí	21°20'47"S 44°59'27"O
PAGH11	<i>P. ghiliani</i>	1985	Peru, Madre de Dios	12°37'09"S 70°23'37"O
PAGH12	<i>P. ghiliani</i>	1976	Equador, Napo	0°59'20"N 77°48'57"O
PAGH13	<i>P. ghiliani</i>	2008	Brasil, SP, Matão	21°36'10"S 48°21'57"O
PAGH14	<i>P. ghiliani</i>	2015	Brasil, MG, Ingaí	21°20'47"S 44°59'27"O
PASE01	<i>P. sericeus</i>	2009	Brasil, MS, Bonito	21°03'28"S 56°43'52"O

Fonte: Do Autor (2018).

A determinação dos espécimes até o nível específico seguiu a chave de Gradinete, Hermes e Noll (2015). Comparações com material já identificado pelos autores daquele trabalho também foram realizadas.

Os exemplares foram obtidos da própria Coleção Entomológica do Laboratório de Sistemática e Biologia de Insetos, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (LSBI/UFLA); e via empréstimo das seguintes instituições:

AMNH, American Museum of Natural History (Nova Iorque, E.U.A. – Dr. James Carpenter);

IBILCE/UNESP, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – UNESP (São José do Rio Preto, Brasil – Dr. Fernando Noll);

FFCLRP/USP, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP (Ribeirão Preto, Brasil – Dr. Eduardo Andrade Botelho de Almeida);

CESEC/UNISC, Coleção Entomológica da Universidade de Santa Cruz do Sul (Santa Cruz do Sul, Brasil – Dr. Andreas Köhler).

O número de espécimes examinados nos estudos morfológicos, distinguindo-se machos e fêmeas, assim como as instituições de origem está resumido na Tabela 3.

Tabela 3 – Material examinado. Os nomes das instituições de origem dos exemplares encontram-se abreviados (ver texto).

Instituição	Espécies			
	<i>P. ater</i> de Saussure		<i>P. ghiliani</i> (Spinola)	
	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂
LSBI/UFLA	21	7	0	1
AMNH	2	1	7	3
IBILCE/UNESP	8	3	25	5
FFCLRP/USP	0	0	2	0
CESEC/UNISC	11	1	0	0
Total	42	12	34	9

Fonte: Do Autor (2018).

3.2 Distribuições geográficas, coloração do tegumento e PCA ecológica

As coordenadas geográficas para os registros de coleta de *P. ater* e *P. ghiliani* foram retiradas das etiquetas do material examinado e da literatura. A verificação da presença de erros nas tabelas de distribuição e a conversão para a extensão *.kml* foram realizadas a partir do EarthPoint (disponível em: <http://www.earthpoint.us/>; acesso em 11/12/2017). Os registros de coleta foram plotados no *shapefile* da região Neotropical (LÖWENBERG-NETO, 2014) por meio do programa Quantum GIS 2.4.0.

Utilizando o WorldClim version2 (FICK; HIJMANS, 2017) foi possível discriminar 19 variáveis climáticas (médias estimadas do período de 1970–2000) para cada um dos pontos de coleta (variáveis utilizadas listadas em: <http://worldclim.org/bioclim>, acesso em 11/12/2017). Os valores referentes a cada localidade foram extraídos através do Quantum GIS 2.4.0 utilizando o pacote *Point sampling tool* para 52 pontos de coleta de *P. ater* e 78 pontos de coleta para *P. ghiliani*.

Mapas com as distribuições potenciais de *P. ater* e *P. ghilianii* foram gerados por meio do software MaxEnt v. 3.3.3K (PHILLIPS; ANDERSON; SCHAPIRE, 2006). Para estimação dos modelos de distribuição foi utilizado o modo *default* do programa, valendo-se das 19 variáveis ambientais (FICK; HIJMANS, 2017). Os modelos foram transformados em mapas contendo os seguintes esquemas de cores de acordo com a adequação das condições ambientais para a ocorrência potencial das espécies: inadequado (cor branca), pouco adequado (azul e esquema de cores verde) e adequado (amarelo e esquema de cores vermelha).

Como a coloração do corpo é um caráter de fácil observação e cuja variação tem efeito ambiental significativo para vespídeos – ver discussão em Hermes e Oliveira (2016), dependendo inclusive de condições climáticas presentes em diferentes regiões geográficas, foram realizadas comparações entre exemplares de algumas localidades buscando correlacionar a coloração do tegumento com a distribuição geográfica. Fotografia dos espécimes analisados foram capturadas conforme o descrito na seção 3.3 *Reavaliação de caracteres morfológicos*.

Os valores de todas as 19 variáveis climáticas, considerando todos os registros de coleta, foram submetidos a uma Análise de Componentes Principais (PCA), por meio do programa PAST v.4 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2011). Esta abordagem inicial serviu para estimar grosseiramente as relações existentes entre os nichos ecológicos ocupados por cada uma das duas espécies, buscando discriminar possíveis agrupamentos ou sobreposições dependendo das variáveis ecológicas.

3.3 Estudos moleculares

Extração de DNA, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), purificação e sequenciamento foram conduzidos utilizando protocolos-padrão em biologia molecular buscando obter amostras de DNA de boa qualidade. Os procedimentos de extração, amplificação e purificação foram realizados no Laboratório de Biologia Comparada e Abelhas (responsável: Dr. Eduardo A. B. de Almeida), Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCLRP/USP). DNA amplificado e purificado foi enviado para sequenciamento no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus Jaboticabal (UNESP).

A musculatura do tórax de exemplares preservados a seco ou em via úmida foi extraída destacando-se a cabeça e pernas anteriores do protórax. Posteriormente, os exemplares foram remontados, preservando o exoesqueleto. A extração do DNA foi realizada a partir da musculatura extraída utilizando o *kit* de extração QIAGEN: QIAquick® Gel Extraction Kit (protocolo padronizado fornecido pela empresa; disponível em: <http://klymkowskylab.co-lorado.edu/Methods/QIAquick-Gel-Extraction-Kit-EN.pdf>; acesso em 09/01/2018). A efetividade da extração foi verificada através de uma corrida de eletroforese em gel de agarose.

Foi testada a eficiência da amplificação para três marcadores moleculares mitocondriais codificadores de proteínas (para especificações das PCRs: TABELA 4): subunidade I do citocromo c (COI) – *primers*: CI-J-1718 (SIMON et al., 1994) e CI-N-2191 (KAMBHAMPATI; SMITH, 1995); subunidade II do citocromo c (COII) – *primers*: E2 (GARNERY et al., 1992) e COIII-2 (SAITO; KOJIMA, 2011); e citocromo b (CytB) – *primers*: CRO91A (CROZIER et al., 1991) e CRO91B (CROZIER et al., 1991).

Apenas o material amplificado foi purificado por meio de *kit* de purificação QIAGEN: QIAquick® PCR Purification Kit (protocolo padronizado fornecido pela empresa; disponível em: <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=390a728a-e6fc-43f7-bf59-b12091cc4380&lang=en>; acesso em 09/01/2018). A efetividade da amplificação foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose, e as amostras amplificadas foram enviadas para o sequenciamento.

Tabela 4 – Sequências dos *primers* a serem utilizados nas PCRs e especificações das reações.

Especificação dos primers		Especificações da PCR
COI		
CI-J-1718	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC	95°C; 30s; 45°C; 1min; 72°C; 1min - 35 ciclos
CI-N-2191	GGTAAAATTAATAAATAAACTTC	
COII		
E2	GGCAGAATAAGTGCATTG	94°C; 30s; 50°C; 45s; 72°C; 45s - 40 ciclos
COIII-2	ATTTTATACCACAAATTTCTGAACATTG	
CytB		
CRO91A	TATGTACTACCATGAGGACAAATATC	94°C; 30s; 54°C; 20s; 70°C; 1min - 40 ciclos
CRO91B	ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT	

Fonte: Do Autor (2018).

A qualidade das sequências foi avaliada utilizando o programa Geneious 7.1.3 (KEARSE et al., 2012). Com o mesmo programa as sequências foram manipuladas, sendo criados *contigs* com cada par *Forward–Reverse* (F–R) sequenciado (opção: *De novo assembling*). Os *contigs* foram editados buscando remover possíveis ruídos e identificando a existência de bases com sequenciamento ambíguo. Todas as sequências finais obtidas (*contigs*), com qualidade superior a 80%, foram exportadas em arquivos FASTA (.fas) em blocos de dados separados para cada um dos loci cuja extração, amplificação e sequenciamento foram eficientes.

O alinhamento foi realizado de modo independente para cada um dos loci por meio do algoritmo MUSCLE (Multiple Sequence Alignment), utilizando o *default* (EDGAR, 2004). Cada posição foi considerada como um caráter e as bases como seus respectivos estados, levando em conta homologia molecular de posição (DOYLE; DAVIS, 1998).

As matrizes de dados foram visualizadas e editadas utilizando o Mesquite v3.31 (MADDISON; MADDISON, 2017). Com o mesmo programa uma matriz de dados concatenados foi criada. Também foi determinada a posição das bases, considerando as trincas de códon, uma vez que os marcadores utilizados são genes codificadores de proteínas. A matriz concatenada foi exportada no formato PHYLIP (.phy) para seleção dos modelos de substituição.

A partição de dados e seleção dos modelos de evolução molecular foi realizada por meio do PartitionFinder2 (LANFPEAR et al., 2016), utilizando-se o critério de informação Bayesiano (BIC). Considerou-se tanto a distinção de modelos para cada posição de códon em cada locus. Optou-se pela condução das análises filogenéticas dos loci isoladamente, seguidas por análises combinadas com a matriz de dados concatenados.

As reconstruções filogenéticas foram realizadas por meio do método cladístico (máxima parcimônia – MP) e métodos probabilísticos (máxima verossimilhança – ML; e inferência bayesiana – BI) para fins comparativos. A partição dos dados e os modelos de substituição foram aplicados para os métodos probabilísticos. O *input* das matrizes para cada uma das análises se deu com as seguintes extensões de arquivos: TNT (.tnt) para MP; e NEXUS (.nex) para ML e BI. Todas as conversões de arquivos para extensões diferentes foram realizadas por meio do Mesquite 3.31 (MADDISON; MADDISON, 2017).

Buscas heurísticas pelos cladogramas mais parcimoniosos foram realizadas através do programa TNT v. 1.1 (GOLOBOFF; FARRIS; NIXON, 2008), usando algoritmos da opção “New Technology Search” no esquema que se segue: Sectorial search (GOLOBOFF, 1999),

utilizado no modo default; Ratchet (NIXON, 1999), com 200 interações e fase de perturbação ajustada para 8 tanto em Up weighting, quanto em Down weighting; Drift (GOLOBOFF, 1999) com 20 ciclos; e Tree Fusing (GOLOBOFF, 1999) com 10 rounds. O procedimento foi repetido até que o comprimento mínimo fosse encontrado ao menos 100 vezes. Random seed foi estabelecido em 0. Foi utilizado o esquema de pesagem igual dos caracteres [(parcimônia de Fitch (1971))] e os *gaps* foram tratados como dados faltantes, e não como um 5º estado de caráter. O suporte dos ramos foi estimado através de *bootstrap*, utilizando-se a busca tradicional com 1000 replicações.

As árvores mais verossímeis resultaram de análises realizadas no programa Garli 2.01 (ZWICKL, 2006), utilizado no modo *default*. O suporte dos ramos foi estimado por *bootstrap* (1000 repetições) e as repetições foram sumarizadas em uma única árvore por meio de consenso de maioria (50%), utilizando o programa PAUP* v.4 (SWOFFORD, 2002).

As análises Bayesianas foram conduzidas no software MrBayes v3.2.3 (RONQUIST et al., 2012). Foram realizadas duas corridas independentes, com quatro cadeias por 50 milhões de gerações e amostragem a cada 1000 gerações, com 20% de burn-in descartado. O burn-in, convergência e fases estacionárias foram acessadas utilizando o Tracer v1.6 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2014).

As árvores resultantes das análises foram visualizadas e editadas com o uso do Winclada ver. 1.00.08 (NIXON, 1999-2002), para MP, e pelo FigTree v1.4.0 (Tree Figure Drawing Tool) (RAMBAUT, 2009) para ML e IB. A edição final das árvores filogenéticas foi realizada com o uso do Adobe Illustrator CC (Adobe Inc.).

3.4 Reavaliação de caracteres morfológicos

Os caracteres morfológicos discretos delimitados para a distinção das espécies na chave de identificação proposta por Grandinete, Hermes e Noll (2015) foram reavaliados. A variação intraespecífica de ambas as espécies foi examinada e as possíveis sobreposições de caracteres morfológicos discriminadas. A análise da morfologia externa foi conduzida com o uso de microscópio estereoscópio Leica M205. Fotografias de estruturas de interesse foram obtidas através de câmera digital Leica DFC295, acoplada ao microscópio estereoscópio Leica M205. Imagens foram capturadas através do software Auto-Montage Pro v5.03.0040.

O estudo da genitália masculina foi realizado, sendo examinadas genitálias extraídas e clarificadas, segundo o protocolo descrito por Hermes e Melo (2008). Fotografias das

genitálias foram obtidas e uma comparação entre as genitálias e as figuras presentes no trabalho de Grandinete, Hermes e Noll (2015) foi realizada.

A terminologia para a morfologia externa geral seguiu Carpenter e Garcete-Barrett (2003) e para a genitália masculina Bistch (2012). Alguns termos para a região do mesepisterno foram adaptados de Richards (1978). As abreviações F1-F11 foram utilizadas para os flagelômeros antenais, enquanto que T1-T7 e S1-S7 para os tergos e esternos metassomais, respectivamente.

3.5 Estudos morfométricos

Foram mensurados caracteres morfológicos contínuos para cinco regiões do corpo: frente + clípeo; vértice; mesepisterno; segmento metassomal I; e segmento metassomal II. Essas medidas se basearam em outros estudos com vespídeos (p. ex. TANAKA JUNIOR; SOLEMAN; NOLL, 2010; GARCETE-BARRETT, 2011) e em caracteres de interesse taxonômico para Eumeninae (p. ex. dimensões do clípeo: GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015). Novos caracteres contínuos a serem explorados para vespídeos também foram propostos.

As medidas foram mesuradas em 30 espécimes fêmeas de cada uma das espécies em estudo (ANEXO B) buscando cobrir os principais registros de ocorrência das duas espécies. Não foram utilizados espécimes machos, evitando assim comparações errôneas decorrentes do dimorfismo sexual. Em cada região do corpo foram mensuradas medidas lineares (TABELA 5; FIGURA 5), totalizando 19 caracteres. Quando possível razões entre as medidas lineares foram estabelecidas, totalizando 9 medidas relacionais (TABELA 6). Fotografias de cada exemplar, nas regiões de interesse foram capturadas (segundo o mesmo procedimento descrito em: 3.4 *Reavaliação dos caracteres morfológicos*). As mensurações foram realizadas utilizando o programa LAS v3.7 (Leica® Application Suite).

Tabela 5 – Medidas lineares mensuradas em diferentes regiões do corpo de espécimes fêmeas de *P. ater* de Saussure e *P. ghilianii* (Spinola).

Região do corpo	Abreviação	Descrição da medida linear
Cabeça; vértice (dorsal)	OM-CO	distância entre o ocelo médio e a carena occipital
	OL	distância entre os ocelos laterais
	OL-OC	distância entre o ocelo lateral e o olho composto
Cabeça (frontal)	CC	comprimento do clípeo
	LC	largura do clípeo

	RI	comprimento da região inter-antenal
	AV	diâmetro do alvéolo antenal
	MO	distância entre as reentrâncias dos olhos compostos
	OM-RI	distância entre o ocelo médio e a região interantenal
Mesossoma; mesepisterno (lateral)	AM-MM	distância entre o ápice do mesepisterno e o sulco mediano
	MM-BM	distância entre o sulco mediano e a base do mesepisterno
	PR-MM	distância entre o pronoto e o sulco mediano
	MM-ME	distância entre o sulco mediano e o mesepímero
Metassoma; tergo 1 (dorsal)	CT1	comprimento do ápice a base do T1
	LT1	largura da porção apical do T1
	CP	comprimento da porção basal do T1
	LP	largura da porção basal do T1
Metassoma; tergo 2 (dorsal)	CT2	comprimento da base ao ápice do T2
	LT2	largura da porção mediana do T2

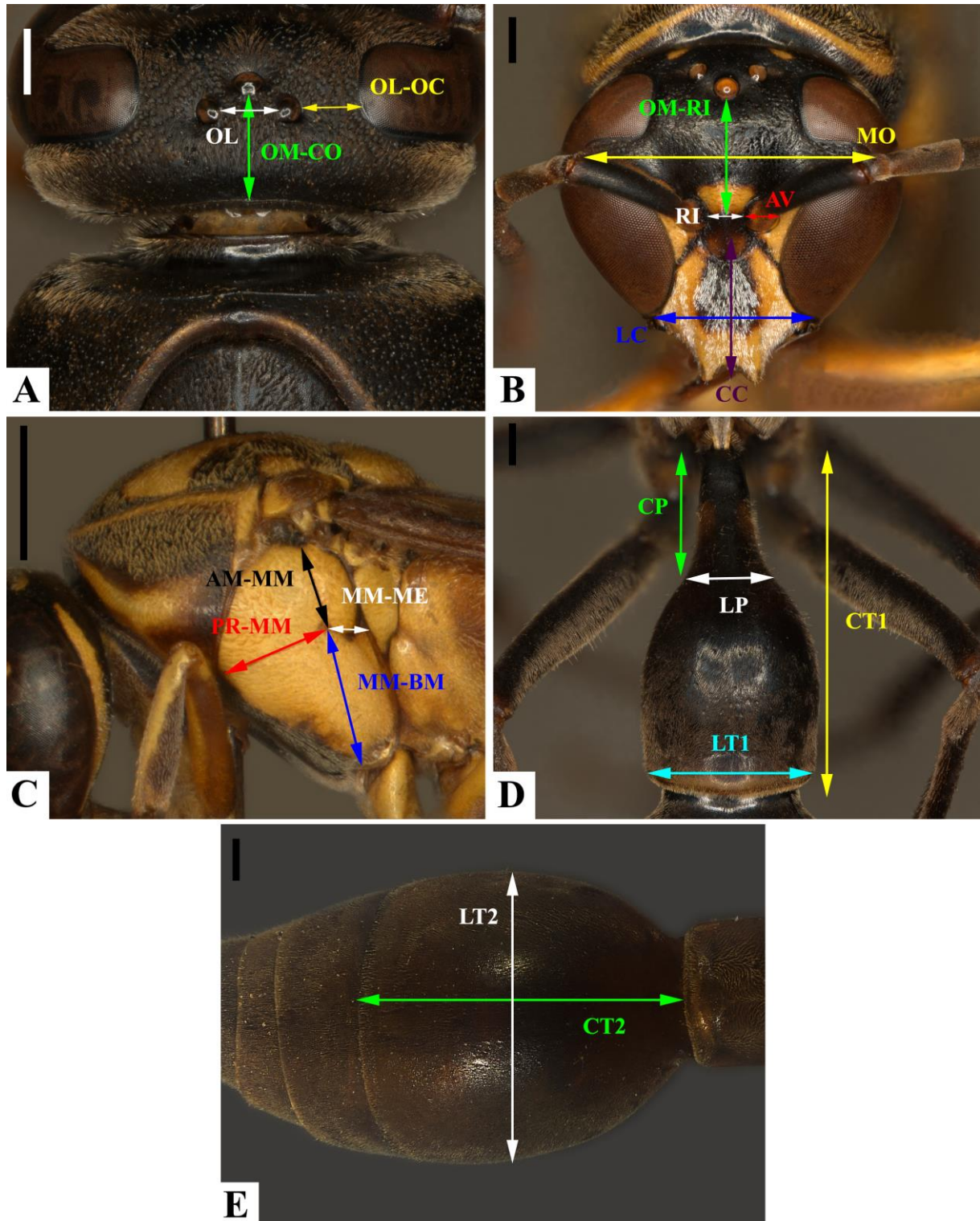
Fonte: Do Autor (2018).

Tabela 6 – Medidas relacionais (razões) em diferentes regiões do corpo de espécimes fêmeas de *P. ater* de Saussure e *P. ghilianii* (Spinola). As razões estabelecidas foram calculadas a partir de medidas lineares mensuradas isoladamente.

Região do corpo	Abreviação	Razão	Descrição da razão
Cabeça; vértice (dorsal)	R1	OM-CO/OL	distância: ocelo médio-carena occipital em relação ao comprimento entre os ocelos laterais
Cabeça (frontal)	R2	CC/LC	comprimento do clípeo em relação a largura do clípeo
	R3	RI/AV	comprimento da região inter-antenal em relação ao diâmetro do alvéolo antenal
	R4	MO/OM-RI	comprimento entre as reentrâncias dos olhos compostos em relação a distância: ocelo médio-região inter-antenal
Mesossoma; mesepisterno (lateral)	R5	AM-MM/MM-BM	distância: ápice do mesepisterno-sulco mediano em relação a distância: sulco mediano-base do mesepisterno
	R6	PM/MM	distância: pronoto-sulco mediano em relação a distância: sulco mediano-mesepímero
Metassoma; tergo 1 (lateral)	R7	CT1/LT1	comprimento do T1 em relação a largura do T1
	R8	CP/LP	comprimento da porção basal do T1 em relação a largura da porção basal do T1
Metassoma; tergo 2 (lateral)	R9	CT2/LT2	comprimento do T2 em relação a largura do T2

Fonte: Do Autor (2018).

Figura 5 – Regiões do corpo mensuradas nos estudos morfométricos para *Pachymenes ater* de Saussure e *P. ghiliani* (Spinola). São apresentadas as abreviações das medidas com cores correspondentes a região do corpo mensurada (as descrições de cada medida linear encontram-se na Tabela 5). A. cabeça; vértice (dorsal); B. cabeça (frontal); C. mesossoma; mesepisterno (lateral); D. metassoma; tergo 1 (dorsal); E. metassoma; tergo 2 (dorsal). A, D. *P. ater*; B, C e E. *P. ghiliani*. Barras de escala: 0,5 mm (A, B, D e E); 2 mm (C).



Fonte: Do Autor (2018).

Foram estimadas a média e os desvios-padrões das medidas lineares e das razões mensuradas para cada uma das espécies. A normalidade dos dados foi verificada através dos testes Shapiro-Wilki e Kolmogorov-Smirnov. Quando o conjunto de dados para cada medida linear ou razão não passou em algum dos testes de normalidade foi realizada a normalização dos dados através da transformação Box-Cox. Em casos em que a transformação Box-Cox mostrou-se ineficiente, utilizou-se a transformação de Johnson. Todas as análises estatísticas posteriores foram realizadas com os dados normalizados.

As variâncias para cada uma das medidas lineares e das razões foram submetidas a um teste F (nível de significância = 5%), já as médias foram submetidas a um teste *t* (nível de significância = 5%) para a comparação entre as duas espécies. Essas duas análises buscaram encontrar diferença significativas entre os caracteres contínuos (medidas lineares ou razões) entre as espécies, considerando os estimadores variância e média. A comparação entre as medidas foi importante para o estabelecimento de prováveis caracteres morfométricos que sejam informativos para a distinção entre *P. ater* e *P. ghilianii*. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados a partir do pacote *Action Stat v. 3.3.111.1178 build 2* (EQUIPE ESTATCAMP, 2014), emulando a linguagem R v. 3.3.2 (R CORE TEAM, 2015).

As medidas foram submetidas a uma Análise de Componentes Principais (PCA), buscando discriminar possíveis agrupamentos (com base nas medidas lineares e nas razões), através do programa PAST v.4 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2011). As PCAs para as medidas lineares e para as razões foram realizadas separadamente. Foi realizada ainda uma análise de correlação entre as medidas por meio da linguagem R v. 3.3.2 (R CORE TEAM, 2015) visando explorar a dependência entre as medidas estabelecidas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

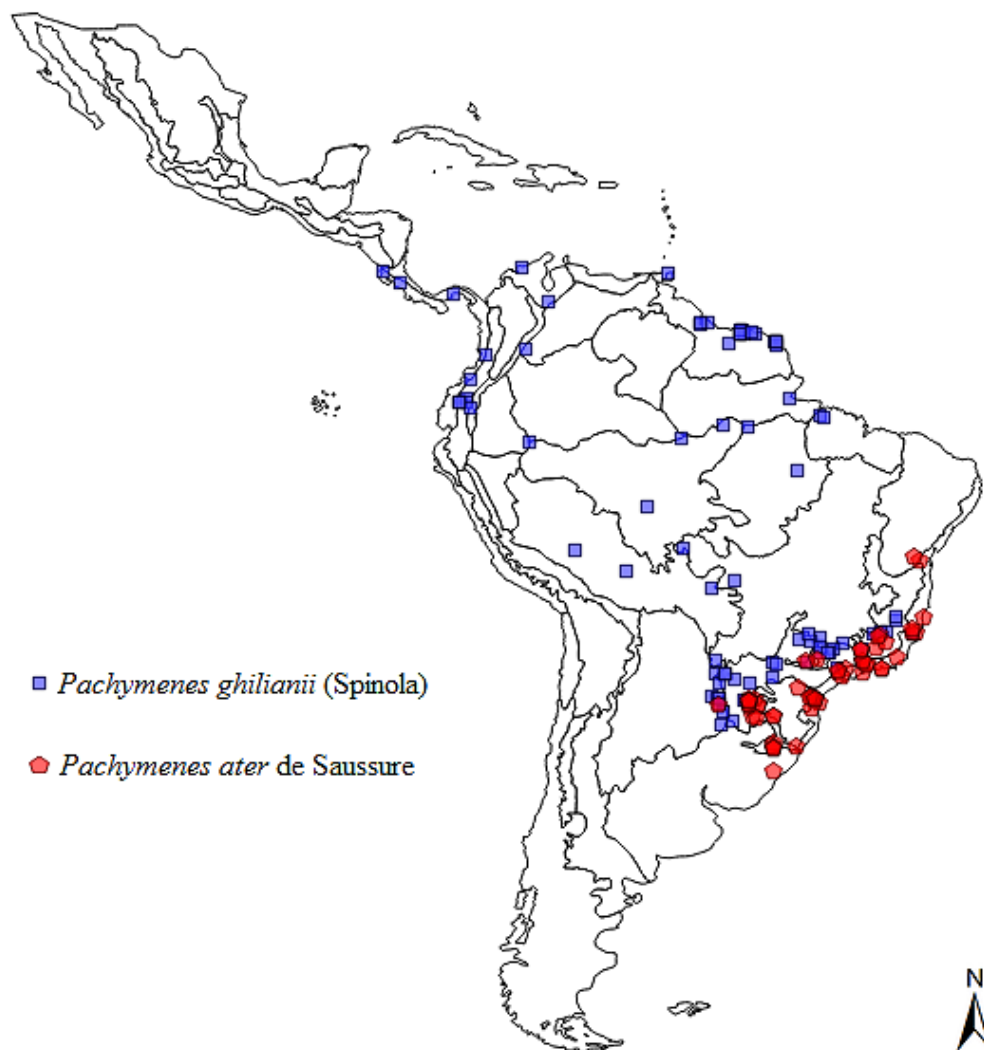
4.1 Distribuições geográficas, coloração do tegumento e PCA ecológica

Os registros de coleta de *P. ater* e *P. ghilianii* estão representados na FIGURA 6. A partir deles foi possível estimar a distribuição geográfica potencial das duas espécies, representada na FIGURA 7. Essa abordagem permitiu uma previsão dos habitats favoráveis à ocorrência das espécies em estudo (ELITH et al., 2011), o que pode auxiliar a delimitação de pontos focais para coletas em pesquisas futuras.

As duas espécies apresentam distribuição exclusivamente Neotropical, assim como as outras espécies de *Pachymenes* (GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015) (FIGURA 6). O

gap de amostragem no interior do continente sul-americano e na costa do Nordeste do Brasil reflete possivelmente o pouco esforço de amostragem nessas regiões – *shortfall* wallaciano (LOMALINO, 2004 citado por HORTAL et al., 2015). Por outro lado, os registros de ocorrência abundantes na região sudeste apontam para um maior esforço de coletas entomológicas nessa área, padrão também registrado para outros grupos de Eumeninae (RÊDA, 2016).

Figura 6 – Registros de coleta de *Pachymenes ater* de Saussure e *Pachymenes ghiliani* (Spinola) para a região Neotropical.



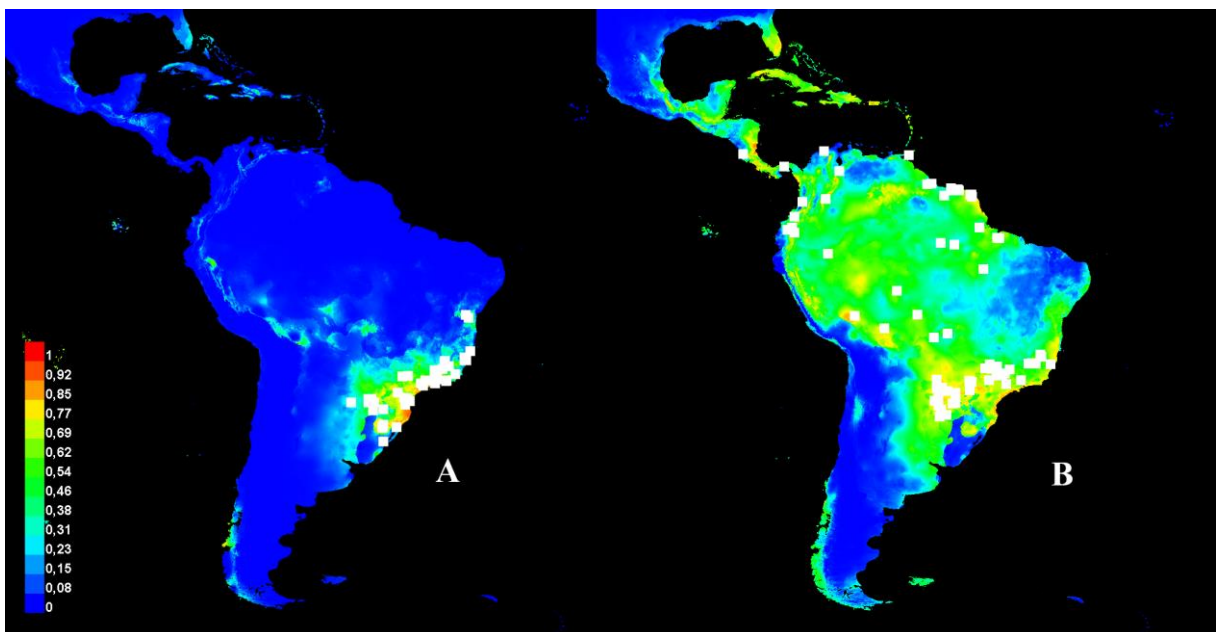
Fonte: Do Autor (2018)

No Brasil, a amostragem de artrópodes terrestres se concentra em locais com rotas de fácil acesso e próximas a aglomerações urbanas (OLIVEIRA et al., 2016). Além disso, certas regiões geográficas são historicamente negligenciadas por biogeógrafos e taxonomistas

resultando em *gaps* de conhecimento para grupos de organismos e regiões específicas (DINIZ-FILHO, 2010; SANTOS et al., 2011). Não são surpreendentes, portanto, os registros de coleta pouco abundantes para as espécies em estudo na floresta Amazônica e na região Nordeste, quando comparados a concentração de registros de coleta na Floresta Atlântica.

Existe realmente uma maior densidade de amostragem de artrópodes para a Floresta Atlântica quando comparada à Amazônia (OLIVEIRA et al., 2016). Já para a região nordeste, em que há predomínio do bioma Caatinga (floresta sazonal seca), há uma tendência histórica de negligência por parte dos pesquisadores (SANTOS et al., 2011). Aumentar o esforço de amostragem na região Amazônica e na Caatinga é um importante passo não só para suprir um *shortfall* de conhecimento que existe para as espécies alvo deste estudo, como também para outros grupos de Eumeninae que exibem um padrão similar – por exemplo, o gênero *Pseudodynerus* Saussure (RÊDA, 2016).

Figura 7 – Distribuições potenciais das espécies *Pachymenes ater* de Saussure (A) e *Pachymenes ghiliani* (Spinola) (B) gerada a partir do programa MaxEnt 3.3.3.K. A barra de cores lateral representa a adequação às condições ambientais, variando do azul (0) como pouco adequado para ocorrência da espécie até o vermelho (1) como adequado.



Fonte: Do Autor (2018).

Pachymenes ghiliani demonstra uma distribuição geográfica potencial mais ampla que *P. ater* (FIGURA 7B), que corresponde a pontos de coleta mais dispersos. Os registros de coleta vão desde o centro-sul do Brasil, Argentina e Paraguai, até as Guianas, Trindad & Tobago, Equador, Colômbia, Suriname, Costa Rica e Panamá. Compreende uma espécie

encontrada tanto em domínios amazônicos quanto na Floresta Atlântica, Pantanal e Cerrado, quando considerado o território brasileiro. Não há registros de coleta na costa do continente, mesmo sendo esta uma região bem amostrada para Eumeninae, em especial na Região Sudeste (RÊDA, 2016).

Pachymenes ater apresenta uma distribuição geográfica potencial mais restrita (FIGURA 7A), com registros de coleta concentrados na região sudeste da América do Sul, sendo coletado na Argentina, Paraguai e Brasil. No último país, os registros de coleta perfazem os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia. Não há registros de coleta para *P. ater* no centro do continente, assim como não foi registrada a presença dessa espécie na Região Amazônica. Boa parte da distribuição de *P. ater* segue o padrão típico de elementos faunísticos da Floresta Atlântica (CARNAVAL; MORITZ, 2008), portanto, pode-se levantar a hipótese da origem dessa espécie associada a esse bioma.

Existe sobreposição das distribuições geográficas de *P. ater* e *P. ghiliani*. Nas populações simpátricas, todavia, há uma diferenciação marcante da coloração do tegumento nos indivíduos de cada uma das espécies. Enquanto espécimes de *P. ater* são tipicamente negro-acastanhados, com nenhuma ou poucas manchas amarelo-pálido (FIGURA 8A), os indivíduos determinados como *P. ghiliani* têm tegumento castanho, com abundantes manchas amarelas (FIGURA 8B). Esse tipo de coloração do corpo foi verificado para a maioria dos exemplares examinados de *P. ghiliani*. Entretanto, quando considerada sua ampla distribuição geográfica, a variação cromática intraespecífica em *P. ghiliani* é bem mais ampla, o espectro da coloração do tegumento vai desde espécimes da coloração típica acastanhada com manchas amarelas até espécimes com tegumento enegrecido (FIGURA 8B, C, D e E).

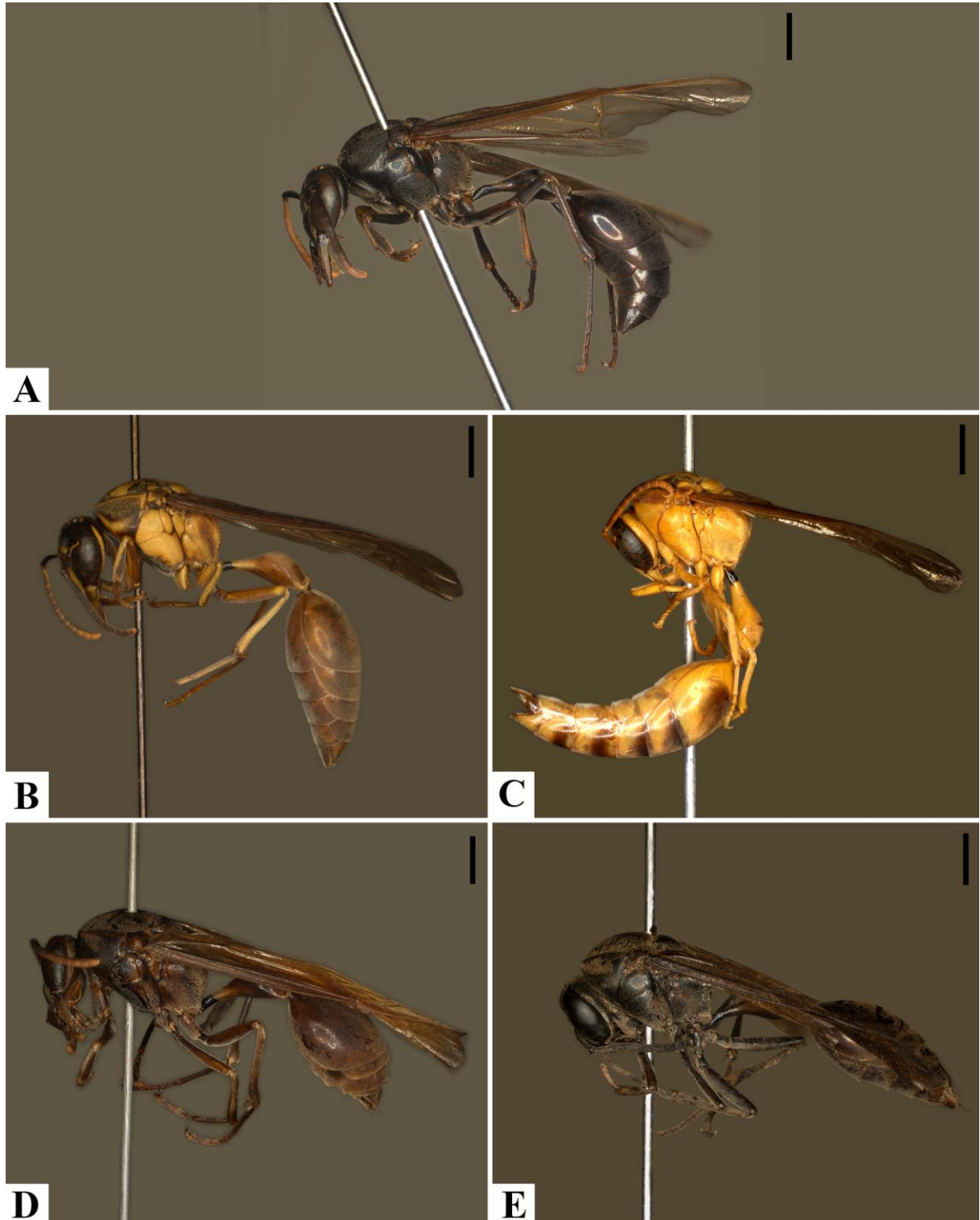
Espécimes de *P. ghiliani* em que coloração melânica (tegumento enegrecido) predomina possuem registros na região norte do Brasil (Amazonas), Equador, Costa Rica e Peru, enquanto espécimes de coloração amarelo-acastanhada possuem uma distribuição potencial mais abrangente. Um espécime macho com tegumento amarelo, com poucas manchas castanhas, foi registrado para Trindad & Tobago, todavia a ausência de manchas castanhas pode ser contestada devido à idade e condições de preservação do material (coletado em 1963) (FIGURA 8C). Um exemplar de *P. ghiliani* com tegumento totalmente enegrecido foi observado, sendo proveniente da Costa Rica (FIGURA 8E). Além desse exemplar, nenhum outro espécime com tegumento completamente negro foi examinado.

Todos os outros espécimes examinados apresentavam manchas castanhas ou amarelas no tegumento.

A influência de fatores climáticos no padrão de coloração do tegumento pode representar uma explicação para a variação cromática em *P. ghiliani*. Como já reportado por outros autores (MACLEAN; CHANDLER; MACLEAN, 1978; BEQUAERT, 1944), a coloração de vespídeos sofre variação dependo de fatores ambientais, como umidade e temperatura. Como a distribuição geográfica de *P. ghiliani* é mais ampla, a quantidade de variação intraespecífica quanto a coloração pode ser explicada por essa espécie ter invadido diferentes áreas geográficas, com condições climáticas que predispuseram diferentes colorações de tegumento (variando do tegumento completamente negro ao castanho-amarelado). Por outro lado, a espécie *P. ater* com distribuição mais restrita apresenta uma uniformidade maior quanto à coloração do corpo, sendo o padrão negro predominante.

Adicionalmente como já discutido por outros autores (HERMES; OLIVEIRA, 2016), o padrão melânico é comum em espécies de himenópteros que ocorrem em áreas florestadas, enquanto que o padrão amarelado pode estar relacionado com a ocorrência em áreas abertas e secas. Assim, no caso específico de *P. ater* a coloração enegrecida predominante tem provável relação com sua distribuição associada a fragmentos de Floresta Atlântica. Já a variação registrada para *P. ghiliani* pode estar relacionada com sua ocorrência tanto em áreas de mata fechada quanto em áreas abertas, o que coincide com seu padrão de distribuição mais amplo.

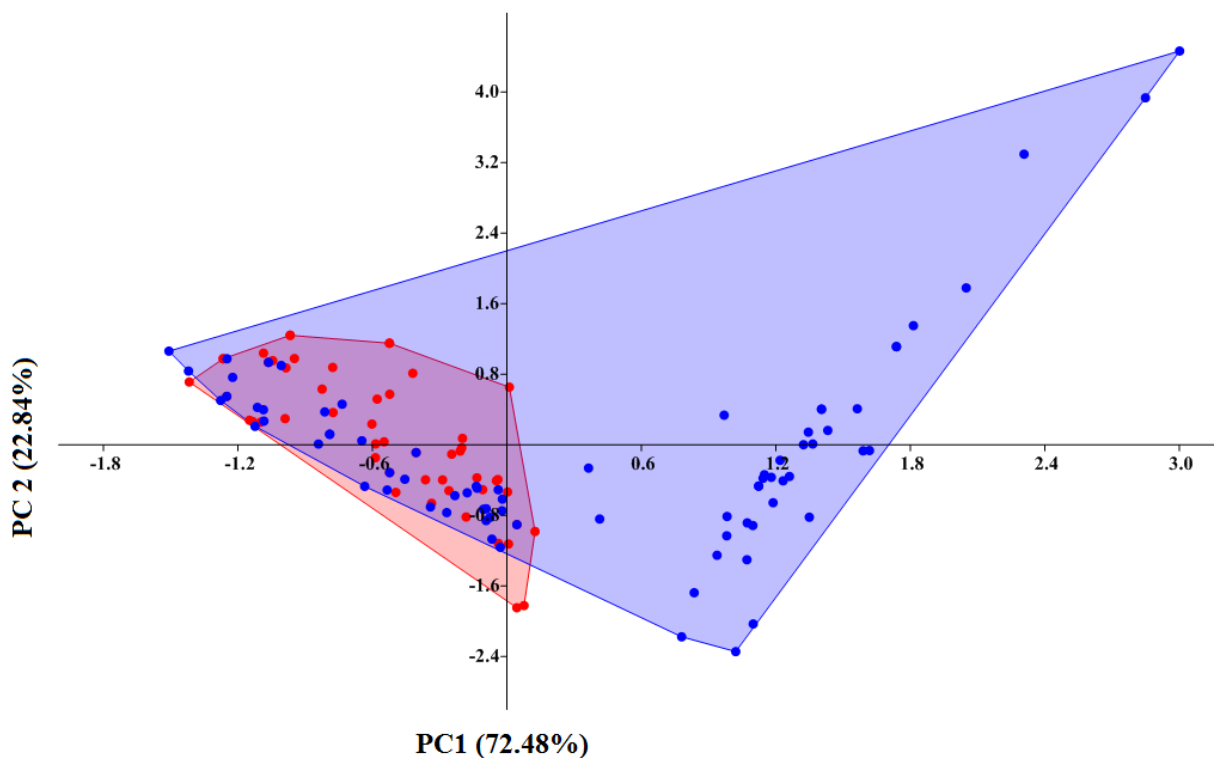
Figura 8 – Variação cromática: hábito, A. *Pachymenes ater* de Saussure; B, C, D e E. *Pachymenes ghilianii* (Spinola). Barras de escala: 2 mm.



Fonte: Do Autor (2018).

A PCA retornada a partir de 19 variáveis ecológicas baseadas nos registros de coletas dessas duas espécies também demonstrou uma maior variância dos dados para *P. ghiliani* quando comparada a *P. ater* (FIGURA 9). O primeiro componente principal (PC1) explicou 72,48% da variação, provavelmente devido a amplitude de variação demonstrada para as variáveis climáticas obtidas dos pontos de coleta de *P. ghiliani*. Mesmo não sendo informativas para separar as duas espécies em grupos distintos, havendo sobreposição para as variáveis ecológicas, a PCA fornece uma noção geral sobre a variação ecológica dessas duas espécies. Do mesmo modo que existe uma amplitude maior da variação da coloração do tegumento para *P. ghiliani*, também é verificada uma amplitude maior de variação para as variáveis ecológicas selecionadas.

Figura 9 – PCA baseada em 19 variáveis ecológicas obtidas dos registros de coleta de *Pachymenes ater* de Saussure e *Pachymenes ghiliani* (Spinola). Em parênteses a variância explicada pela primeira e segunda PCs. Círculos: vermelhos – *P. ater*; azuis – *P. ghiliani*.



Fonte: Do Autor (2018).

É provável que a variação total dos dados ecológicos (variáveis climáticas) seja maior em *P. ghiliani* dada à distribuição geográfica mais ampla dessa espécie. Uma vez que ocorre em um espaço geográfico mais amplo, a dispersão dos pontos referentes as diferentes

variáveis climáticas é maior. Já *P. ater* possui variação menos dispersa para as variáveis climáticas que pode ser comparada a sua uniformidade cromática e distribuição mais restrita.

A partir dos registros de coleta, distribuição potencial e PCA gerada por meio das variáveis ecológicas não foi possível reconhecer essas duas espécies em agrupamentos distintos. É possível que a sobreposição distribucional para *P. ater* e *P. ghilianii* indique também uma sobreposição de nichos ecológicos fundamentais (SEVERTSOV, 2012), visto que as espécies têm modo de vida similar. Consideramos, portanto, que para avaliar se as duas espécies realmente podem ser separadas em nichos ecológicos (ou zonas adaptativas) distintos (VAN VALEN, 1976 citado por DE QUEIROZ, 1998) uma avaliação mais refinada é necessária. A partir de nossas análises as espécies *P. ater* e *P. ghilianii* apresentam sobreposição parcial para variáveis ecológicas que compõem seus nichos, sendo que *P. ghilianii* tem uma variação mais destacada que *P. ater*.

Estudos futuros podem explorar o comportamento de nidificação e o uso de diferentes recursos por essas duas espécies buscando entender componentes que diferenciam seus nichos ecológicos. Aspectos como a arquitetura e modo de construção de ninhos (p. ex. HERMES; SOMMAVILA; GARCETE-BARRETT, 2013; HERMES; ARAÚJO; ANTONINI, 2015) e espécies de presa capturadas (p. ex. VARGAS et al., 2014) podem ser informativos para diferenciação de espécies de Eumeninae, constituindo pontos de partida interessantes para se buscar a distinção dos nichos ecológicos efetivos de *P. ater* e *P. ghilianii*.

4.2 Estudos moleculares

4.2.1 Procedimentos laboratoriais

Foi extraído DNA dos 22 espécimes selecionados para os estudos moleculares, sendo 70 µL de DNA de cada exemplar (amostra) utilizado nos procedimentos de bancada e 70 µL mantido em estoque (material armazenado no LSBI/UFLA). Os ensaios laboratoriais foram conduzidos para todas as amostras, todavia apenas 17 obtiveram sucesso na amplificação para algum dos marcadores moleculares. Foi obtida eficiência na amplificação para os marcadores moleculares mitocondriais: COI (16 amostras) e COII (12 amostras), e insucesso para o marcador molecular CytB (TABELA 7).

Tabela 7 – Lista de amostras (espécimes) e efetividade da amplificação para diferentes sequências gênicas mitocondriais: citocromo oxidase subunidade I (COI); citocromo oxidase subunidade II (COII); citocromo B (CytB). As amostras em que a amplificação foi eficiente estão assinaladas com um “x”.

Especificações das amostras			Marcador molecular		
Código	Espécie	Armazenamento	COI	COII	CytB
PAAT01	<i>P. ater</i>	álcool (90%)	x	x	-
PAAT02	<i>P. ater</i>	álcool (90%)	-	x	-
PAAT03	<i>P. ater</i>	via seca	x	x	-
PAAT04	<i>P. ater</i>	via seca	x	x	-
PAAT05	<i>P. ater</i>	via seca	x	x	-
PAAT06	<i>P. ater</i>	via seca	x	x	-
PAAT07	<i>P. ater</i>	via seca	x	x	-
PAGH01	<i>P. ghilianii</i>	via seca	x	x	-
PAGH02	<i>P. ghilianii</i>	via seca	x	x	-
PAGH03	<i>P. ghilianii</i>	via seca	x	-	-
PAGH04	<i>P. ghilianii</i>	via seca	x	-	-
PAGH05	<i>P. ghilianii</i>	via seca	x	-	-
PAGH06	<i>P. ghilianii</i>	via seca	x	-	-
PAGH07	<i>P. ghilianii</i>	via seca	x	x	-
PAGH08	<i>P. ghilianii</i>	via seca	x	-	-
PAGH09	<i>P. ghilianii</i>	via seca	x	x	-
PAGH10	<i>P. ghilianii</i>	via seca	-	-	-
PAGH11	<i>P. ghilianii</i>	via seca	-	-	-
PAGH12	<i>P. ghilianii</i>	via seca	-	-	-
PAGH13	<i>P. ghilianii</i>	via seca	-	-	-
PAGH14	<i>P. ghilianii</i>	via seca	-	-	-
PASE01	<i>P. sericeus</i>	álcool (90%)	x	x	-

Fonte: Do Autor (2018).

Obtivemos bons resultados na extração de DNA tanto de espécimes preservados a seco quanto de espécimes mantidos em via úmida (álcool 90%). Todavia, para os espécimes alfinetados (via seca), apenas exemplares coletados há no máximo 10 anos tiveram DNA amplificado. Para espécimes muito antigos, como PAGH11 (ano de coleta: 1985) e PAGH12 (ano de coleta: 1976) não obtivemos sucesso na amplificação.

A extração de DNA de material de museus preservados há um tempo relativamente longo vem sendo uma prática recorrente em estudos moleculares (WANDELER; HOECK; KELLER, 2007; MITCHELL, 2015). No caso dos insetos em que tradicionalmente para a maioria dos grupos o armazenamento é realizado em via seca, sendo os espécimes alfinetados, a preservação e integridade do DNA pode ser prejudicada (MITCHELL, 2015). Entretanto

ainda assim conseguimos obter sequências de qualidade, amplificando regiões que são utilizadas como *barcodings* para a delimitação de espécies.

Não obtivemos sucesso na amplificação do marcador CytB nos ensaios iniciais para a nenhuma das amostras, mesmo com o uso de albumina para potencializar a amplificação de material proveniente de exemplares preservados a seco. Este marcador não foi, portanto, incluído nas análises posteriores. O uso de outro marcador molecular mitocondrial, todavia, seria pouco informativo, uma vez que genes mitocondriais não sofrem recombinação e se segregam como uma unidade única (BAUM; SMITH, 2012). Portanto, para estudos futuros sugerimos a busca por regiões gênicas nucleares que possam contribuir com mais informação para delimitar essas duas espécies.

Existem estudos com vespídeos que eficientemente amplificaram sequências de CytB (por exemplo MENEZES et al., 2015), mas a eficiência desse marcador molecular nem sempre é garantida para himenópteros, em especial, tratando-se de material preservado a seco (ZHANG; RIDENBAUGH; SHARANOWSKI, 2017). É provável que a ineficiência da amplificação para este marcador em nosso estudo também tenha relação com o uso de espécimes preservados a seco (maior parte de nossas amostras). Novos ensaios podem ser realizados com outros grupos de Eumeninae para demonstrar a validade desta região gênica para estudos moleculares na subfamília.

4.2.2 Matrizes de dados e modelos de substituição

Sequências de boa qualidade (> 80%) foram obtidas para 16 e 12 amostras, respectivamente, para o marcador molecular COI [472 pares de base (pb)] e para COII (617 pb), constituindo duas matrizes iniciais que foram alinhadas independentemente. A matriz final com dados concatenados foi constituída por 17 terminais e 1089 caracteres. A parte inicial da matriz (posições 1-472) correspondeu aos dados referentes as sequências de COI, e a porção final (posições 473-1089) aos dados referentes as sequências de COII. Dos 1089 caracteres, 841 caracteres são constantes, 185 informativos para parcimônia, e 63 não informativos, mas variáveis.

A análise no PartitionFinder2 (LANFEAR et al., 2016) retornou o esquema de partição e modelos de evolução molecular indicados na TABELA 8. A partição dos dados é relevante para seleção dos modelos de evolução molecular, uma vez que cada lócus pode apresentar taxas de evolução diferentes, e dentro de uma região gênica particular cada posição de códon

pode evoluir a seu próprio modo (para genes codificadores de proteínas) (YANG, 2014; BAUM; SMITH, 2012).

Tabela 8 – Modelos de substituições nucleotídicas selecionados para cada uma das posições de códon dos dois loci mitocondriais sequenciados. Os modelos foram determinados a partir do PartitionFinder 2.0.

Lócus	Posição de códon		
	1ª	2ª	3ª
COI e COII	HKY85 (HASEGAWA; KISHINO; YANO, 1985)	F81 (FELSENSTEIN, 1981)	GTR + I (TAVARÉ, 1986)

Fonte: Do Autor (2018).

A partição dos dados e os modelos de substituição foram considerados para os métodos probabilísticos de inferência filogenética (ML e BI). Esses métodos incorporam na análise informações sobre como os caracteres moleculares evoluem explicitamente (por isso são denominados métodos baseados em modelos). Para a MP foi utilizado o esquema de pesagem igual dos caracteres. Nesse caso, não são incluídas explicitamente na análise suposições sobre a evolução dos caracteres, mesmo que implicitamente eles sejam tratados como evoluindo na mesma taxa – similar ao modelo mais simples de evolução molecular (YANG; RANNALA, 2012; YANG, 2014).

4.2.3 Análises filogenéticas

Para o método de MP com os dados concatenados (COI + COII), considerando a pesagem igual dos caracteres, foram encontradas cinco árvores igualmente parcimoniosas, sendo sumarizadas em uma árvore de consenso estrito (FIGURA 10). Os valores de comprimento da árvore (L), índice de consistência (Ci) e índice de retenção (Ri) para esta análise foram respectivamente 306, 90 e 95.

Mesmo que muitas das relações internas entre os terminais não tenham sido esclarecidas, a presença de dois agrupamentos distintos para *P. ater* (FIGURA 10; retângulo vermelho) e *P. ghilianii* (FIGURA 10; retângulo azul) constituindo dois grupos monofiléticos foi evidenciada. Estes dois grupos monofiléticos apresentaram valores de suporte de ramo,

estimados por *bootstrap* (BS), elevados (*P. ater*: BS = 100; *P. ghiliani*: BS = 100) e o seguinte número de sinapomorfias: *P. ater* = 34; *P. ghiliani* = 90.

Para as análises independentes dos loci foram encontradas quatro árvores igualmente parcimoniosas tanto para o COI (L = 139; Ci = 89; Ri = 96) quanto para o COII (L = 166; Ci = 92; Ri = 96), sendo essas também sumarizadas em árvores de consenso estrito (FIGURAS 11 e 12). Os dois grupos monofiléticos distinguindo elementos pertencentes a cada uma das duas espécies também foram recuperados com valores relativamente altos para o suporte dos ramos (COI – *P. ater*: BS = 59; *P. ghiliani*: BS = 100; COII – *P. ater*: BS = 100; *P. ghiliani*: BS = 100). Apenas para a análise com COI isoladamente, o ramo agrupamento elementos de *P. ater* apresentou um valor de suporte menor que 60%.

Examinando a árvore com dados concatenados, em *P. ater* dois agrupamentos monofiléticos distintos se sobressaíram, ambos com suporte de ramos elevados: (*PAAT03* + *PAAT06* + *PAAT07*) (BS = 87; 4 sinapomorfias) e (*PAAT01* + *PAAT02* + (*PAAT04* + *PAAT05*)) (BS = 100; 19 sinapomorfias). Já para *P. ghiliani* a maioria dos terminais partem de uma politomia, sendo um único agrupamento distinto recuperado: (*PAGH05* + *PAGH02*) (BS = 63; uma sinapomorfia). Topologias similares que se alteram em algumas relações internas devido a terminais faltantes foram encontradas nas análises dos loci isolados, sendo a presença de dois grupos distintos dentro de *P. ater* um padrão comum em todas as três análises utilizando MP (COI + COII, COI, COII).

O uso da MP apresenta a vantagem de nos permitir enxergar a evidência que nos garante chamar um grupo de monofilético, isto é, as sinapomorfias (ASSIS, 2015). A partir de nossos resultados, existem sinapomorfias no nível genético, para os marcadores moleculares mitocondriais COI e COII, que suportam *P. ater* e *P. ghiliani* como espécies distintas (grupos monofiléticos independentes). Também existe evidência similar de que em *P. ater* há uma divergência entre duas linhagens com diferenciação, ao menos, em nível molecular para os marcadores utilizados com o uso da MP.

Por meio do método de MP foi possível recuperar a monofilia recíproca de *P. ater* e *P. ghiliani* tanto para a análise combinada (COI + COII) quanto para as análises dos loci independentes. Mesmo a MP sendo um método pouco evocado para estudos moleculares, e por vezes considerada ultrapassada (YANG, 2014; BAUM; SMITH, 2013), entendemos como relevante apresentar estes resultados, demonstrando que o método ainda é útil ao tratar determinados problemas (por exemplo, a inferência das sinapomorfias). Além disso, defendemos a posição que os princípios por trás da MP, assim como sua base histórica e filosófica, têm uma implicação importante para sistemáticas em formação, e não devem ser

ignorados frente aos métodos probabilísticos (para posições similares consultar: WILEY; LIEBERMAN, 2011; WHEELER, 2012).

A análise de ML para os dados concatenados (COI + COII) recuperou os agrupamentos monofiléticos *P. ater* e *P. ghiliani* com altos valores de *bootstrap* [*P. ater* (retângulo vermelho): BS = 99.5; *P. ghiliani* (retângulo azul): BS = 100] (FIGURA 13). A monofilia recíproca das duas espécies foi recuperada nessa análise, assim como nas análises independentes dos loci (valores de BS: COI – *P. ater* = 61,4; *P. ghiliani* = 100; COII – *P. ater* = 100; *P. ghiliani* = 100) (FIGURAS 14 e 15). De modo similar a MP, o suporte de ramos mais baixo foi verificado para *P. ater* quando considerado o locus COI isoladamente.

Para a análise de ML com os dados concatenados não foram recuperada as mesmas relações entre os terminais dentro de *P. ater* quando comparada a MP. Apesar disso, a divergência genética maior (ramo longo) no agrupamento formado por (*PAAT04* + *PAAT02* + *PAAT05* + *PAAT01*) (BS = 99.5) demonstra que existe alguma diferenciação genética entre os elementos incluídos em *P. ater*. As amostras que formam este agrupamento mais divergente também foram recuperadas como proximamente relacionadas quando consideradas as análises independentes dos dois loci. Já para *P. ghiliani* existiu uma resolução maior das relações internas quando utilizado o método de ML em relação a MP tanto para a análise com dados concatenados assim como para as análises independentes dos loci.

Do mesmo modo que as análises por MP e ML, o método de BI para os dados concatenados (COI + COII) também recuperou *P. ater* e *P. ghiliani* como grupos monofiléticos (FIGURA 16). Os valores de probabilidade posterior (PP) para *P. ater* (retângulo vermelho; FIGURA 16) e *P. ghiliani* (retângulo azul; FIGURA 16) foram máximos (PP = 1), significando alta confiança para o suporte dos ramos. Para as análises independentes as duas espécies foram recuperadas como monofiléticas com valores altos para a probabilidade posterior (PP: COI – *P. ater* = 0.9984; *P. ghiliani* = 1; COII – *P. ater* = 1; *P. ghiliani* = 1) (FIGURAS 17 e 18). Do mesmo modo que ocorreu nas análises MP e ML, o suporte para *P. ater*, quando considerado apenas o locus COI, apresentou um valor de PP abaixo do valor máximo (1,0).

Considerando as relações internas entre os terminais nos clados correspondendo a cada uma das espécies, o método de BI para os dados concatenados apresentou resultado similar à ML e à MP quando considerado *P. ater*. Já para *P. ghiliani* as relações internas são mais conflitantes quando comparados os três métodos. Novamente, assim como na ML, um ramo longo agrupando (*PAAT01* + *PAAT02* + *PAAT04* + *PAAT05*) foi recuperado para *P. ater*.

Valores elevados de PP são esperados para análises Bayesianas, uma vez que este tipo de abordagem tende a inflacionar os valores de suporte (YANG, 2014). A correspondência das topologias recuperadas para esta análise com aquelas inferidas por meio dos outros métodos reforçam a confiabilidade dos resultados apresentados. Nossa hipótese principal, a monofilia recíproca entre as duas espécies, através das sequências utilizadas, não foi refutada por nenhuma das três análises.

Em todas as análises foram recuperados dois grupos monofiléticos bem suportados reunindo elementos de cada uma das duas espécies, corroborando a distinção entre *P. ater* e *P. ghiliani* para sequências de COI e COII combinadas e isoladas. Dentro de *P. ater* foi recuperado em todas as análises um grupo monofilético formado por PAAT01, PAAT04, PAAT05 e PAAT02 (quando este terminal está presente). As relações internas entre os terminais de *P. ghiliani* flutuaram bastante entre as análises. Para essa espécie, mesmo com amostras advindas de regiões geográficas bastante distintas (por exemplo: Amazônia, Paraguai e Minas Gerais), um grupo monofilético destacado do restante não foi recuperado com altos valores de BS ou PP.

Uma vantagem dos métodos probabilísticos quando comparados a MP é a possibilidade de se extrair informação sobre o comprimento dos ramos (YANG; RANNALA, 2012). Na análise de ML, assim como na BI, os ramos no interior de *P. ghiliani* são mais curtos, enquanto que em *P. ater* existe uma diferença marcante com a formação de um ramo longo no grupo supracitado [PAAT01, PAAT04, PAAT05 e PAAT02 (quando presente)].

Essa divergência genética em *P. ater* merece destaque uma vez que essa espécie apresenta distribuição geográfica mais restrita e uma maior uniformidade cromática. É interessante notar, entretanto, que existe variação expressiva quanto a genitália masculina para *P. ater*, quando consideramos as projeções do gonocoxito (GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015). Assim, mesmo a aparente uniformidade morfológica externa pode ser contrastada com a divergência molecular e a diferenciação quanto a caracteres relacionados a genitália masculina.

Fatores relacionados à distribuição típica de floresta Atlântica de *P. ater* poderiam auxiliar na explicação para essa divergência genética e diferenciação quanto a genitália masculina nos elementos que formam esse grupo monofilético, incluindo a hipótese de fragmentos de mata funcionando como ilhas de isolamento genético (CARNAVAL et al, 2009; MENEZES et al., 2017). Isso poderia ser verificado com um estudo filogeográfico futuro mais abrangente reunindo mais exemplares de *P. ater*, assim como análises da genitália masculina de exemplares de populações específicas. Como nosso objetivo principal era a

distinção das duas espécies, essas questões podem ser exploradas em outros estudos que visam entender a estruturação genética e possível isolamento das populações de *P. ater*.

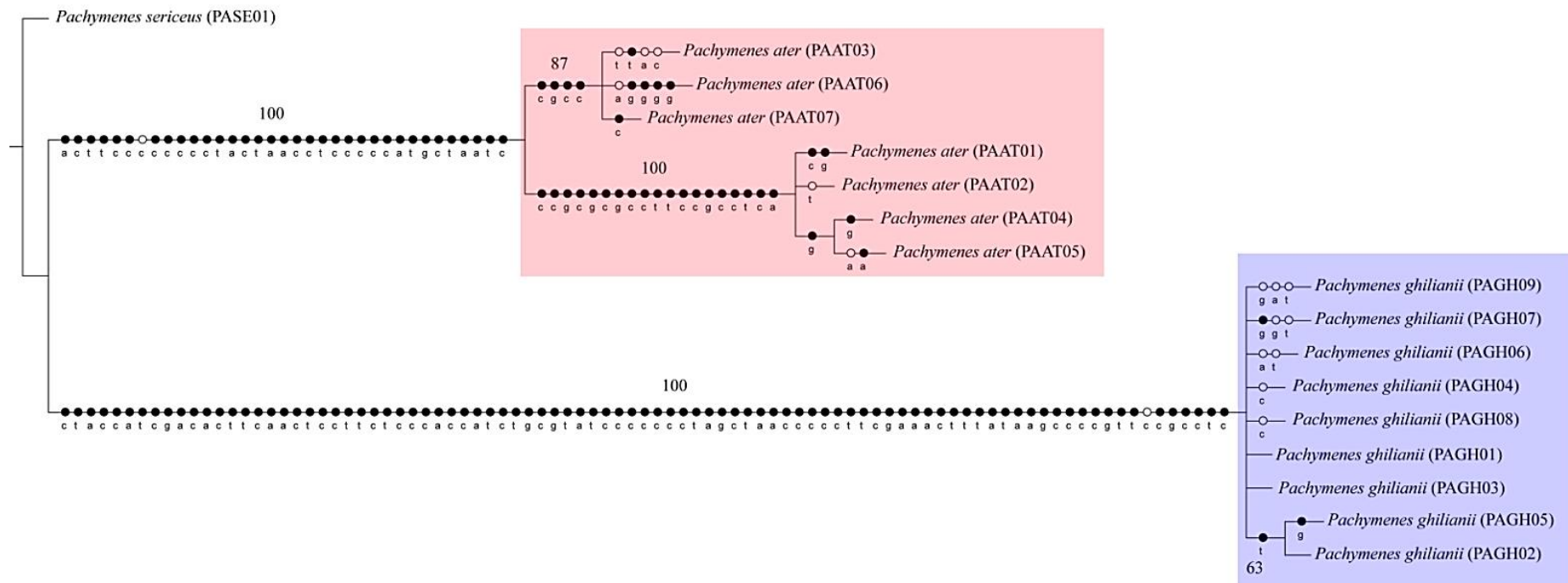
Mesmo que o uso exclusivo de DNA *barcoding* (em especial, o gene COI) seja discutível para o reconhecimento de espécies (CARVALHO et al., 2007; CARVALHO et al., 2008), sua aplicação pode ter validade na delimitação dos limites específicos entre duas unidades taxonômicas problemáticas quando aliado a outras fontes de evidência (DESALLE, 2006 citado em CARVALHO et al., 2008). Essa abordagem vem sendo utilizada explicitamente ou implicitamente por taxonomistas interessados em solucionar problemas de delimitação de espécies em diferentes grupos de estudo (GOULDING; DAYRAT, 2016), incluindo vespídeos (p. ex., NEUMEYER et al., 2014).

Considerando o Conceito Monofilético de Espécies (uma ramificação dos “conceitos filogenéticos”, MISHLER; THERIOT, 2000), ou o Conceito de Espécie como Linhagem *sensu* DE QUEIROZ (1998; 1999; 2005a; 2005b; 2005c; 2007) (levando em conta a monofilia recíproca como um critério) podemos acrescentar mais uma evidência a hipótese de que *P. ater* e *P. ghilianii* são entidades distintas, reconhecidas ao nível de espécie, com a monofilia recíproca recuperada a partir das sequências dos marcadores moleculares COI e COII. A proposta inicial em nível morfológico de duas espécies distintas segundo as revisões mais recentes (GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015; GIORDANI SOIKA, 1990), manteve-se também em nível molecular, ao menos, para as sequências de genes mitocondriais utilizadas.

O uso de marcadores moleculares mitocondriais mostrou-se informativo para a distinção entre as duas espécies, utilizando três critérios de otimalidade filogenéticos diferentes. Reforçamos a importância do uso de outros critérios, como a morfologia, para apoiar nossos resultados moleculares. Consideramos, entretanto, o uso de genes mitocondriais válido para este tipo de problema taxonômico e sinalizamos para que estes marcadores também possam ser utilizados em outros estudos com Eumeninae.

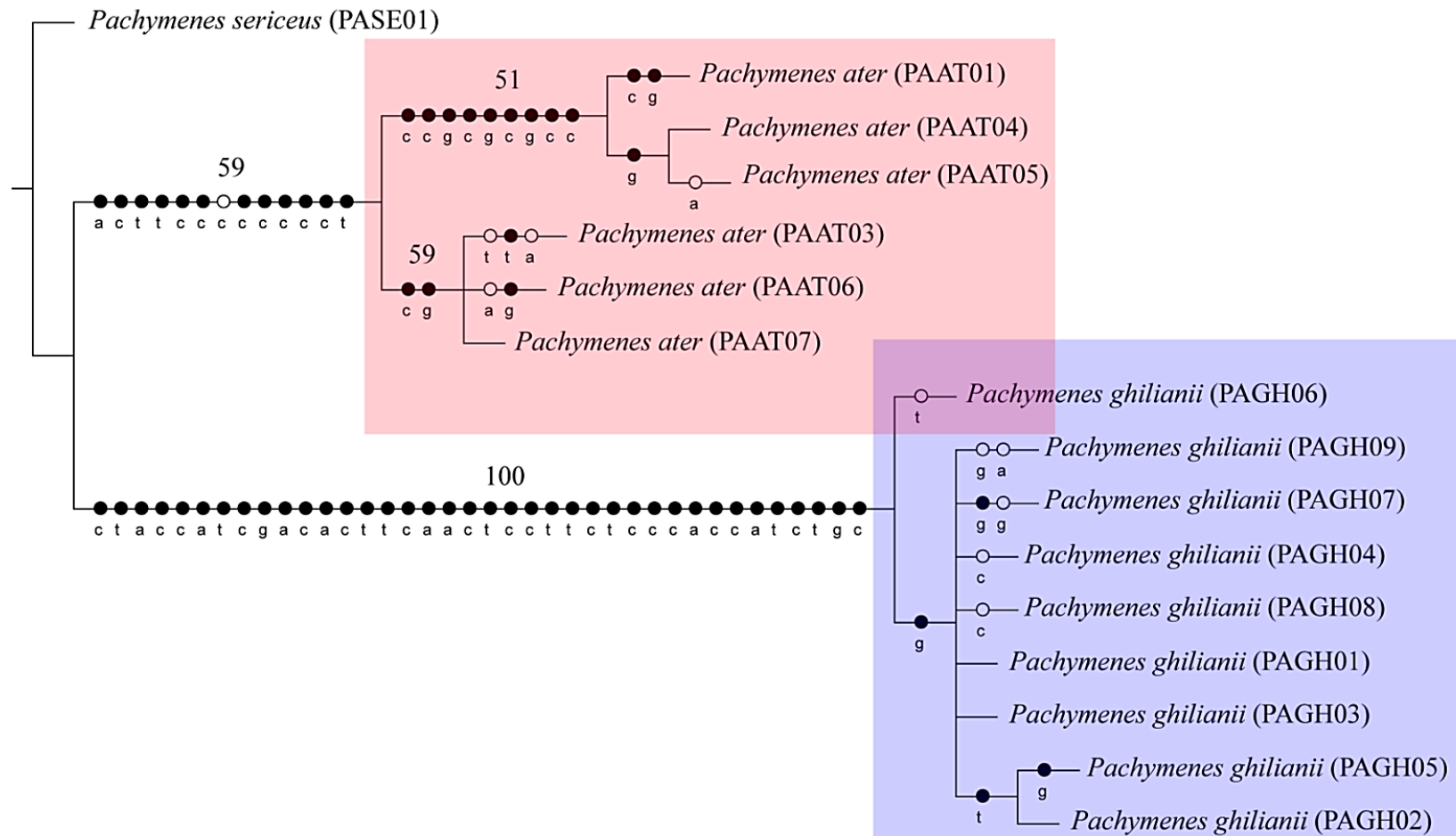
O uso de novas regiões gênicas, como sequências nucleares (NEUMEYER et al., 2014), assim como a inclusão de terminais de localidades não amostradas, podem somar mais evidências a nossa hipótese de trabalho. Uma análise multigênica, utilizando além dos marcadores moleculares mitocondriais, genes nucleares, é indicada uma vez que as árvores de genes recuperadas podem não refletir a história das espécies em estudo (EDWARDS, 2009). Deixamos, assim, como hipótese a ser testada que a monofilia recíproca encontrada a partir dos marcadores moleculares mitocondriais também será recuperada com a inclusão de genes nucleares em análises futuras.

Figura 10 – Consenso estrito de cinco cladogramas igualmente parcimoniosos (comprimento (L) = 306; índice de consistência (Ci) = 90; índice de retenção = 96) obtidos com pesagem igual dos caracteres para a análise dos dados concatenados (COI + COII). Os valores de suporte foram calculados por *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* abaixo de 50 não foram representados. Círculos pretos indicam sinapomorfias, enquanto círculos brancos indicam homoplasias.



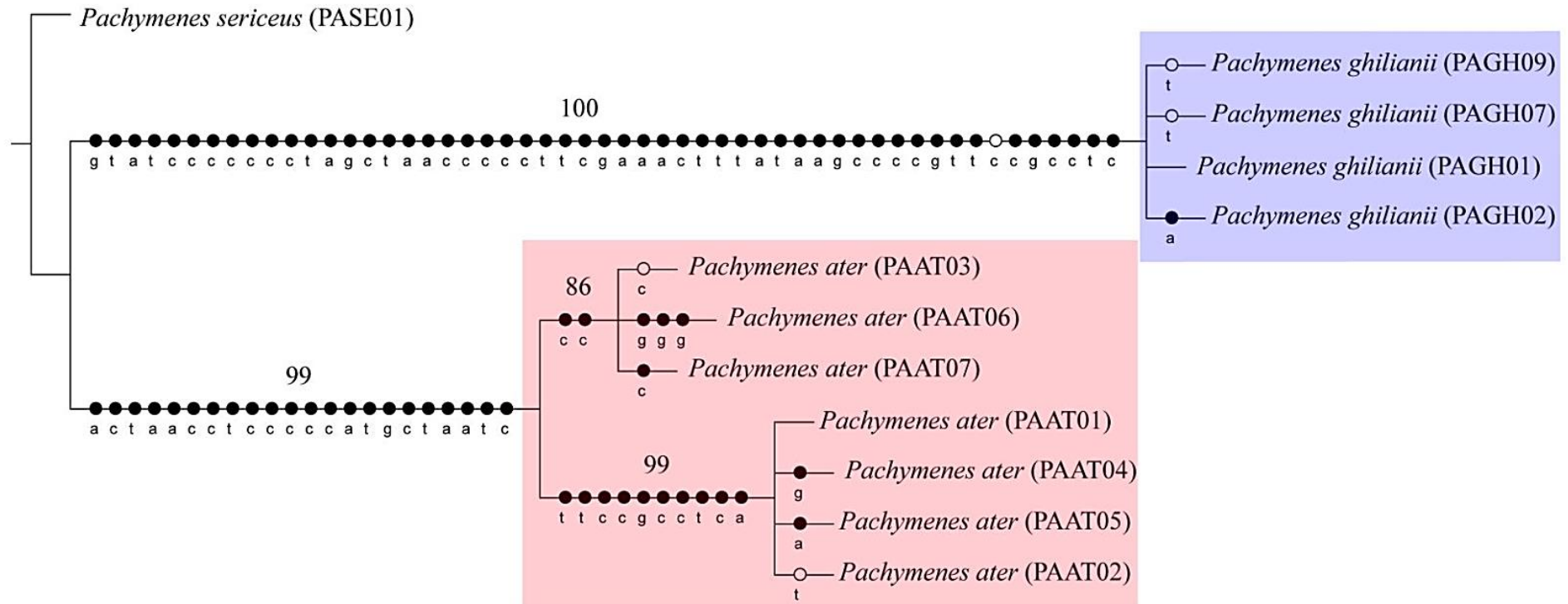
Fonte: Do Autor (2018).

Figura 11 – Consenso estrito de quatro cladogramas igualmente parcimoniosos (comprimento (L) = 139; índice de consistência (Ci) = 89; índice de retenção = 96) obtidos com pesagem igual dos caracteres para as seqüências de COI. Os valores de suporte foram calculados por *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* abaixo de 50 não foram representados. Círculos pretos indicam sinapomorfias, enquanto círculos brancos indicam homoplasias.



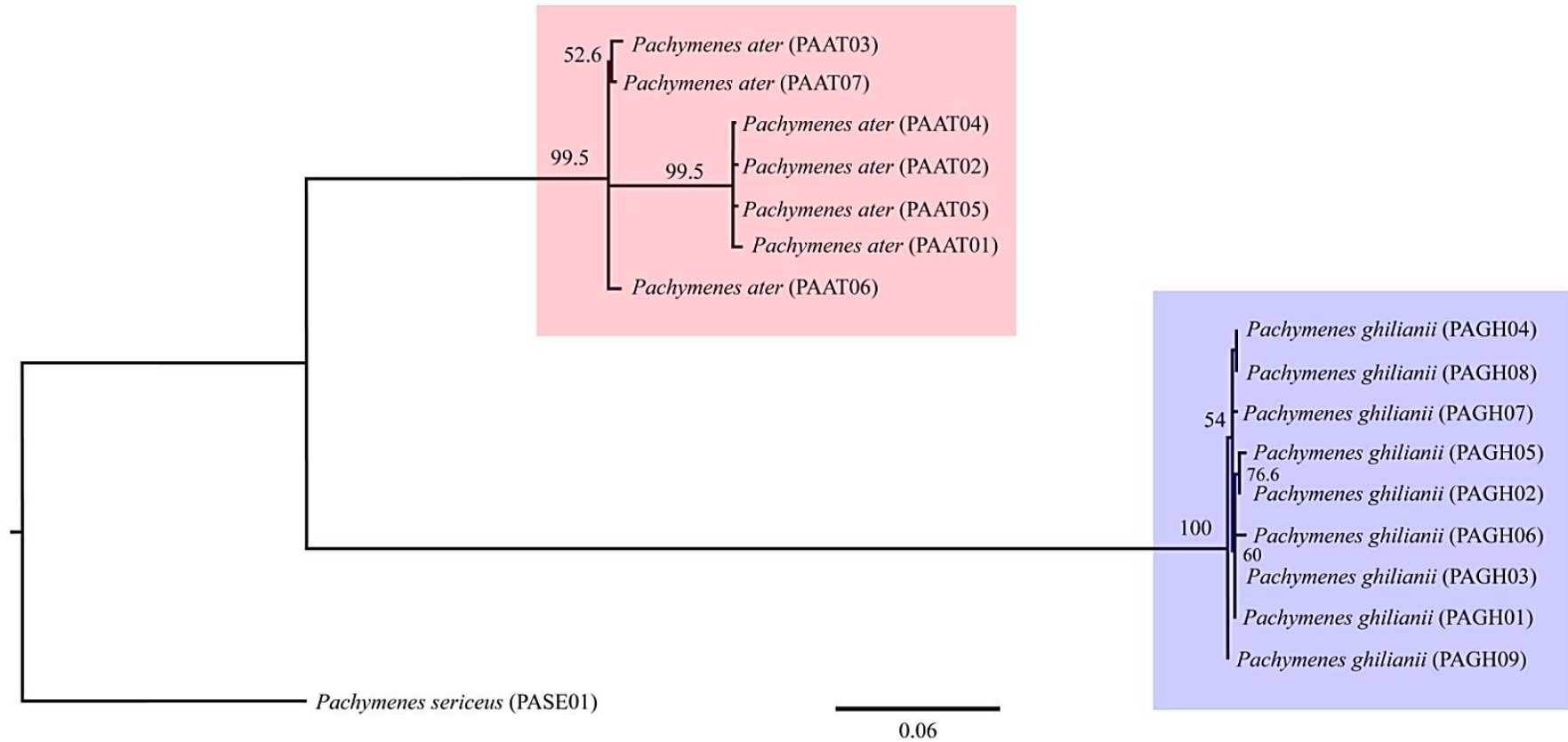
Fonte: Do Autor (2018).

Figura 12 – Consenso estrito de quatro cladogramas igualmente parcimoniosos (comprimento (L) = 166; índice de consistência (Ci) = 92; índice de retenção = 96) obtidos com pesagem igual dos caracteres para as sequências de COII. Os valores de suporte foram calculados por *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* abaixo de 50 não foram representados. Círculos pretos indicam sinapomorfias, enquanto círculos brancos indicam homoplasias.



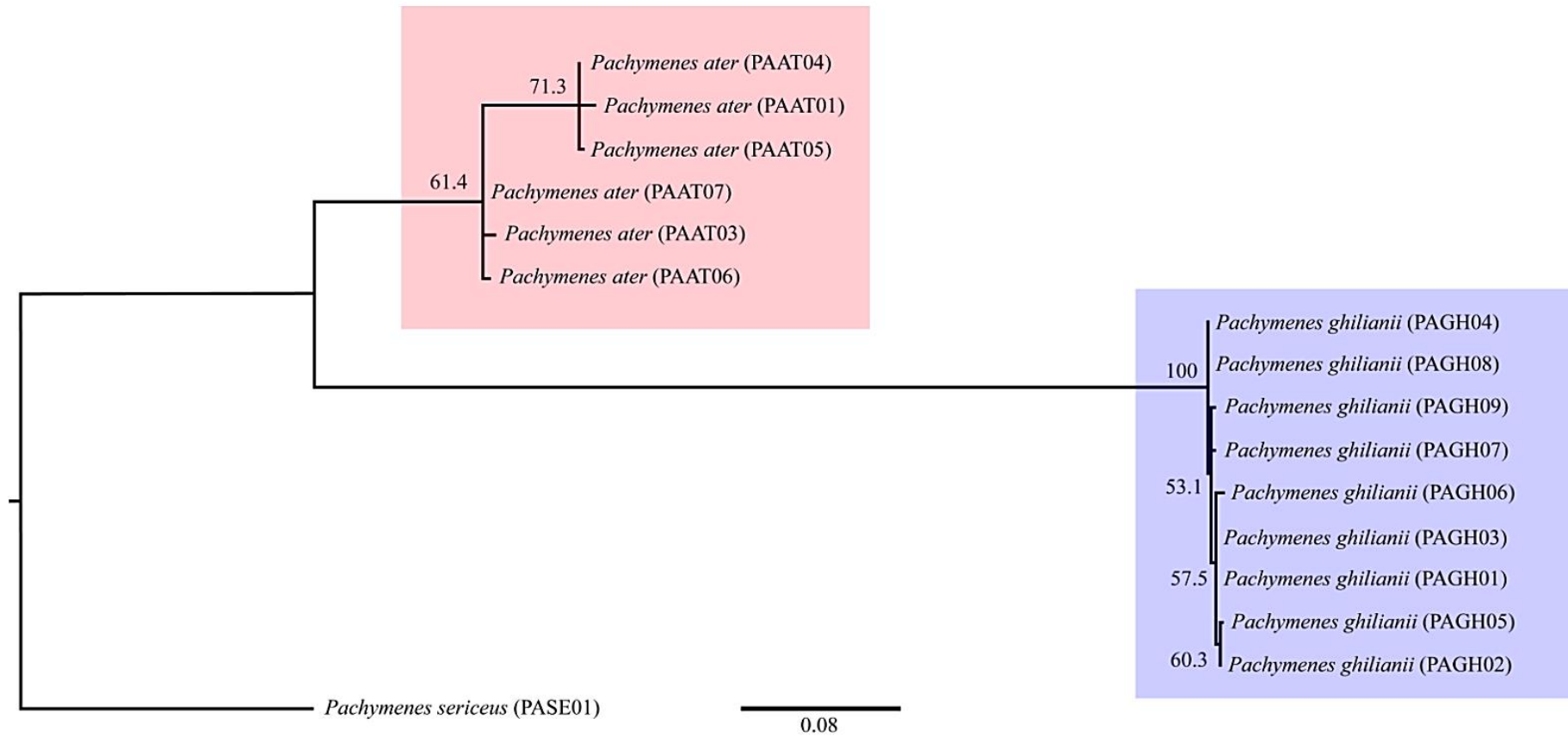
Fonte: Do Autor (2018).

Figura 13 – Filogenia reconstruída por máxima verossimilhança baseada em 1089 pb dos genes mitocondriais COI e COII. Os números acima ou abaixo dos ramos representam o suporte calculado por *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* abaixo de 50 não foram representados.



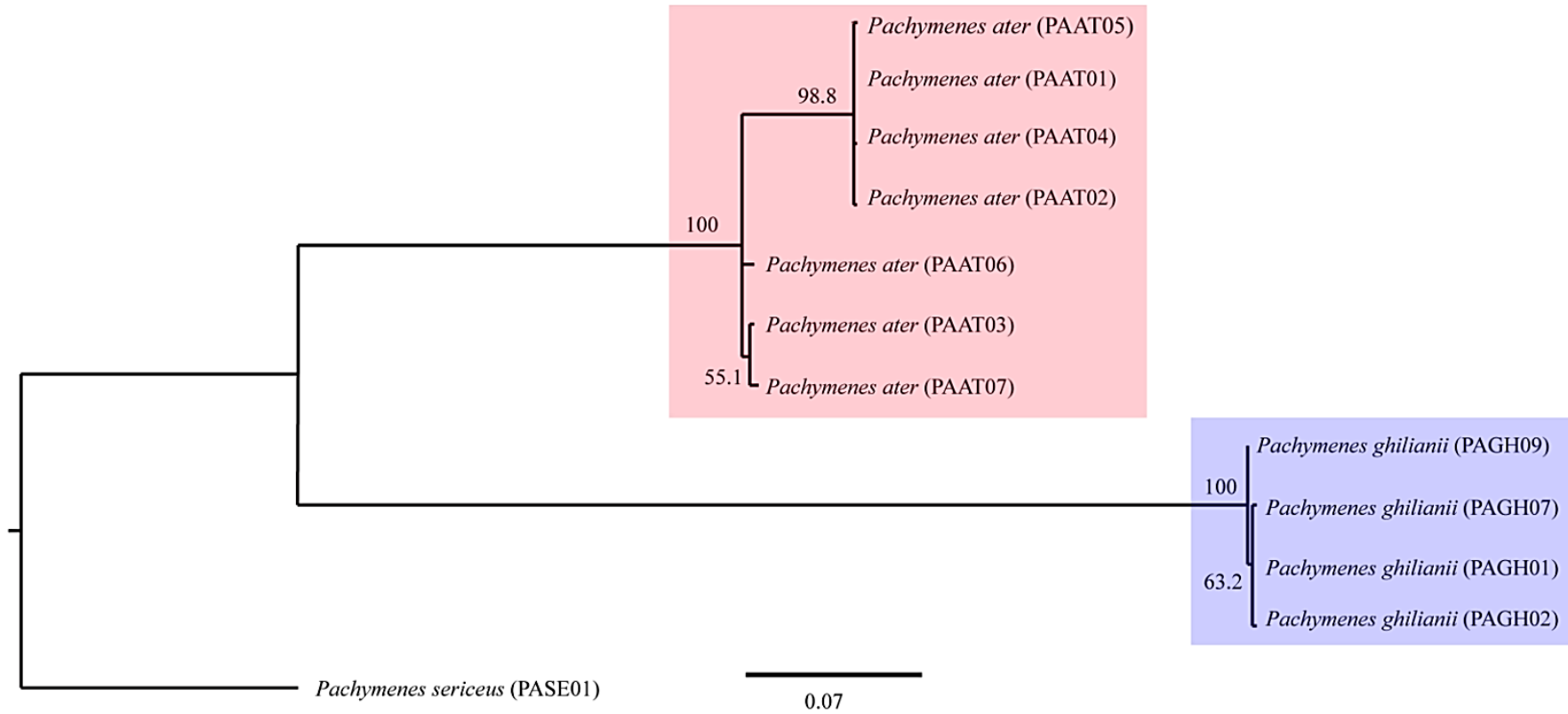
Fonte: Do Autor (2018).

Figura 14 – Filogenia reconstruída por máxima verossimilhança baseada em 472 pb do gene mitocondrial COI. Os números acima ou abaixo dos ramos representam o suporte calculado por *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* abaixo de 50 não foram representados.



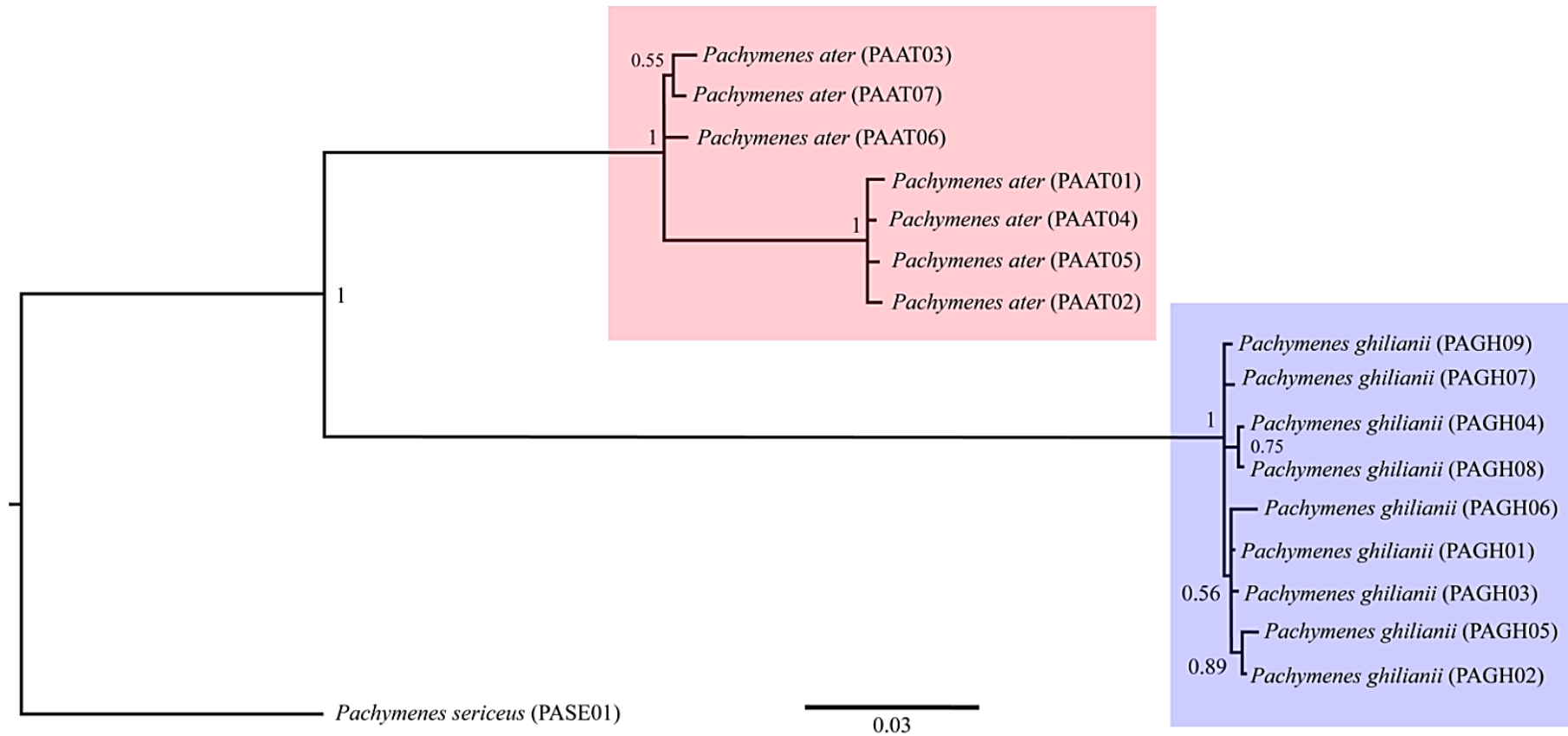
Fonte: Do Autor (2018).

Figura 15 – Filogenia reconstruída por máxima verossimilhança baseada em 617 pb do gene mitocondrial COIL. Os números acima ou abaixo dos ramos representam o suporte calculado por *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* abaixo de 50 não foram representados.



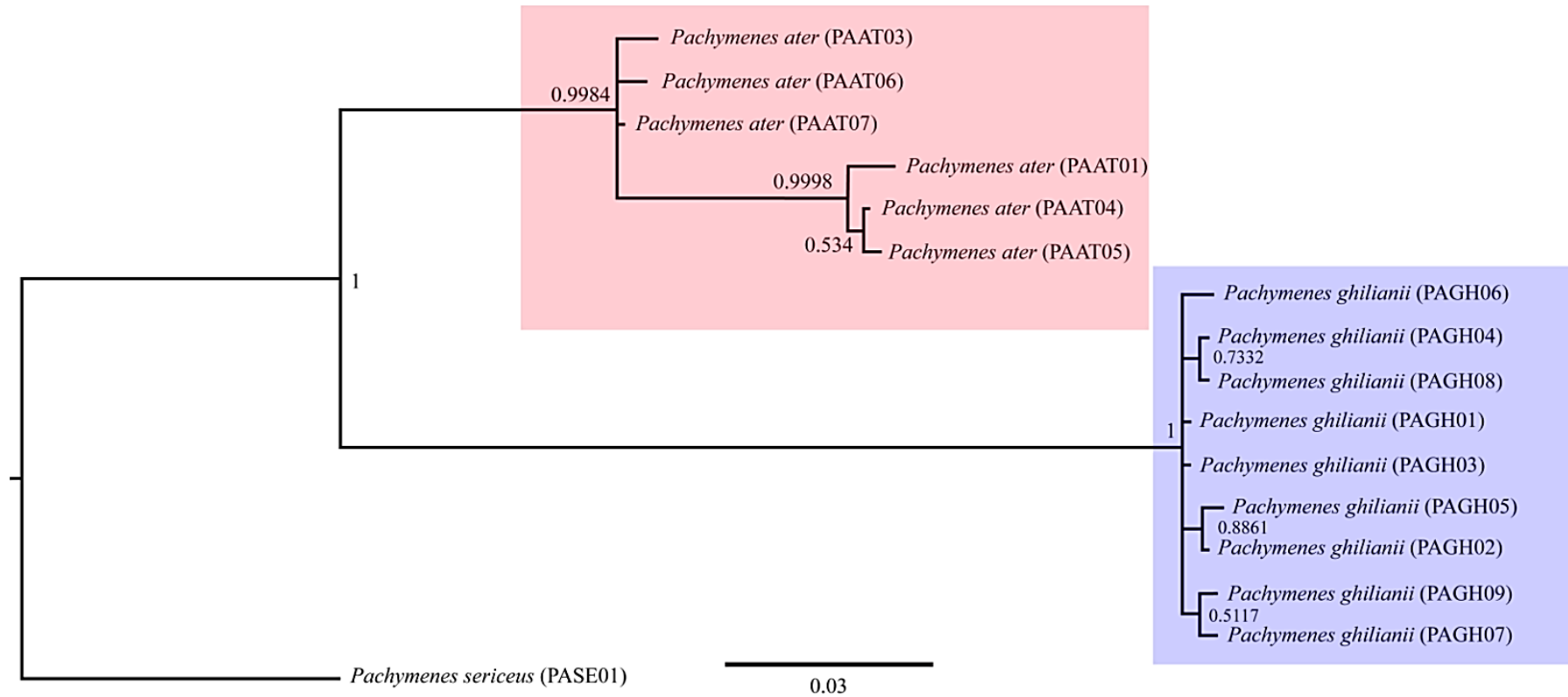
Fonte: Do Autor (2018).

Figura 16 – Filogenia reconstruída por inferência bayesiana baseada em 1089 pb dos genes mitocondriais COI e COII. Os números acima ou abaixo dos ramos representam os valores de probabilidade posterior.



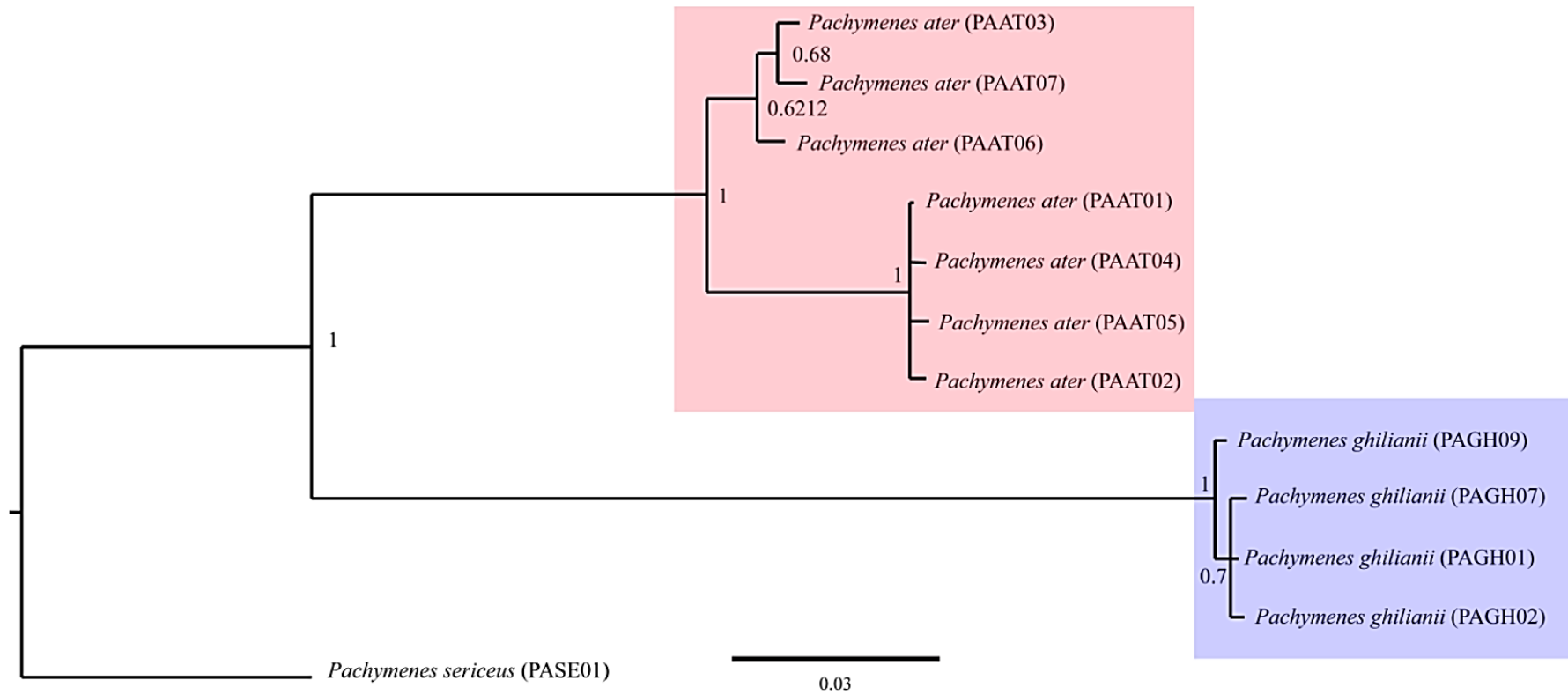
Fonte: Do Autor (2018).

Figura 17 – Filogenia reconstruída por inferência bayesiana baseada em 472 pb do gene mitocondrial COI. Os números acima ou abaixo dos ramos representam os valores de probabilidade posterior.



Fonte: Do Autor (2018).

Figura 18 – Filogenia reconstruída por inferência bayesiana baseada em 617 pb do gene mitocondrial COII. Os números acima ou abaixo dos ramos representam os valores de probabilidade posterior.



Fonte: Do Autor (2018).

4.3 Reavaliação dos caracteres morfológicos

As espécies *P. ater* e *P. ghilianii* puderam ser determinadas pelo seguinte conjunto de caracteres diagnósticos [adaptado da chave proposta por GRADINETE; HERMES; NOLL (2015)]: (I) ausência de fóvea pronotal; (II) ápice do labro arredondado; (III) T2 com pontuação incipiente presente; (IV) T1 expandido dorsolateralmente; (V) gena ampla de tamanho similar à distância entre as margens interna e externa do olho composto no nível do sinus ocular; (VI) carena anterior do pronoto ausente; (VII) clípeo mais longo que largo; (VIII) T1 com pontos muito próximos um dos outros ou pontuação incipiente; (IX) T2 não opaco – “brilhante”; (X) pontuação no T2-T6 inconspícua (às vezes evidente); (X) espécies com variação cromática.

Pachymenes ater e *P. ghilianii* podem ser distinguidos através dos caracteres apresentados na Tabela 9. Comentários quanto à observação destes caracteres foram realizadas, uma vez que alguns deles não são facilmente reconhecidos ou delimitados em uma observação comparativa dos exemplares.

Tabela 9 – Diferenças morfológicas entre *Pachymenes ater* (Spinola) e *P. ghilianii* de Saussure. Destacados em cinza caracteres que permitem a determinação inequívoca das duas espécies. Comentários sobre cada um dos caracteres encontram-se no texto.

Caracteres morfológicos	<i>P. ater</i> de Saussure	<i>P. ghilianii</i> (Spinola)
carena pronotal	fracamente desenvolvida	presente em toda superfície dorsal do pronoto
esculturação do T1	pontuação grosseira em sua porção apical, medialmente	liso, com pontos incospícuos
margem externa do clípeo do macho, em vista lateral	truncada	agudamente angulada
projeção do gonocoxito	2 a 5 projeções apicais	com uma projeção apical simples
cerdas do dígito	longas	curtas

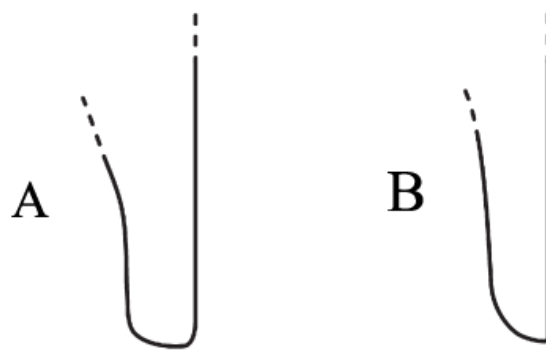
Fonte: adaptado de Grandinete; Hermes; Noll (2015).

Os principais caracteres morfológicos discretos para a distinção entre *P. ater* e *P. ghilianii* são observados em espécimes machos. A margem externa do clípeo em vista lateral é um caráter de fácil observação e está ilustrado na chave de identificação de Grandinete, Hermes e Noll (2015) (reproduzido aqui na FIGURA 19). Os autores sugerem que o clípeo

em *P. ater* seja truncado em sua margem externa, em vista lateral, apicalmente, enquanto que em *P. ghiliani* é agudamente angulado.

Em sua porção apical o clípeo de machos de *P. ater* é mais largo, já em *P. ghiliani* essa área é mais estreitada (FIGURAS 22A, B). Outro aspecto de destaque é que o clípeo de *P. ater* é mais expandido em sua superfície anterior, com formato mais convexo, já em *P. ghiliani* o clípeo não é tão convexo, sendo praticamente reto quanto observado em vista anterior. Foi verificado que a margem externa do ápice do clípeo dos espécimes machos analisados de *P. ater* é mais arredondada enquanto que em *P. ghiliani* essa região é mais pontiaguda (FIGURA 22C, D). As diferenças apontadas para a margem externa do clípeo por Grandinete, Hermes e Noll (2015) provavelmente refletem a forma diferenciada geral do clípeo de machos dessas duas espécies.

Figura 19 – Margem externa do clípeo de machos (vista lateral): A. *Pachymenes ater* de Saussure; B. *Pachymenes ghiliani* (Spinola).



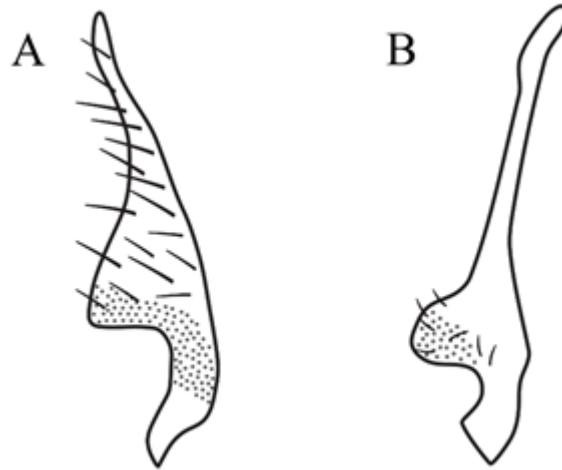
Fonte: Grandinete; Hermes; Noll (2015).

Caracteres relacionados a genitália masculina também são informativos para a distinção entre as duas espécies, e desde que a extração da genitália seja eficiente podem ser observados com facilidade. Grandinete, Hermes e Noll (2015) apresentam ilustrações dos edeagos e dos dígitos das duas espécies, mas infelizmente, para o gonocoxito é apresentada apenas uma ilustração para *P. ater*.

A densidade das cerdas no dígito é incluída como um caráter para a distinção entre as duas espécies (reproduzido aqui na FIGURA 20), todavia, este caráter deve ser avaliado com cuidado. Além de o dígito ser uma peça frágil que pode se deteriorar durante os procedimentos de extração e clarificação, os termos “cerdas longas” e “cerdas curtas” fazem sentido apenas quando existe uma base comparativa. O mais indicado nesse caso seria também indicar a região do dígito e a frequência em que as cerdas ocorrem: em genitálias

masculinas de *P. ater* as cerdas são longas e mais abundantes, e se estendem da projeção lateral até o ápice do dígito; enquanto que em *P. ghiliani* as cerdas são curtas e estão concentradas na projeção lateral.

Figura 20 – Dígito da genitália masculina: A. *Pachymenes ater* de Saussure; B. *Pachymenes ghiliani* (Spinola).



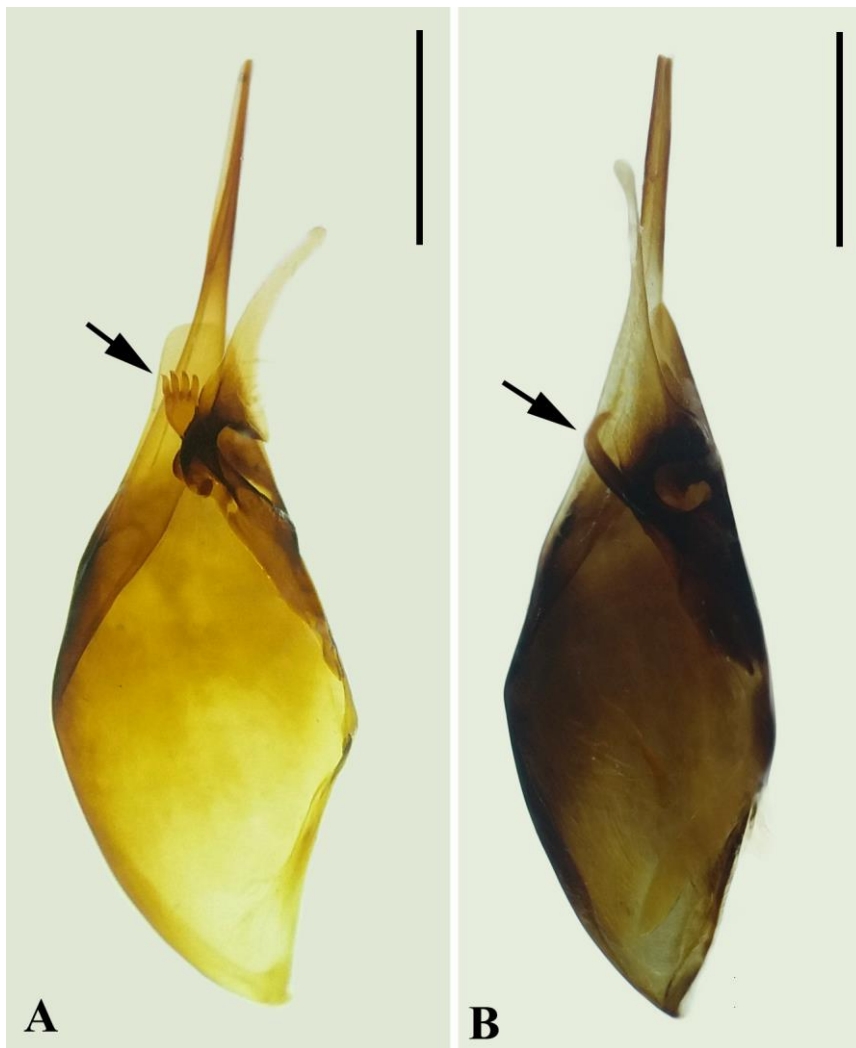
Fonte: Grandinete; Hermes; Noll (2015).

A projeção apical do gonocoxito da genitália masculina é outro caráter de importância taxonômica para a distinção entre as duas espécies (FIGURA 21). A genitália de *P. ater* é facilmente identificada pela presença das projeções digitiformes (que podem variar em número de 2–5). Já as genitálias de *P. ghiliani* apresentam uma projeção única. Consideramos este caráter taxonômico com potencial para ser explorado em estudos futuros. A variação da genitália masculina em *P. ater* pode representar uma diferenciação que acompanha uma provável divergência genética nessa espécie (conforme discutido na seção “Estudos moleculares”).

Caracteres relacionados a genitália masculina vem sendo explorados em estudos filogenéticos e taxonômicos para Eumeninae (HERMES; OLIVEIRA, 2016; GRADINETE; HERMES; NOLL, 2015). Em alguns gêneros, como por exemplo *Alphamenes* Van der Vetch, esses caracteres são relevantes para a distinção entre espécies, incluindo casos em que a distinção entre as fêmeas é problemática (OLIVEIRA et al., 2017). Consideramos que a extração e observação da genitália masculina seja um procedimento importante quando machos de *P. ater* e *P. ghiliani* forem encontrados, além da já comentada observação do formato do clipeo.

Os caracteres morfológicos relacionados ao clipeo de machos e a genitália masculina são os mais facilmente observáveis e de comparação não ambígua para a distinção de *P. ater* e *P. ghiliani*. Infelizmente a distinção entre fêmeas, principalmente para alguns exemplares cuja a coloração do tegumento não é típica, é mais problemática.

Figura 21 – Genitália masculina: gonocoxito e volsela. A. *Pachymenes ater* de Saussure; B. *Pachymenes ghiliani* (Spinola). As setas pretas indicam as projeções do dígito. Barra de escala = 0.5 mm.



Fonte: Do Autor (2018).

O principal caráter morfológico que distingue as duas espécies, e é aplicável para ambos os sexos, diz respeito ao formato da carena pronotal [“fracamente” desenvolvida e às vezes presente apenas medialmente (*P. ater*) ou “mais desenvolvida” e presente em toda a superfície dorsal do pronoto (*P. ghiliani*)] (GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015). É interessante salientar, todavia, que este caráter pode se mostrar confuso, principalmente

quando não se tem a mão exemplares para a comparação direta, uma vez que são utilizados termos comparativos nos passos da chave de identificação. A ausência de ilustrações para este caráter também dificulta a sua interpretação.

Foi observado que espécimes com tegumento de coloração mais clara tendem a ter esculturações no tegumento (tais como carenas ou sulcos) bem demarcadas, enquanto que em espécimes melânicos, a coloração pode camuflar o quanto uma determinada estrutura é demarcada no tegumento. Portanto, em espécies de *P. ghiliani* com coloração do tegumento enegrecida a visualização da carena pronotal “mais desenvolvida” pode ser dificultada, e essa pode ser interpretada como “fracamente desenvolvida”. Nesses casos, a comparação com exemplares de *P. ghiliani* de coloração típica amarelo-acastanhada auxilia na interpretação deste caráter.

Consideramos a carena pronotal como um caráter informativo para a distinção de fêmeas. Comparando com exemplares cuja identificação não é ambígua, a interpretação do caráter pode ser facilitada. Desse modo apresentamos figuras para este caráter complementando a chave de identificação de Grandinete, Hermes e Noll (2015) (FIGURA 22E, F). Uma análise da morfologia interna, examinando as cristas internas que determinam a carena pronotal entre essas espécies, seria interessante para corroborar a validade deste caráter na distinção entre *P. ater* e *P. ghiliani*.

Outro caráter considerado relevante taxonomicamente para a distinção das duas espécies, aplicável para ambos os sexos, seria a presença de “pontuação grosseira” na metade apical do T1 de *P. ater* e T1 liso ou com pontuação rasa/incipiente em *P. ghiliani*. Este caráter está presente tanto na chave de Grandinete, Hermes e Noll (2015) quanto no trabalho de Giordani Soika (1990), entretanto nenhum desses autores apresenta ilustrações para este passo. Em nossa análise, a presença de pontuação no T1 apresentou-se como um caráter ambíguo e de difícil delimitação no estudo comparativo entre fêmeas das duas espécies (FIGURA 23).

Entre as fêmeas de *P. ater*, há exemplares que apresentam pontos rasos, no geral, incipientes e pouco evidentes (FIGURA 23A), e há exemplares que apresentam pontos esparsos e mais evidentes na metade apical do T1 (FIGURA 23B,C). Em *P. ghiliani* espécimes em que o T1 apresenta coloração acastanhada não foi observada pontuação evidente, sendo o T1 liso (FIGURA 23D). Pontuação incipiente foi verificada em exemplares de tegumento mais enegrecido (FIGURA 23E). A pontuação incipiente e pouco evidente em exemplares de *P. ater* torna esse caráter pouco informativo para a distinção com exemplares de *P. ghiliani* de coloração enegrecida, que também apresentam essa mesma condição.

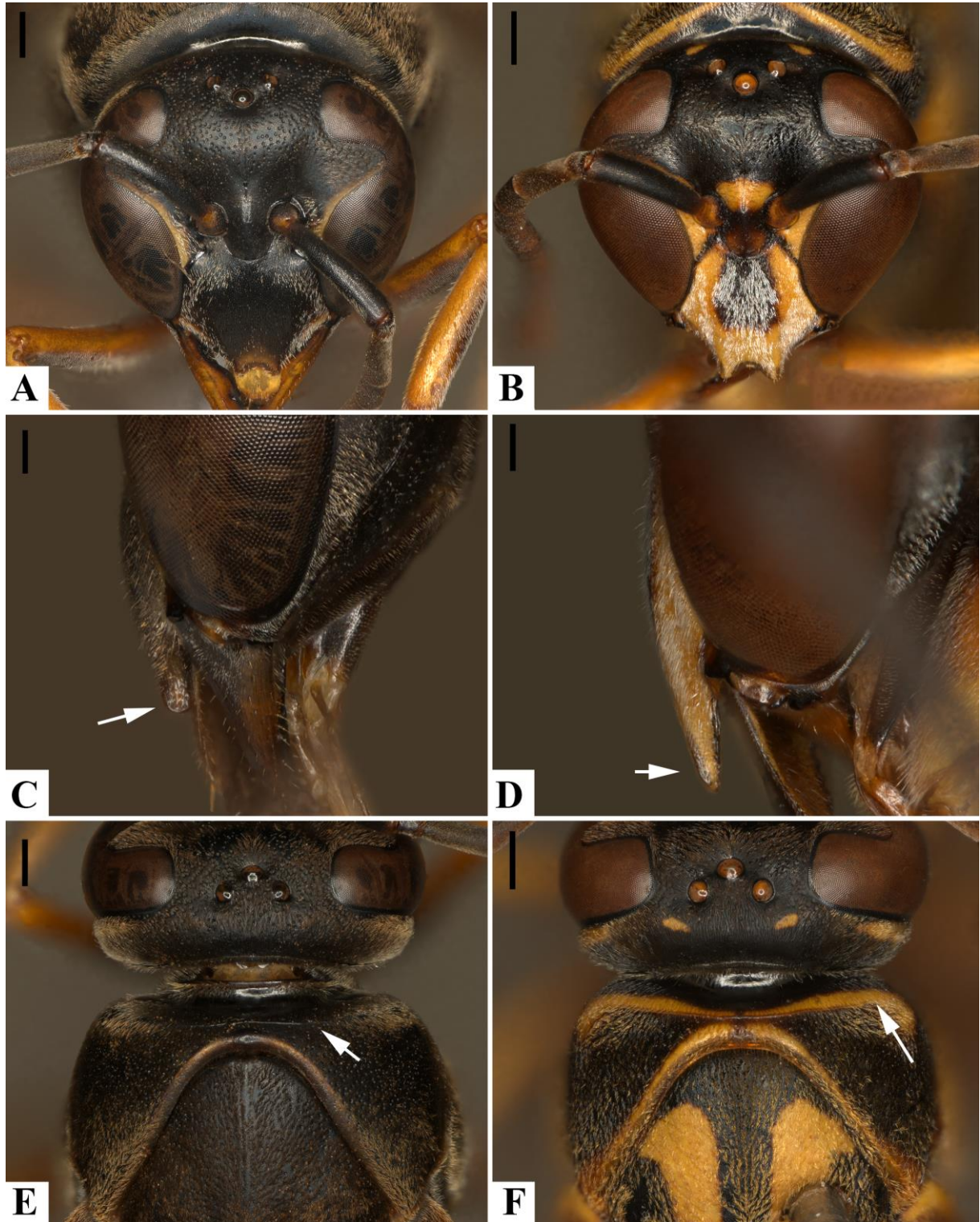
Grandinete, Hermes e Noll (2015) já haviam sinalizado que este caráter seria variável para as duas espécies ao incluírem no passo da chave de identificação o advérbio “frequentemente”.

Além disso, o uso do termo “pontuação grosseira” não auxilia a interpretação do caráter. Pontos esparsos e em sua maioria rasos foram identificados no T1 de espécimes de *P. ater*, todavia nenhuma “pontuação grosseira” com pontos profundos e aglomerados, com a distância entre os pontos menor que o tamanho de um ponto, foi observada. É provável que a variação intraespecífica quanto a pontuação do T1 acompanhe a variação quanto a esculturação do tegumento, isto é, espécimes com tegumento com outras estruturas bem demarcadas (como por exemplo, o sulco longitudinal do ápice do T1) apresentam pontos mais evidentes e abundantes. Verificar a relação entre pontuações em regiões distintas do corpo é um passo importante em próximos estudos para compreender se caracteres relativos à esculturação do tegumento, utilizados em chaves de identificação de espécies de Eumeninae (p. ex., HERMES; OLIVEIRA, 2016) podem evoluir em conjunto, portanto, não deveriam ser tratados como independentes.

A partir da análise morfológica de exemplares das duas espécies, consideramos que os caracteres relacionados ao formato do clipeo e da genitália masculina são informativos para a delimitação das espécies em estudo, enquanto que os caracteres relacionados a carena pronotal e pontuação do T1 podem levar a determinações ambíguas. Comparação com outros exemplares podem auxiliar na delimitação de *P. ater* e *P. ghilianii*, considerando a observação da carena pronotal. Apresentamos no presente estudo ilustrações que facilitam a comparação e interpretação deste caráter. Já o uso das pontuações no ápice do T1 é desencorajada, uma vez que esse caráter pode sobrepor sua gama de variação entre as duas espécies.

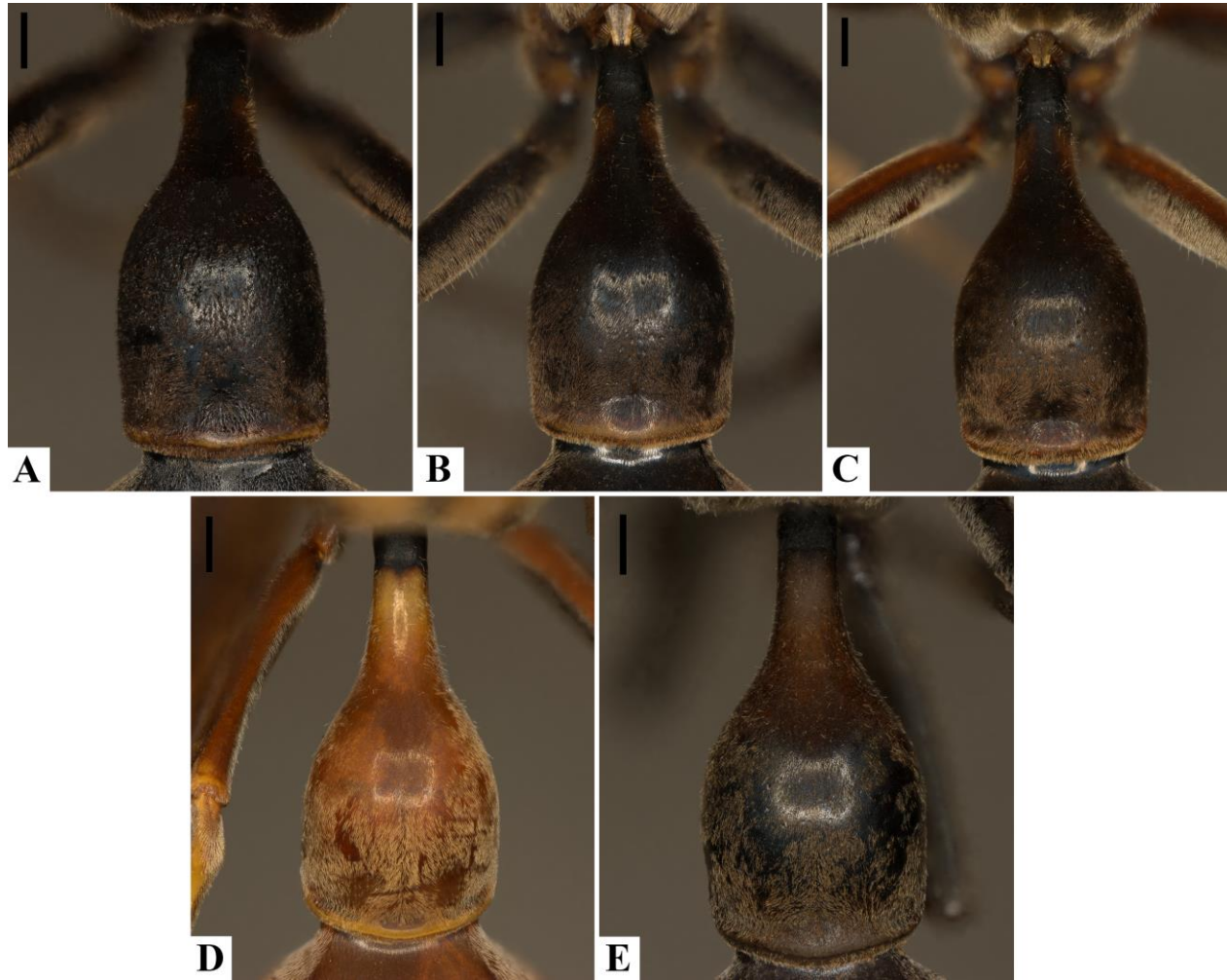
Considerando o Conceito Diagnóstico de Espécies (uma ramificação dos “conceitos filogenéticos”, WHEELER; PLATNICK, 2000), ou o Conceito de Espécie como Linhagem *sensu* DE QUEIROZ (1998; 1999; 2005a; 2005b; 2005c; 2007) (levando em conta a presença de estados de caráter únicos como um critério) corroboramos algumas das evidências que suportam a hipótese de que *P. ater* e *P. ghilianii* são entidades distintas, reconhecidas ao nível de espécie, já apresentadas em outros estudos (GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015; GIORDANI SOIKA, 1990). Com base em caracteres morfológicos discretos diagnósticos (formato do clipeo de machos, genitália masculina e extensão da carena pronotal) foi possível distinguir as duas espécies, de modo que a identificação não ambígua seja facilitada.

Figura 22 – Estruturas de interesse para a determinação de *Pachymenes ater* de Saussure e *Pachymenes ghiliani* (Spinola): A-B. cabeça, frontal. C-D. clípeo, margem lateral, setas brancas apontam para o formato do ápice; E-F. pronoto, dorsal, setas brancas apontam para a extensão da carena pronotal. A,C e E: *P. ater*; B, D e F: *P. ghiliani*. Barras de escala: 0,5 mm (A,B, E, F); 0,2 mm (C, D).



Fonte: Do Autor (2018).

Figura 23 – Variação na presença de pontuação no primeiro tergo metassomal: A, B e C: *Pachymenes ater* de Saussure: A. pontuação incipiente; B,C. pontuação presente; D, E: *Pachymenes ghilianii* (Spinola): D. pontuação ausente; E. pontuação incipiente. Barras de escala: 0,5 mm.



Fonte: Do Autor (2018).

4.4 Estudos morfométricos

As mensurações de caracteres contínuos foram realizadas apenas com exemplares fêmeas de modo que não avaliamos os efeitos do dimorfismo sexual. A partir do estudo morfológico de caracteres discretos, os machos das duas espécies são distinguidos por meio de um exame minucioso da genitália masculina e clípeo. A distinção entre as fêmeas, todavia, é dificultada visto que não há ilustrações para os caracteres discretos exclusivos de fêmeas de cada uma das duas espécies na chave de identificação mais recente disponível (GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015), e nem na revisão taxonômica de Giordani Soika (1990). Nesse contexto buscamos por caracteres contínuos, em fêmeas, que auxiliassem na distinção entre as duas espécies.

Uma análise morfométrica com espécimes machos incluídos seria interessante, principalmente, para apontar possíveis diferenças morfométricas devido ao dimorfismo sexual. O indicado, em uma abordagem tradicional, seria realizar análises para machos e fêmeas isoladamente (p. ex.: NEUMEYER et al., 2014) utilizando medidas de diferentes regiões do corpo. Entretanto, como nosso n amostral para machos foi pequeno, optamos por não utilizá-los em nossas análises. Deixamos em aberto a possibilidade de um estudo morfométrico mais abrangente que possa permitir a comparação entre machos e fêmeas, e apontar as possíveis diferenças devido ao dimorfismo entre os sexos. Todos os resultados apresentados e discutidos abaixo se referem apenas a morfometria das fêmeas de *P. ater* e *P. ghilianii*.

Foram realizadas análises morfométricas iniciais comparando diretamente as medidas através de análises de variância e testes de média. Após esse estudo foi realizada uma análise valendo-se de morfometria utilizando estatística multivariada. Utilizamos a terminologia morfometria clássica para a primeira abordagem, e a expressão morfometria tradicional para a segunda (OWEN, 2012).

As análises morfométricas clássicas foram realizadas buscando por possíveis caracteres contínuos informativos para a delimitação das duas espécies (tanto medidas lineares quanto razões). Os testes de normalidade tanto para as medidas lineares quanto para as razões estão sumarizados na TABELA 10. Os testes estatísticos para a análise da variância (teste F) e para comparação entre as médias (teste t) foram realizados somente com os dados seguindo a distribuição normal, portanto, os dados transformados foram utilizados em casos que a normalidade não foi verificada.

Tabela 10 – Testes de normalidade (Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov) para cada uma das medidas lineares e razões mensuradas em fêmeas das espécies *Pachymenes ater* de Saussure e *Pachymenes ghiliani* (Spinola) (n = 60). A normalidade foi verificada para $p > 0.05$, sendo os testes em que foi encontrado resultado estatístico significativo indicados com um (*). Em caso negativo para a normalidade em alguns dos dois testes foi realizada a transformação dos dados (Box-Cox ou Johnson).

Testes de normalidade:	Shapiro-Wilk		Kolmogorov-Smirnov		Transformação	
	Estatística	p-valor	Estatística	p-valor		
Medidas lineares	OM-CO	0.9756*	0.2713	0.0808*	0.4264	-
	OL	0.7747	0.0000	0.1383	0.0061	Johnson
	OL-OC	0.9739*	0.2243	0.1174	0.0389	Box-Cox
	CC	0.8989	0.0001	0.1077*	0.0807	Box-Cox
	LC	0.9770*	0.3161	0.0657	0.7492	-
	RI	0.9153	0.0005	0.0894*	0.2734	Box-Cox
	AV	0.9484	0.0131	0.0378*	0.1177	Box-Cox
	MO	0.8009	0.0000	0.1660	0.0003	Box-Cox
	OM-RI	0.9690*	0.1299	0.1070*	0.0849	-
	AM-MM	0.9706*	0.1560	0.0759*	0.5287	-
	MM-BM	0.9709*	0.1618	0.0732*	0.5872	-
	PR-MM	0.9407	0.0058	0.1496	0.0019	Box-Cox
	MM-ME	0.9446	0.0087	0.1263	0.0184	Box-Cox
	CT1	0.9666*	0.0992	0.0997*	0.1460	-
	LT1	0.5915	0.0000	0.2621	0.0000	Box-Cox
	CP	0.9821*	0.5233	0.0952*	0.1935	-
	LP	0.9692*	0.1332	0.0674*	0.7150	-
CT2	0.9253	0.0013	0.1723	0.0001	Box-Cox	
LT2	0.9676*	0.1107	0.0717*	0.6211	-	
Razões	R1	0.9576	0.0359	0.1113*	0.0622	Box-Cox
	R2	0.9506	0.0166	0.1184	0.0359	Box-Cox
	R3	0.8832	0.0000	0.1390	0.0056	Box-Cox
	R4	0.8773	0.0000	0.1409	0.0047	Johnson
	R5	0.9533	0.0224	0.1141	0.0504	Box-Cox
	R6	0.9551	0.0272	0.1147	0.0479	Box-Cox
	R7	0.9205	0.0008	0.1252	0.0204	Box-Cox
	R8	0.9033	0.0002	0.1141	0.0503	Box-Cox
	R9	0.8755	0.0000	0.1434	0.0036	Box-Cox

Fonte: Do Autor (2018).

Mesmo tratando-se de caracteres contínuos, a normalidade não foi verificada para dez das dezenove medidas lineares. Além disso, nenhuma das nove razões estabelecidas apresentou distribuição normal. É esperado que razões entre grandezas não apresentem normalidade e violem esse pressuposto estatístico (PINO, 2014), já para as medidas lineares a

não normalidade poderia ser explicada pela presença de caudas pesadas ou deformações em relação a distribuição normal (PINO, 2014).

Foi encontrada diferença estatística significativa entre as médias comparando as duas espécies das seguintes medidas lineares: comprimento do clípeo (CC); comprimento da região inter-antenal (RI); diâmetro do alvéolo antenal (AV); distância entre as reentrâncias dos olhos compostos (MO); e distância entre o sulco mediano do mesepisterno e o mesepímero (MM-ME) (TABELA 11). É importante ressaltar, todavia, que todas essas diferenças somente foram encontradas após a transformação dos dados. As mensurações lineares brutas não foram analisadas diretamente devido a não normalidade dos dados.

As medidas mensuradas na cabeça se mostraram mais informativas que àquelas de outras regiões do corpo (mesossoma e metassoma), sendo cinco das seis medidas com diferenças significativas encontradas nesse tagma. A cabeça desponta como um tagma bastante utilizado para o estabelecimento de caracteres taxonômicos contínuos em Eumeninae. O uso da distância entre a margem do olho composto e a carena occipital na margem mandíbula, assim como as dimensões do clípeo, já foram utilizados para a descrição de novas espécies nos gêneros *Pirhosigma* Giordani Soika e *Stenosigma* Giordani Soika, respectivamente (HERMES; FERREIRA, 2016; FERREIRA et al., 2017).

No mesossoma apenas a distância entre o sulco mediano do mesepisterno e o mesepímero apresentou diferença estatística significativa. Essa região do corpo ainda é pouco explorada no estabelecimento de caracteres contínuos em Eumeninae. Para vespídeos sociais, em estudos de delimitação de castas, o uso de regiões do mesossoma (no geral, o mesoescuto) para o estabelecimento de caracteres contínuos é mais comum (OLIVEIRA et al., 2007; TANAKA JUNIOR; SOLEMAN; NOLL, 2010).

Nenhuma das medidas mensuradas para o metassoma apresentou diferença significativa, mesmo o T1 e T2 serem considerados regiões do corpo importantes para a delimitação de caracteres taxonômicos e filogenéticos em Eumeninae (GARCETE-BARRETT, 2011; HERMES; MELO; CARPENTER, 2014). As dimensões do T1 são relevantes para a identificação de espécies tanto no gênero *Pachymenes* (GRANDINETE; HERMES; NOLL, 2015), quanto no gênero *Pirhosigma* (FERREIRA et al., 2017).

Devido a facilidade prática de se mensurar estruturas rígidas e mais compactas do exoesqueleto, optamos por não usar caracteres relacionados as asas ou as pernas. Além disso, a mensuração desses caracteres não é comum em estudos de morfometria com outros grupos de vespídeos (principalmente vespas sociais, por exemplo: OLIVEIRA et al., 2007). Entretanto, a sugestão do uso da asa para estudos de morfometria geométrica não deve ser

descartada, uma vez que essa estrutura é indicada para esse tipo de análise (BAUR; LEUENBERGER, 2011). Sugeríamos o uso e a exploração de caracteres contínuos relacionados a asa em estudos futuros com Eumeninae, em especial para uma abordagem geométrica.

Tabela 11 – Teste F e teste *t* comparando as medidas lineares estabelecidas para fêmeas das espécies *Pachymenes ater* de Saussure (n = 30) e *Pachymenes ghiliani* (Spinola) (n = 30). As médias e os desvios padrões (SD) estão indicados para cada espécie. Testes que retornaram diferenças estatísticas significativas ($\alpha = 5\%$) estão indicados com um (*). Apenas as medidas em que os dois testes foram significativos estatisticamente estão destacadas em cinza. Os testes foram executados com os dados normalizados.

Medida linear	<i>P. ater</i>		<i>P. ghiliani</i>		Estat. F	p-valor F	Estat. <i>t</i>	p-valor <i>t</i>
	Média	SD	Média	SD				
OM-CO	0.475	0.0485	0.458	0.0435	1.2476	0.5552	1.4349	0.1567
OL	0.270	0.0378	0.247	0.0225	1.0707	0.8553	-0.7038	0.4844
OL-OC	0.291	0.0175	0.238	0.0242	0.5243	0.0875	9.8016*	0.0000
CC	1.214	0.0611	1.126	0.1115	0.4197*	0.0224	3.8925*	0.0003
LC	1.153	0.0728	0.981	0.0924	0.6216	0.2064	7.9905*	0.0000
RI	0.279	0.0196	0.272	0.0369	62.9104*	0.0000	-81.586*	0.0000
AV	0.240	0.0238	0.215	0.0378	54.3166*	0.0000	-77.003*	0.0000
MO	1.925	0.0938	1.787	0.1914	0.4113*	0.0196	3.9033*	0.0002
OM-RI	0.746	0.0542	0.725	0.0597	0.8228	0.6029	1.4169	0.1618
AM-MM	0.640	0.0653	0.602	0.0841	0.6020	0.1778	1.9322	0.0582
MM-BM	1.092	0.0916	1.057	0.0235	0.5058	0.0715	1.2149	0.2293
PR-MM	0.837	0.1151	0.717	0.1151	1.5585	0.2381	4.4752*	0.0000
MM-ME	0.496	0.0854	0.438	0.1251	0.2746*	0.0008	3.6465*	0.0006
CT1	2.418	0.2181	2.306	0.2479	0.7737	0.4940	1.8636	0.0674
LT1	1.184	0.2157	1.083	0.0919	0.4909	0.0601	1.5693	0.1220
CP	0.822	0.1864	0.885	0.1789	1.0857	0.8263	-1.3256	0.1902
LP	0.510	0.0746	0.489	0.0124	1.2141	0.6047	1.1035	0.2744
CT2	2.793	0.2079	2.725	0.2488	0.7500	0.4433	1.1225	0.2663
LT2	2.538	0.2206	2.350	0.2613	0.7126	0.3669	3.0099*	0.0039

Fonte: Do Autor (2018).

Foi encontrada diferença significativa apenas para duas das razões estabelecidas: R2: comprimento do clípeo em relação a largura do clípeo; e R5: distância: ápice do mesepisterno-sulco mediano em relação a distância: sulco mediano-base do mesepisterno (TABELA 12). Novamente, a diferença só foi encontrada após a transformação dos dados, sendo que as medidas brutas não poderiam ser submetidas a um teste *F* por não passarem nos testes de normalidade.

Tabela 12 – Teste F e teste *t* comparando as razões estabelecidas a partir de medidas lineares mensuradas em fêmeas das espécies *Pachymenes ater* de Saussure (n = 30) e *Pachymenes ghilianii* (Spinola) (n = 30). As médias e os desvios padrões (SD) estão indicados para cada espécie. Testes que retornaram diferenças estatísticas significativas ($\alpha = 5\%$) estão indicados com um (*). Apenas as medidas em que os dois testes foram significativos estatisticamente estão destacadas em cinza. Os testes foram executados com os dados normalizados.

Razão	<i>P. ater</i>		<i>P. ghilianii</i>		Estat. F	p-valor F	Estat. <i>t</i>	p-valor <i>t</i>
	Média	SD	Média	SD				
R1	1.778	0.2082	1.863	0.1844	2.4274*	0.0198	1.4679	0.1475
R2	1.055	0.0588	1.150	0.0825	0.2305*	0.0002	-6.203*	0.0000
R3	1.173	0.1455	1.319	0.3584	0.3710*	0.0094	-1.0162	0.3138
R4	2.591	0.2018	2.468	0.2328	0.9866	0.9712	0.0602	0.9522
R5	0.588	0.0649	0.577	0.1047	0.2106*	0.0001	2.9896*	0.0041
R6	1.741	0.3836	1.766	0.5105	0.3972*	0.0154	-1.4159	0.1622
R7	2.075	0.2577	2.135	0.2089	1.1458	0.7165	-0.9565	0.3428
R8	1.636	0.4425	1.836	0.4400	1.8088	0.1162	-1.3425	0.1847
R9	1.105	0.0900	1.167	0.1086	0.6298	0.2191	-2.758*	0.0078

Fonte: Do Autor (2018).

O uso de razões sugere que essas sejam mais representativas da forma do que somente as medidas lineares (DAYLY, 1985). No caso da R2, a dimensão do clipeo é um caráter amplamente utilizado em estudos com Eumeninae, sendo inclusive incluído em passos de chaves de identificação [por exemplo: determinação de espécies do gênero *Pararhaphidoglossa* em Giordani Soika (1978) e espécies do gênero *Stenosigma* em Giordani Soika (1990)]. Entretanto, este tipo de caráter quase nunca é mensurado e é avaliado “no olho”. Proposições para determinar as dimensões do clipeo de forma mais precisa encontram-se nos estudos de Garcete-Barrett (2011) e Grandinete, Hermes e Noll (2015), relacionando o comprimento e a largura da estrutura. Entretanto os autores não chegam a aprofundar em discussões sobre como esse caráter pode ser avaliado analiticamente.

Como todas as diferenças estatísticas encontradas só foram estimadas a partir dos dados transformados não consideramos taxonomicamente informativo o uso dessas diferenças para a delimitação de espécies. Os resultados apresentados e discutidos têm fins exploratórios, visando entender o potencial de caracteres morfométricos para Eumeninae, em uma abordagem clássica. Abrimos a possibilidade para trabalhos com outros grupos de Eumeninae e principalmente com uma amostragem maior de exemplares, uma vez que um *n* amostral de 30 indivíduos para cada espécie ainda é bastante pequeno visto a ampla distribuição geográfica de *P. ater* e *P. ghilianii*.

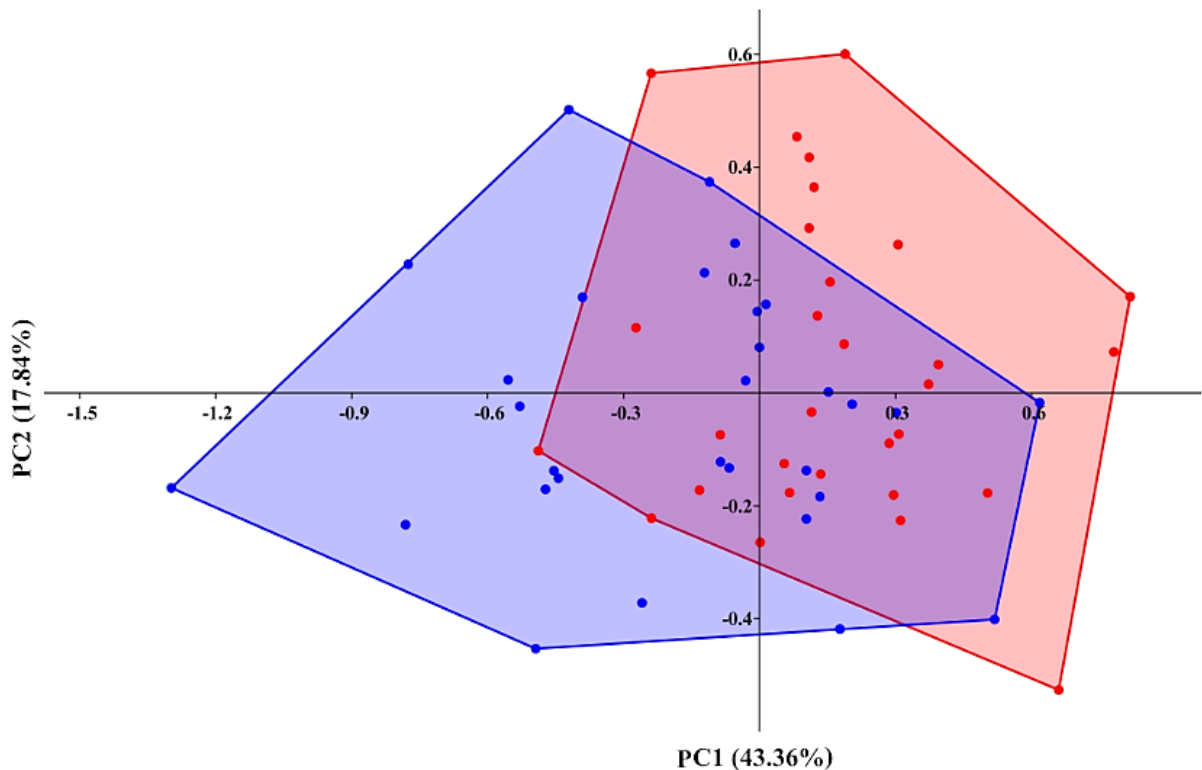
O uso de análises estatísticas, como análises de variância e testes de médias, é comum em estudos com insetos sociais, sendo já aplicada para a delimitação de castas em vespídeos (OLIVEIRA et al., 2007; TANAKA JUNIOR; SOLEMAN; NOLL, 2010) e em cupins (MANZOOR; AKHTAR, 2006). Não é comum o uso desse tipo de abordagem para delimitar caracteres morfológicos contínuos em problemas taxonômicos, mesmo que possa ser utilizada em conjunto com outras análises – um exemplo com cupins em: Griebenow, Jones e Eaton (2017).

Para casos de delimitação de espécies, o uso de morfometria tradicional com abordagens estatísticas multivariadas é mais recorrente (BAUR; LEUENBERGER, 2011). Análises de Componentes Principais (PCAs) ou Análises Discriminantes são exemplos de multivariadas que são utilizadas em um sentido exploratório para delimitar grupos. Buscamos utilizar essa abordagem para verificar se existe alguma diferenciação entre os grupos, para os caracteres contínuos, de *P. ater* e *P. ghilianii*.

Não foi possível diferenciar dois agrupamentos de variação sem sobreposições tanto para as medidas lineares quanto para as razões quando realizada as PCAs (FIGURAS 24 e 25). As análises retornaram resultados com sobreposição das variações das duas espécies, o que seria esperado uma vez que não obtivemos diferença significativa para a maioria das medidas lineares e das razões estabelecidas. As análises de PCA não foram informativas para delimitação das espécies *P. ater* e *P. ghilianii*, havendo uma sobreposição maior da variação para PCA das razões do que para a PCA das medidas lineares.

Outras abordagens que também utilizam dados de caracteres contínuos, como morfometria geométrica, poderiam ser utilizadas para comparação com os resultados apresentados a partir de morfometria clássica e tradicional (OWEN, 2012). Todavia, para insetos o uso de estatística multivariada já é suficiente, devido ao objetivo da abordagem: incluir em uma só análise medidas de várias regiões do corpo (BAUR; LEUENBERGER, 2011). Uma abordagem geométrica seria mais apropriada se considerássemos as unidades isoladas (cabeça, tórax, asas, etc.) (BAUR; LEUENBERGER, 2011). Como utilizamos várias medidas de regiões distintas, análises de estatística multivariada tradicional são suficientes para a interpretação dos dados, mesmo quando, em nosso caso, não há diferenciação entre os grupos.

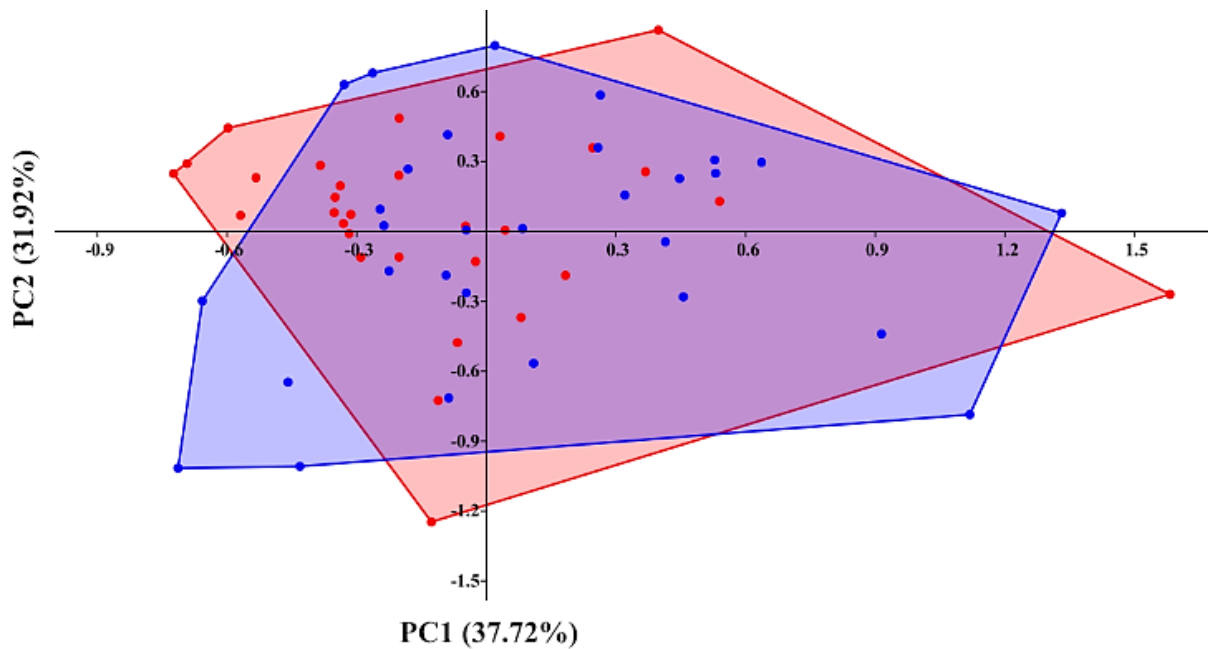
Figura 24 – Análise de Componentes Principais (PCA) considerando a variação de todas as medidas lineares. *Pachymenes ater* de Saussure está indicado por pontos vermelhos; *Pachymenes ghilianii* (Spinola) está indicado por pontos azuis.



Fonte: Do Autor (2018).

Em estudos futuros um refinamento das análises apresentadas pode ser realizado, incluindo aspectos alométricos e relação entre razões de modo mais analítico, e não apenas exploratório como foi realizado no presente estudo (como proposto por BAUR; LEUENBERGER, 2011; e aplicado em diferentes estudos de taxonomia integrativa – p. ex. BAUR et al., 2014; NEUMEYER et al., 2014; ZHANG; RIDENBAUGH; SHARANOWSKI, 2017). Com base nos resultados apresentados, não consideramos a morfometria como informativa para a delimitação das duas espécies. Mesmo quando encontramos diferenças estatísticas significativas entre as medidas utilizando morfometria clássica, as mesmas só foram estabelecidas mediante a transformação dos dados. As análises estatísticas multivariadas também não retornaram os elementos de cada espécie em agrupamentos distintos.

Figura 25 – Análise de Componentes Principais (PCA) considerando a variação de todas as medidas lineares. *Pachymenes ater* de Saussure está indicado por pontos vermelhos; *Pachymenes ghilianii* (Spinola) está indicado por pontos azuis.



Fonte: Do Autor (2018).

Nossa última análise morfométrica para verificar a correlação entre as medidas lineares funcionou apenas para explorar o potencial dos dados, e não teve relação direta com o problema de delimitação das espécies. Essa análise está sumarizada na Figura 26, e os valores dos coeficientes de correlação (r^2) estão especificados na Tabela 13. Dois resultados merecem destaque: a alta correlação positiva entre o comprimento (CC) e a largura do clípeo (LC); e a correlação negativa encontrada para a distância pronoto-sulco mediano do mesepisterno (PR-MM) e distância do sulco-mediano do mesepisterno-mesepímero (MM-ME).

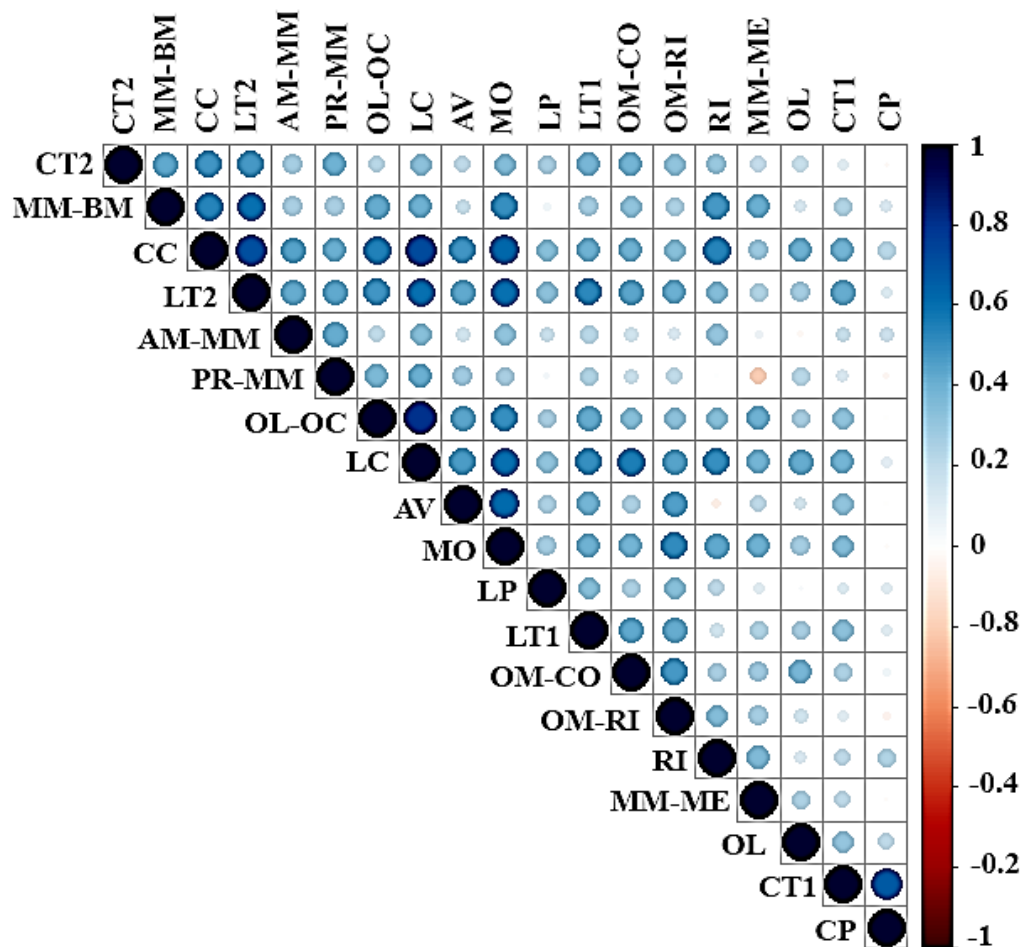
A correlação positiva entre o comprimento do clípeo e sua largura ($r^2 = 0.728$) seria esperada visto que à medida que as dimensões do clípeo aumentam, proporcionalmente a largura e comprimento também aumentariam. A alta correlação entre essas duas medidas lineares demonstram que o uso delas de forma relacional (como uma razão = comprimento/largura) tem algum significado biológico. As dimensões do clípeo como vêm sendo utilizada em alguns trabalhos com Eumeninae (p. ex., GARCETE-BARRETT, 2011; GRADINETE; HERMES; NOLL, 2015; FERREIRA et al., 2017) provavelmente se referem a medidas que são dependentes e causalmente explicadas.

Já a única correlação negativa expressiva encontrada ($r^2 = -0.195$) está relacionada com uma região do corpo ainda pouco explorada em termos morfométricos em estudos

taxonômicos ou filogenéticos para Eumeninae: o mesepisterno. Essa região, mesmo que seja utilizada para comparação de pontuações no tegumento (HERMES; OLIVEIRA, 2016), não tem caracteres morfológicos contínuos propostos com tanta frequência quanto o clipeo. A correlação negativa encontrada demonstra que a porção anterior do mesepisterno (comprimento indicado pela medida PR-MM) aumenta, ao passo que a porção posterior (comprimento indicado pela medida MM-ME) diminui. Esse tipo de correlação demonstrada indica que há regiões do corpo dos Eumeninae ainda pouco exploradas para o estabelecimento de caracteres morfométricos que merecem atenção por provavelmente apresentarem algum significado biológico.

Os dois exemplos discutidos representam incentivos para que novas abordagens morfométricas, explorando outros caracteres, sejam realizadas para Eumeninae.

Figura 26 – Correlação das medidas lineares. O gradiente de cores (barra lateral) indica o grau de correlação entre as medidas. Os valores variam de 1 (alta correlação positiva) à 0 (baixa correlação) e de 0 à -1 (alta correlação negativa).



Fonte: Do Autor (2018).

Tabela 13 – Valores do coeficiente de correlação (r^2) entre as medidas lineares (n = 60). A descrição das abreviações encontra-se na Tabela 5.

	OM.CO	OL	OL.OC	CC	LC	RI	AV	MO	OM.RI	AM.MM	MM.BM	PR.MM	MM.ME	CT1	LT1	LP	CP	CT2	LT2
OM.CO	-	0.37	0.33	0.39	0.56	0.25	0.24	0.39	0.47	0.15	0.32	0.17	0.27	0.24	0.42	0.25	0.05	0.38	0.43
OL	0.37	-	0.25	0.39	0.41	0.12	0.13	0.27	0.14	-0.03	0.12	0.22	0.24	0.31	0.26	0.02	0.20	0.18	0.27
OL.OC	0.33	0.25	-	0.54	0.81	0.34	0.43	0.50	0.32	0.20	0.41	0.37	0.40	0.31	0.41	0.26	0.00	0.21	0.48
CC	0.39	0.39	0.54	-	0.73	0.54	0.49	0.63	0.34	0.44	0.53	0.41	0.29	0.38	0.39	0.34	0.22	0.48	0.70
LC	0.56	0.41	0.81	0.73	-	0.51	0.47	0.60	0.44	0.34	0.40	0.41	0.38	0.38	0.51	0.31	0.08	0.32	0.59
RI	0.25	0.12	0.34	0.54	0.51	-	0.06	0.42	0.34	0.31	0.48	0.00	0.36	0.20	0.15	0.21	0.23	0.29	0.35
AV	0.24	0.13	0.43	0.49	0.47	-	0.06	0.62	0.45	0.14	0.17	0.28	0.20	0.31	0.39	0.25	-0.01	0.21	0.43
MO	0.39	0.27	0.50	0.63	0.60	0.42	0.62	-	0.51	0.32	0.51	0.25	0.40	0.34	0.39	0.27	-0.01	0.35	0.59
OM.RI	0.47	0.14	0.32	0.34	0.44	0.34	0.45	0.51	-	0.11	0.24	0.20	0.26	0.09	0.41	0.34	-0.05	0.31	0.41
AM.MM	0.15	-0.03	0.20	0.44	0.34	0.31	0.14	0.32	0.11	-	0.26	0.41	0.06	0.18	0.22	0.17	0.15	0.26	0.41
MM.BM	0.32	0.12	0.41	0.53	0.40	0.48	0.17	0.51	0.24	0.26	-	0.26	0.41	0.23	0.27	0.04	0.12	0.43	0.60
PR.MM	0.17	0.22	0.37	0.41	0.41	0.00	0.28	0.25	0.20	0.41	0.26	-	-0.20	0.11	0.24	0.04	-0.03	0.40	0.42
MM.ME	0.27	0.24	0.40	0.29	0.38	0.36	0.20	0.40	0.26	0.06	0.41	-0.20	-	0.20	0.23	0.09	-0.01	0.19	0.24
CT1	0.24	0.31	0.31	0.38	0.38	0.20	0.31	0.34	0.09	0.18	0.23	0.11	0.20	-	0.32	0.10	0.67	0.09	0.41
LT1	0.42	0.26	0.41	0.39	0.51	0.15	0.39	0.39	0.41	0.22	0.27	0.24	0.23	0.32	-	0.34	0.09	0.37	0.53
LP	0.25	0.02	0.26	0.34	0.31	0.21	0.25	0.27	0.34	0.17	0.04	0.04	0.09	0.10	0.34	-	0.09	0.26	0.32
CP	0.05	0.20	0.00	0.22	0.08	0.23	0.01	-0.01	-0.05	0.15	0.12	-0.03	-0.01	0.67	0.09	0.09	-	0.02	0.11
CT2	0.38	0.18	0.21	0.48	0.32	0.29	0.21	0.35	0.31	0.26	0.43	0.40	0.19	0.09	0.37	0.26	-0.02	-	0.47
LT2	0.43	0.27	0.48	0.70	0.59	0.35	0.43	0.59	0.41	0.41	0.60	0.42	0.24	0.41	0.53	0.32	0.11	0.47	-

Fonte: Do Autor (2018).

4.5 Integração dos dados

Utilizamos diferentes abordagens para entender os limites específicos de *P. ater* e *P. ghilianii*: distribuição geográfica, coloração do tegumento, variáveis ecológicas ambientais (componentes do nicho ecológico), sequências de genes mitocondriais, reavaliação de caracteres morfológicos discretos já propostos e morfometria clássica/tradicional. Não houve congruência total entre todas essas linhas de evidência. Verificamos sobreposição distribucional e variação intra e interespecífica para *P. ater* e *P. ghilianii* quanto a coloração do tegumento. A monofilia recíproca recuperada a partir de análises filogenéticas utilizando sequências de COI e COII, e alguns caracteres morfológicos discretos, foram considerados informativos para a distinção das duas espécies. Para o nicho ecológico potencial (baseado nas variáveis ecológicas) e morfometria estudos mais aprofundados são necessários.

A partir dos princípios da taxonomia integrativa por acumulação (PADIAL et al., 2010), nem todas as diferentes fontes de evidência precisam convergir para delimitar duas espécies. Alguns critérios podem ser informativos para a distinção de duas espécies, enquanto outros critérios não. O importante nessa abordagem é sempre coletar mais evidências que reforcem nossa hipótese de espécie inicial. Esse tipo de abordagem incorre no risco de superestimação e baixa confiança nos nomes aplicados para as unidades taxonômicas reconhecidas como espécies (PADIAL et al., 2010).

Entretanto, esse é a única abordagem que se enquadra dentro do arcabouço teórico do conceito geral de espécies como linhagens (DE QUEIROZ, 1998; 1999; 2005a; 2005b; 2005c; 2007). A incongruência entre os diferentes critérios para delimitar espécies é esperada, pois a fixação dos diferentes tipos de caracteres se dá em tempos diferentes do processo evolutivo de especiação. Além disso, consideramos a monofilia recíproca e a fixação de caracteres morfológicos discretos indicadores informativos o suficiente para o reconhecimento de espécies enquanto entidades que têm significado em um contexto filogenético (WHEELER; MEIER, 2000).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo representa um esforço inicial de se utilizar a taxonomia integrativa para um problema de delimitação de espécies em Eumeninae (Hymenoptera, Vespidae). Este tipo de estudo é possível graças a revisões taxonômicas e hipóteses filogenéticas já propostas, como a de Grandinete, Hermes e Noll (2015) para o gênero *Pachymenes*. Estudos com essa

mesma abordagem podem ser aplicados para outros gêneros de Eumeninae que foram revisadas e possuem suas relações de parentesco elucidadas recentemente – por exemplo, o gênero *Minixi* Giordani Soika (HERMES; OLIVEIRA, 2016).

Reconhecemos, a partir de nossos resultados, *P. ater* e *P. ghilianii* como espécies distintas, baseados na monofilia recíproca e em caracteres morfológicos diagnósticos. Concordamos, portanto, com Grandinete, Hermes e Noll (2015) e Giordani Soika (1990) na distinção entre as duas espécies. Não descartamos a possibilidade, todavia, de novos estudos serem conduzidos para reavaliar essa hipótese.

O presente trabalho trata-se de mais uma contribuição para os estudos da subfamília Eumeninae agregando novas fontes de evidência que podem ser utilizadas em níveis de menor generalidade. Essa abordagem integrativa também pode ser expandida para níveis superiores levando em consideração o contexto de hipóteses concorrentes para as relações de parentesco das principais linhagens de vespídeos (BANK et al., 2017).

REFERÊNCIAS

- AGAPOW, P. M. et al. The impact of species concept on biodiversity studies. **The Quarterly Review of Biology**, v. 79, p. 161–179, 2004.
- AGUIAR, A. P. et al. Order Hymenoptera*. In: ZHANG, Z. Q. (Ed.) Animal Biodiversity: An Outline of Higher-level Classification and Survey of Taxonomic Richness (Addenda 2013). **Zootaxa**, v. 3703, n. 1, p. 51–62, 2013.
- ASSIS, L. C. S. Homology assessment in parsimony and model-based analyses: two sides of the same coin. **Cladistics**, v. 31, p. 315–320, 2015.
- AUKO, T. H.; SILVESTRE, R. Composição faunística de vespas (Hymenoptera, Vespidae) na floresta estacional do Parque Nacional da Serra da Bodoquena, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 1, 2013.
- AUKO, T. H.; TRAD, B. M.; SILVESTRE, R. Bird dropping masquerading of the nest by the potter wasp *Minixi suffusum* (Fox, 1899) (Hymenoptera: Vespidae: Eumeninae). **Tropical Zoology**. v. 28, n. 2, p. 56–65, 2015.
- BANK, S. et al. Transcriptome and target DNA enrichment sequence data provide new insights into the phylogeny of vespid wasps (Hymenoptera: Aculeata: Vespidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 116, p. 213–226, 2017.
- BAUM, D. A. Species as ranked taxa. **Systematic Biology**, v. 58, n. 1, p. 74–86, 2009.
- BAUM, D. A.; SMITH, S. D. **Tree Thinking: An Introduction to Phylogenetic Biology**. Roberts and Co., Greenwood Village, 2012.
- BAUR, H.; LEUENBERGER, C. Analysis of ratios in multivariate morphometry. **Systematic Biology**, v. 60, n. 6, p. 813–825, 2011.

- BAUR, H. et al. Morphometric analysis and taxonomic revision of *Anisopteromalus* Ruschka (Hymenoptera: Chalcidoidea: Pteromalidae) - an integrative approach. **Systematic Entomology**, v. 39, p. 691–709, 2014.
- BEQUAERT, J. The North American Species of *Ancistrocerus*, proper (Hymenoptera, Vesipidae). **Entomologica Americana**, v.23, n. 4, p. 225–286, 1944.
- BITSCH, J. 2012. Morphologie comparée des derniers segments du gastre et des genitalia mâles des Vespidae. 1. Sous-famille des Eumeninae (Hymenoptera). **Bulletin de la Société entomologique de France**, v. 117, n. 2, p. 199–218, 2012.
- BRANSTETTER, M. G. et al. Phylogenomic Insights into the evolution of stinging wasps and the origins of ants and bees. **Current Biology**, v. 27, p. 1019–1025, 2017.
- BUCK, M.; MARSHALL, S. A.; CHEUNG, D. K. B. Identification Atlas of the Vespidae (Hymenoptera, Aculeata) of the northeastern Nearctic region. **Canadian Journal of Arthropod Identification**, v. 5, n. 1, p. 1–492, 2008.
- CARDINAL, S.; DANFORTH, B. N. Bees diversified in the age of eudicots. **Proceedings of the Royal Society, Biological Sciences**, v. 280, n. 1755: 20122686, 2013.
- CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**, v. 35, p. 1187–1201, 2008.
- CARNAVAL, A. C. et al. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. **Science**, v. 323, p. 785–789, 2009.
- CARPENTER, J. M. The phylogenetic relationships and natural classification of the Vespoidea (Hymenoptera). **Systematic Entomology**, v. 7, n. 1, p. 11–38, 1982.
- CARPENTER, J. M. A. Review of the subspecies concept in the eumeninae genus *Zeta* (Hymenoptera: Vespidae). **Psyche**, v. 94, p. 253–259, 1987.
- CARPENTER, J. M. Return to the subspecies concept in the genus *Zeta* (Hymenoptera: Vespidae; Eumeninae). **Boletín del Museo Nacional de Historia Natural del Paraguay**, v. 14, p. 19–24, 2003.
- CARPENTER, J. M.; GARCETE-BARRETT, B. R. A key to the Neotropical genera of Eumeninae (Hymenoptera: Vespidae). **Boletín del Museo Nacional de Historia Natural del Paraguay**, v. 14, n. 1-2, p. 52–73, 2003.
- CARVALHO, M. R. et al. Taxonomic Impediment or Impediment to Taxonomy? A Commentary on Systematics and the Cybertaxonomic-Automation Paradigm. **Evolutionary Biology**, v. 34, p. 140–143, 2007.
- CARVALHO, M. R. et al. Systematics must embrace comparative biology and evolution, not speed and automation. **Evolutionary Biology**, v. 35, p. 150–157, 2008.
- CRACRAFT, J. Species concepts in theoretical and applied biology: a systematic debate with consequences. In.: WHEELER, Q. D.; MEIER, R (Eds.). **Species concepts and phylogenetic theory – a debate**. Columbia University Press, New York, 2000.
- CROZIER, Y. C. et al. An improved test for Africanized honeybee mitochondrial DNA. **Experientia**, v.47, p. 968–969, 1991.

- DALY, H. V. Insect morphometrics. **Annual Review of Entomology**, v. 30, p. 415–438, 1985.
- DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, p. 407–415, 2005.
- DE QUEIROZ, K. The general lineage of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. In.: **Endless forms: Species and speciation**. Eds.: HOWARD, D. J.; BERLOCHER, S. H. Oxford University Press, New York, p. 57–75, 1998.
- DE QUEIROZ, K. The general lineage concept of species and the defining properties of the species category. In.: Wilson, R. A. (Ed.), **Species. New Interdisciplinary Essays**. MIT Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 1999.
- DE QUEIROZ, K. Ernst Mayr and the modern concept of species. In: Hey J, Fitch M, Ayala FJ (Ed.), **Systematics and the Origin of Species**. National Academies Press, Washington D.C, p. 243–263, 2005a.
- DE QUEIROZ, K. A unified concept of species and its consequences to the future of taxonomy. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, v. 56, p. 196–215, 2005b.
- DE QUEIROZ, K. Different species problems and their resolution. **BioEssays**, v. 27, p. 1263–1269, 2005c.
- DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology**, v. 56, p. 879–886, 2007.
- DESALLE, R. Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: Response to Rubinoff. **Conservation Biology**, v. 20, n. 5, p. 1545–1547, 2006.
- DINIZ-FILHO, J. A. F. et al. Defying the curse of ignorance: perspectives in insect macroecology and conservation biogeography. **Insect Conservation and Diversity**, v. 3, p. 172–179, 2010.
- DOYLE, J. J.; DAVIS, J. I. Homology in Molecular Phylogenetics: A Parsimony Perspective. In.: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; DOYLE, J. J. (Eds.). **Molecular Systematics of Plants II**. Springer US, 1998.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, 2004.
- EDWARDS, S. V. Is a new and general theory of molecular Systematics emerging? **Evolution**, v. 63, n. 1, p. 1–19, 2009.
- ELITH, J. et al. A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. **Diversity and Distributions**, v. 17, n. 1, p. 43–57, 2011.
- EQUIPE ESTATCAMP. Software Action. Estatcamp- Consultoria em estatística e qualidade, São Carlos - SP, Brasil. URL. 2014.
- EVENHUIS, N. L. Helping solve the "other" taxonomic impediment: completing the eight steps to total enlightenment and taxonomic nirvana. **Zootaxa**, v. 1406, p. 3–12, 2007.
- FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, v. 17, n. 6, p. 368–376, 1981.

- FERREIRA, W. D., et al. A new contribution to the knowledge of Neotropical Eumeninae (Hymenoptera, Vespidae). **Zootaxa**, v. 3981, n. 1, p. 117–124, 2015.
- FERREIRA, W. D. et al. A new species of *Pirhosigma* Giordani Soika, 1978 (Hymenoptera, Vespidae: Eumeninae), with additional notes and a key to the species in the genus. **Zootaxa**, v. 4300, n. 2, p. 269–278, 2017.
- FICK, S. E.; HIJMANS, R. J. Worldclim 2: New 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. **International Journal of Climatology**, 2017.
- FITCH, W. N. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specified tree topology. **Systematic Zoology**, v. 20, n. 4, p. 406–416, 1971.
- FITZHUGH, K. The inferential basis of species hypotheses: the solution to defining the term 'species'. **Marine Ecology**, v. 26, p. 155-165, 2005.
- FRANKHAM, R. et al. Implications of different species concepts for conserving biodiversity. **Biological Conservation**, v. 153, p. 25–31, 2012.
- FUJITA, M. K. et al. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 27, n. 9, 2012.
- GARCETE-BARRETT, B. R. A revision of the genus *Stenonartonia* Giordani Soika 1973 (Hymenoptera: Vespidae: Eumeninae). **Zootaxa**, v. 2868, p. 1–50, 2011.
- GARNETT, S. T.; CHRISTIDIS, L. Taxonomy anarchy hampers conservation. **Nature**, v. 546, p. 25–27, 2017.
- GARNERY, L. et al. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. **Molecular Ecology**, v. 1, n. 3, p. 145–154, 1992.
- GIBBS, J. Integrative taxonomy identifies new (and old) species in the *Lasioglossum* (*Dialictus*) tegulare species group (Hymenoptera, Halictidae). **Zootaxa**, v. 2032, p. 1–38, 2009.
- GIORDANI SOIKA, A. Revisione degli Eumenidi neotropicali appartenenti ai generi *Eumenes* Latr., *Omicron* (Sauss.), *Pararhaphidoglossa* Schulth. ed affini. **Bolletino Museo Civico di Storia Naturale di Venezia**, v. 29, p. 1–420, 1978.
- GIORDANI SOIKA, A. Revisione degli Eumenidi neotropicali appartenenti ai generi *Pachymenes* Sauss., *Santamenes* n. gen., *Brachymenes* G.S., *Pseudacaromenes* G. S., *Stenosigma* G. S. e *Gamma* Zav. (Hymenoptera). **Bolletino Museo Civico di Storia Naturale di Venezia**, v. 39, p. 71–172, 1990.
- GRANDINETE, Y. C.; NOLL, F. B. Checklist of social (Polistinae) and solitary (Eumeninae) wasps from a fragment of Cerrado "Campo sujo" in the state of Mato Grosso do Sul. **Sociobiology**, v. 60, n. 1, p. 101–106, 2013.
- GRANDINETE, Y. C.; HERMES, M. G; NOLL, F. B. Systematics and phylogeny of the Neotropical *Pachymenes* de Saussure and *Santamenes* Giordani Soika (Hymenoptera, Vespidae, Eumeninae). **Systematic Entomology**, v. 40, p. 365–384, 2015.
- GRIEBENOW, Z. H.; JONES, S. C.; EATON, T. D. Seeking quantitative morphological characters for species identification in soldiers of Puerto Rican *Heterotermes* (Dictyoptera, Blattaria, Termitoidea, Rhinotermitidae). **ZooKeys**, v. 725, p. 17–29, 2017.

- GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. Hymenoptera: Ants, Bees, and Other Wasps. In: **Evolution of the Insects**. Cambridge: Ed: CAMBRIDGE, cap. 11, p. 407–467, 2005.
- GOLOBOFF, P. A. Analyzing large data sets in reasonable times: solutions for composite optima. **Cladistics**, v. 15, p. 415–428, 1999.
- GOLOBOFF, P. A.; FARRIS, J. S.; NIXON, K. C. TNT, a free program for phylogenetic analysis. **Cladistics**, v. 24, n. 5, p. 774–786, 2008.
- GOULDING, T. C.; DAYRAT, B. Integrative taxonomy: ten years of practice and looking into the future. **Archives of Zoological Museum of Lomonosov Moscow**, v. 54, p. 116–133, 2016.
- GULAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **The Insects: An Outline of Entomology**. Wiley Blackwell, 5 Ed., Oxford, 2014.
- HAMMER, Ø., HARPER, D. A. T., RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 2011. Disponível em: http://palaeoelectro-nica.org/2001_1/past/issue1_01.htm, acesso em: 21/11/2016.
- HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, v. 22, n. 2, p. 160–174, 1985.
- HAUSDORF, B. Progress toward a general species concept. **Evolution**, v. 65, n. 4, p. 923–931, 2011.
- HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society, Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003.
- HERMES, M. G.; MELO, G. A. R. Revision and cladistic analysis of the eumenine wasp genus *Pseudodynerus* de Saussure (Hymenoptera, Vespidae, Eumeninae). **Systematic Entomology**, v. 33, n. 2, p. 361–394, 2008.
- HERMES, M. G.; SOMAVILLA, A.; GARCETE-BARRETT. On the Nesting biology of *Pirhosigma* Giordani Soika (Hymenoptera, Vespidae, Eumeninae), with special reference to the use of vegetable matter. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, n.4, p. 433–436, 2013.
- HERMES, M. G.; MELO, G. A. R.; CARPENTER J. M. The higher-level phylogenetic relationships of the Eumeninae (Insecta, Hymenoptera, Vespidae), with emphasis on *Eumenes* sensu lato. **Cladistics**, v. 30, p. 453–484, 2014.
- HERMES, M. G.; ARAÚJO, G.; ANTONINI, Y. On the nesting biology of eumenine wasps yet again: *Minixi brasilianum* (de Saussure) is a builder and a renter... at the same time! (Hymenoptera, Vespidae, Eumeninae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59, n. v. 5, p. 141–142, 2015.
- HERMES, M. G.; FERREIRA, W. D. On the type series of *Stenosigma humerale* Giordani Soika with the description of a new species (Hymenoptera, Vespidae, Eumeninae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, n. 2, 2016.
- HERMES, M. G.; OLIVEIRA, L. A de. Morphological cladistic analysis resolves the generic limits of the Neotropical potter wasp genera *Minixi* Giordani Soika and *Pachyminixi* Giordani Soika (Hymenoptera, Vespidae, Eumeninae). **Invertebrate Systematics**, v. 30, n. 3, 2016.
- HEY, J. The mind of the species problem. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, n. 7, 2001.
- HEY, J. On the failure of modern species concepts. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 21, n. 8, 2006.

- HINES, H. M. et al. Multigene phylogeny reveals eusociality evolved twice in vespid wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 9, p. 3295–3299, 2007.
- HORTAL, J. et al. Seven shortfalls that beset large-scale knowledge of biodiversity. **Annual Reviews in Ecology, Evolution and Systematics**, v. 46, p. 523–549, 2015.
- JOHNSON, B. R. et al. Phylogenomics Resolves Evolutionary Relationships among Ants, Bees, and Wasps. **Current Biology**, v. 23, p. 2058–2062, 2013.
- JÚNIOR, P. A. S. et al. Natural biological control of *Diaphania* spp. (Lepidoptera: Crambidae) by social wasps. **Sociobiology**, v. 59, n. 2, p. 561–571, 2012.
- KAMBHAMPATI, S.; SMITH, P. T. PCR primers for the amplification of four insect mitochondrial gene fragments. **Insect Molecular Biology**, v. 4, 1995.
- KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012.
- LANFEAR, R. et al. 'PartitionFinder 2: New Methods for Selecting Partitioned Models of Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses'. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 3, p. 772–773, 2016.
- LEITE, N. B., et al. PE and PS Lipids Synergistically Enhance Membrane Poration by a Peptide with Anticancer Properties. **Biophysical Journal**, v. 109, p. 936–947, 2015.
- LOMALINO, M. V. Conservation biogeography. In.: LOMALINO, M. V.; HEANEY, L. R. (Eds.). **Frontiers of Biogeography. New Directions in the Geography of Nature**, Sinauer, Sunderland, MA, 2004.
- LÖWENBERG-NETO, P. Neotropical region: a shapefile of Morrone's (2014) biogeographical regionalisation. **Zootaxa**, v. 3802, n. 2, p. 300–300, 2014.
- MACLEAN, B. K.; CHANDLER, L.; MACLEAN, D. B. Phenotypic expression in the paper wasp *Polistes fuscatus* (Hymenoptera: Vespidae). **The Great Lakes Entomologist**, v. 11, n. 2, p. 105–116, 1978.
- MADDISON, W. P.; MADDISON, D. R. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.31 <http://mesquiteproject.org>. 2017.
- MALLET, J. **Species Concepts**, 2005. Disponível em: http://webpages.icav.up.pt/PTDC/BIAEC/102179/biblio_aulas10e11/mallet05spconc.pdf; acesso em 17/11/2016.
- MANZOOR, F.; AKHTAR, M. S. Morphometric analysis of population samples of soldier caste of *Odontotermes obesus* (Rambur) (Isoptera, Termitidae, Macrotermitinae). **Animal Biodiversity and Conservation**, v. 29, n. 2, p. 91–107, 2006.
- MAYR, E. **The Growth of Biological Thought. Diversity, Evolution, and Inheritance**. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 1982.
- MENEZES, R. S. T. et al. Molecular phylogeny and historical biogeography of the Neotropical swarm-founding social wasp genus *Synoeca* (Hymenoptera, Vespidae). **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2015.

- MENEZES, R. S. T. et al. The roles of barriers, refugia, and chromosomal clines underlying diversification in Atlantic Forest social wasps. **Scientific Reports**, v. 7, n. 7689, 2017.
- MITCHELL, A. Collecting in collections: a PCR strategy and primer set for DNA barcoding of decades-old dried museum specimens. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, p. 1102–1111, 2015.
- MISHLER, B. D.; THERIOT, E. C. The Phylogenetic Species Concept (*sensu* Mishler and Theriot): monophyly, apomorphy, and phylogenetic species concepts. In.: WHEELER, Q. D.; MEIER, R (Eds.). **Species concepts and phylogenetic theory – a debate**. Columbia University Press, New York, 2000.
- MISOF, B. et al. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. **Science**, v. 346, n. 6210, p. 763–767, 2014.
- NAOMI, S-I. On the integrated frameworks of species concepts: Mayden’s hierarchy of species concepts and de Queiroz’s unified concept of species. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 49, n. 3, p. 177–184, 2011.
- NEUMYER, R. et al. A new species of the paper wasp genus *Polistes* (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae) in Europe revealed by morphometrics and molecular analyses. **Zookeys**, v. 400, p. 67–118, 2014.
- NIXON, K. C. **Winclada, versão 1.0000**. Publicado pelo autor. Ithaca, New York, USA, 1999–2002.
- NIXON, K. C. The parsimony Ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. **Cladistics**, v. 15, p. 407–441, 1999.
- OLIVEIRA, O. A. L.; NOLL, F. B.; MATEUS, S.; GOMES, B. Castes and asynchronus colony cycle in *Polybia bistriata* (Fabricius) (Hymenoptera, Vespidae). **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 6, p. 817–827, 2007.
- OLIVEIRA, U. et al. The strong influence of collection bias on biodiversity knowledge shortfalls of Brazilian terrestrial biodiversity. **Diversity and Distributions**, v. 22, p. 1232–1244, 2016.
- OLIVEIRA, L. A. et al. Contributions to the taxonomy of *Minixi* Giordani Soika and *Alphamenes* Van der Vecht (Hymenoptera, Vespidae, Eumeninae), with an identification key to the species of the latter. **Zootaxa**, v. 4317, n. 3, p. 530–540, 2017.
- OWEN, R. E. Applications of Morphometrics to the Hymenoptera, Particularly Bumble Bees (*Bombus*, Apidae). In.: WAHL, C. (Ed.) **Morphometrics**, ISBN: 978-953-51-0172-7, 2012.
- PADIAL, J. M. et al. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology**, v. 7, n. 16, 2010.
- PADIAL, J. M.; LA RIVA, I. de. A response to recent proposals for integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 101, p. 747–756, 2010.
- PANTE, E. et al. Species are hypotheses: avoid connectivity assessments based on pillars of sand. **Molecular Ecology**, v. 24, p. 524–544, 2015.
- PANTE, E.; SCHOELINCK, C.; PULLANDRE, N. From integrative taxonomy to species description: one step beyond. **Systematic Biology**, v. 64, n. 1, p. 152–160, 2015.
- PEREIRA, M. C. S. de A., et al. Description of a new species of *Oplitis* Berlese, 1884, and the first record of a phoretic uropodid mite (Acari: Oplitidae) on a Neotropical solitary wasp (Hymenoptera: Vespidae). **Zootaxa**, v. 4067, n. 3, p. 394–400, 2016.

- PERRARD, A.; GRIMALDI, D.; CARPENTER, J. M. Early lineages of Vespidae (Hymenoptera) in Cretaceous amber. **Systematic Entomology**, v. 42, p. 379–386, 2017.
- PETERS, R. S. et al. Evolutionary History of the Hymenoptera. **Current Biology**, n. 27, p. 1013–1018, 2017.
- PHILLIPS, S. J.; ANDERSON, R. P.; SCHAPIRE, R. E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological modelling**, v. 190, n. 3, p. 231–259, 2006.
- PICKETT, K. M.; CARPENTER, J. M. Simultaneous Analysis and the Origin of Eusociality in the Vespidae (Insecta: Hymenoptera). **Arthropod Systematics & Phylogeny**, v. 68, n. 1, p. 3–33, 2010.
- PINO, F. A. A questão da não normalidade: uma revisão. **Revista de Economia Agrícola**, v. 61, n.2, p. 17–33, 2014.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>; acesso em 16/01/2018. 2015.
- RAMBAUT, A; DRUMMOND, A. J.. **Tracer v1.6**, 2014, Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>, acesso em 06/07/2016.
- RAMBAUT, A. **FigTree: Tree Figure Drawing Tool v1.4.0**; 2009. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>, acesso em 24/01/2017.
- RAPOSO, M. A. et al. What really hampers taxonomy and conservation? A riposte to Garnett and Christidis (2017). **Zootaxa**, v. 4317, n. 1, p. 179–184, 2017.
- RÊDA, R. T. **Uma avaliação dos métodos da biogeografia histórica para delimitação de áreas de endemismo utilizando organismos pouco abundantes (Hymenoptera, Vespidae, Eumeninae)**. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas (Licenciatura Plena)) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- RICHARDS, O. W. **The Social Wasps of the Americas, excluding the Vespinae**. British Museum (Natural History), London, 1978.
- RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, 2012.
- SANTOS, J. C. et al. Caatinga: the scientific negligence experienced by a dry tropical forest. **Tropical Conservation Science**, v. 4, 276–286, 2011.
- SAITO, F.; KOJIMA, J. Phylogenetic analysis and biogeography of the nocturnal hornets, *Provespa* (Insecta: Hymenoptera: Vespidae: Vespinae). **Species Diversity**, v. 16, p. 65–74, 2011.
- SCHLICK-STEINER, B. C. et al. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity, **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 421–38, 2010.
- SCHMID-EGGER, C. et al. Revision of the West Palaearctic *Polistes* Latreille, with the descriptions of two species - an integrative approach using morphology and DNA barcodes (Hymenoptera, Vespidae). **ZooKeys**, v. 713, p. 53–112, 2017.
- SCHWARZFELD, M.; SPERLING, F. A. H. Species delimitation using morphology, morphometrics, and molecules: definition of the *Ophion scutellaris* Thomson species group, with descriptions of six new species (Hymenoptera, Ichneumonidae). **ZooKeys**, v. 462, p. 59–114, 2014.

SEVERTSOV, A. S. Relationship between fundamental and realized ecological niches. **Biology Bulletin Reviews**, v. 3, n. 3, p. 187–195, 2012.

SHARKEY, M. J. Phylogeny and Classification of Hymenoptera. **Zootaxa**, v. 1668, p. 512–548, 2007.

SHARKEY, M. J. et al. Phylogenetic relationships among superfamilies of Hymenoptera. **Cladistics**, v. 28, p. 80–112, 2011.

SIMON, C., F. et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n. 6, p. 651–701, 1994.

SITES, J. W.; MARSHALL, J. C. Operational criteria for delimiting species. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 35, p. 199–227, 2004.

SWOFFORD, D. L. Paup. 4.0b10. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 2002.

TANAKA JUNIOR, G. M.; SOLEMAN, R. A.; NOLL, F. B. Morphological and physiological variation between queens and workers of *Protonectarina sylveirae* (de Saussure) (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, n. 1, p. 104–109, 2010.

TAVARÉ, S. Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences. Lectures on Mathematics in the Life Sciences. **American Mathematical Society**, v. 17, p. 57–86, 1986.

VAN VALEN, L. Ecological species, multispecies, and oaks. **Taxon**, v. 25, p. 223–239, 1976.

VARGAS, H. A. et al. Prey identification in nests of the potter wasp *Hypodynerus andeus* (Packard) (Hymenoptera, Vespidae, Eumeninae) using DNA barcodes. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 58, n. 2, p. 157–160, 2014.

WANDELER, P.; HOECK, P. E. A.; KELLER, L. F. Back to the future: museum specimens in population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 22, n. 12, p. 634–642, 2007.

WHEELER, Q. D.; MEIER, R (Eds.). **Species concepts and phylogenetic theory – a debate**. Columbia University Press, New York, 2000.

WHEELER, Q. D.; PLATNICK, N. I. The Phylogenetic Species Concept (*sensu* Wheeler and Platnick). In: WHEELER, Q. D.; MEIER, R (Eds.). **Species concepts and phylogenetic theory – a debate**. Columbia University Press, New York, 2000.

WHEELER, Q. D. Taxonomic triage and the poverty of phylogeny. **Philosophical Transactions of the Royal Society, Biological Sciences**, v. 359, n. 1444, p. 571–583, 2004.

WHEELER, Q. D. (Ed.). **The New Taxonomy**, CRC Press, Ithaca, New York, 2008.

WHEELER, W. C. **Systematics: A course of Lectures**. Chichester: Ed. Wiley- Blackwell, 2012.

WIENS, J. J. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 875–878, 2007.

WILEY, E. O.; LIEBERMAN, B. S. **Phylogenetics: Theory and Practice of Phylogenetic Systematics**. New Jersey: Ed: Wiley-Blackwell, 2011.

WILKINS, J. S. Philosophically speaking, how many species concepts are there? **Zootaxa**, v. 2765, p. 58–60, 2011.

WILL, K. W. et al. The perils of DNA barcoding and the need for Integrative Taxonomy. **Systematic Biology**, v. 54, n. 5, p. 844–851, 2005.

YANG, Z.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: principals and practice. **Nature Reviews**, v. 13, p. 303–314, 2012.

YANG, Z. **Molecular Evolution: A Statistical Approach**. Oxford University Press, 2014.

YEATES, D. K. et al. Integrative taxonomy, or iterative taxonomy? **Systematic Entomology**, v. 36, p. 209–217, 2011.

ZACHOS, F. E. Tree thinking and species delimitation: guidelines for taxonomy and phylogenetic terminology. **Mammalian Biology**, v. 81, p. 185–188, 2016a.

ZACHOS, F. E. **Species concepts in Biology - Historical development, theoretical foundations and practical relevance**. Springer, Wien, 2016b.

ZHANG, Y. M.; RIDENBAUH, R. D.; SHARANOWSKI, B. J. Integrative taxonomy improves understanding of native beneficial fauna: revision of the Nearctic *Peristenus pallipes* complex (Hymenoptera: Braconidae) and implications for release of exotic biocontrol agents. **Systematic Entomology**, v. 42, p. 596–608, 2017.

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

ANEXO A – Espécimes utilizados nos estudos moleculares

Código	Espécie	Ano de coleta	Localidade	Coordenadas geográficas	Armazenamento	Coletor	Instituição
PAAT01	<i>P. ater</i>	2016	Brasil, MG, Ingaí	21°20'47"S 44°59'27"O	álcool	E. P. Pires	LSBI/UFLA
PAAT02	<i>P. ater</i>	2016	Brasil, MG, Ingaí	21°20'47"S 44°59'27"O	álcool	E. P. Pires	LSBI/UFLA
PAAT03	<i>P. ater</i>	2011	Brasil, SP, Ribeirão Grande	24°16'28"S 48°25'20"O	seco	N. W. Piroto	LSBI/UFLA
PAAT04	<i>P. ater</i>	2015	Brasil, MG, Ingaí	21°20'47"S 44°59'27"O	seco	E. P. Pires	LSBI/UFLA
PAAT05	<i>P. ater</i>	2016	Brasil, MG, Ingaí	21°20'47"S 44°59'27"O	seco	E. P. Pires	LSBI/UFLA
PAAT06	<i>P. ater</i>	2008	Brasil, PR, Curitiba	25°25'47"S 49°16'19"O	seco	G. A. R. Melo	LSBI/UFLA
PAAT07	<i>P. ater</i>	2015	Brasil, MG, Ingaí	21°20'47"S 44°59'27"O	seco	E. P. Pires	LSBI/UFLA
PAGH01	<i>P. ghiliani</i>	2013	Brasil, MG, Itanhandu	22°17'45"S 44°56'06"O	seco	M. G. Hermes	LSBI/UFLA
PAGH02	<i>P. ghiliani</i>	2007	Paraguai, Concepcion	23°24'13"S 56°31'18"O	seco	M. G. Hermes	LSBI/UFLA
PAGH03	<i>P. ghiliani</i>	2008	Brasil, AM, Pres. Figueiredo	02°03'44"S 59°58'28"O	seco	M. N. Morales	LSBI/UFLA
PAGH04	<i>P. ghiliani</i>	2012	Brasil, RO, Itapuã do Oeste	09°12'08"S 63°10'48"O	seco	B. Gomes	LSBI/UFLA
PAGH05	<i>P. ghiliani</i>	2011	Brasil, AM, Iranduba	03°17'06"S 60°11'09"O	seco	Somavilla & Azevedo (leg.)	LSBI/UFLA
PAGH06	<i>P. ghiliani</i>	2011	Brasil, AM, Iranduba	03°17'06"S 60°11'09"O	seco	Somavilla & Azevedo (leg.)	LSBI/UFLA
PAGH07	<i>P. ghiliani</i>	2015	Brasil, MG, Ingaí	21°20'47"S 44°59'27"O	seco	-	LSBI/UFLA
PAGH08	<i>P. ghiliani</i>	2012	Brasil, RO, Itapuã do Oeste	09°12'08"S 63°10'48"O	seco	B. Gomes	LSBI/UFLA
PAGH09	<i>P. ghiliani</i>	2009	Brasil, SP, Barretos	20°33'25"S 48°34'04"O	seco	F. B. Noll	LSBI/UFLA
PAGH10	<i>P. ghiliani</i>	2015	Brasil, MG, Ingaí	21°20'47"S 44°59'27"O	seco	E. P. Pires	LSBI/UFLA
PAGH11	<i>P. ghiliani</i>	1985	Peru, Madre de Dios	12°37'09"S 70°23'37"O	seco	Carpenter & Brothers	AMNH
PAGH12	<i>P. ghiliani</i>	1976	Equador, Napo	0°59'20"N 77°48'57"O	seco	-	AMNH
PAGH13	<i>P. ghiliani</i>	2008	Brasil, SP, Matão	21°36'10"S 48°21'57"O	seco	F. B. Noll	LSBI/UFLA
PAGH14	<i>P. ghiliani</i>	2015	Brasil, MG, Ingaí	21°20'47"S 44°59'27"O	seco	E. P. Pires	LSBI/UFLA
PASE01	<i>P. sericeus</i>	2009	Brasil, MS, Bonito	21°03'28"S 56°43'52"O	álcool	M. N. Morales (leg.)	LSBI/UFLA

ANEXO B – Espécimes examinados nos estudos morfológicos

As informações fornecidas entre aspas nesta seção é uma transcrição das etiquetas referentes aos exemplares. As aspas indicam as diferentes etiquetas para o mesmo espécime, e as barras invertidas (\) indicam diferentes linhas em uma mesma etiqueta. Os exemplares utilizados nos estudos morfométricos estão assinalados com um (*).

Pachymenes ater de Saussure

♀♀

*1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil, Paraná, Quatro\ Barras, Trilha Anhagava\ 25°23’S 49°00’W\15.x.2007, KS, Ramos *leg*” “Pachymenes\ ater Sss. ♀\ Grandinete, Y. C. det 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita); *1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil, Paraná\ Piraquara\ ii. 2006\ P. C. Grossi col.” “Pachymenes\ ater Sss. ♀\ Grandinete, Y. C. det 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita); *1 ♀, LSBI/UFLA: “BRASIL, Paraná, Tibagi\ Parque Estadual Guartelá,\ 09-11-XI-2007, 900 m,\ Manuel, P.C. Grossi col.” “Pachymenes\ ater Sss. ♀\ Grandinete, Y. C. det 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita); *1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil, Paraná, Piraquara\ Mananciais da Serra\ 30.X.2006 P. Grossi col.” “Pachymenes\ ater Sss. ♀\ Grandinete, Y. C. det 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita); *1 ♀, LSBI/UFLA: “BRASIL, Paraná, Piraquara,\ Mananciais da Serra\ 22.x.2008, 25°29’S\ 48°58’W P.C. Grossi (leg.)” “Pachymenes\ ater Sss. ♀\ Grandinete, Y. C. det 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita); *1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil RJ 6 km a NW\ de Itatiaia Pq Nac\ Itatiaia Hotel Simon 1100 m\ 22436°S 44609°W\ 28.x.2011 M. G. Hermes” “Pachymenes\ ater Sss. ♀\ Grandinete, Y. C. det 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita); *1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil, Minas Gerai\ Passa Quatro, Flona\ 22°23’S 44°56’W\ 09.iii.2013\ M.G. Hermes col.” “Pachymenes\ ater Sss. ♀\ Grandinete, Y. C. det 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita)

08. 1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil, Paraná\ Piraquara\ ii.2006\ P. C. Grossi col.” “Pachymenes ♀\ ater Sss.\ Grandinete, Y. C. det. 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita); *1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil, MG/Ingai,\ Res. Biol. Boqueirão\ Mata ciliar 21°20’47”S\ 44°59’27”W, 27.x.2009\ M.H. Simões col.”; *1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil, MG/Ingai,\ Res. Biol. Boqueirão\ Mata ciliar 21°20’47”\ 44°59’27”W, 18.viii.2009\ M.H. Simões col.”

11. 1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil RJ 6km a NW\ de Itatiaia Pq Nac\ Itatiaia Hotel Simon 1100m\ 22 436°S 44609°W. 28.x.2011 M. G. Hermes” “Pachymenes ♀\ ater SSS\ Grandinete, Y. C. det. 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita); *1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil, PR, Quatro\

- Barras, Morro\ Anhangava 11.III.2010\ M. G. Hermes col.” “Pachymenes ♀\ ater SSs\ Grandinete, Y. C. det. 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita); *1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil, Paraná\ Piraquara\ 22.xi.2005\ M. G. Hermes col.” “Pachymenes ♀\ ater SSs\ Grandinete, Y. C. det. 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita); *1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil, MG/Ingaí\ Res. Biol. Boqueirão\ Mata ciliar 21°20’47”S\ 44°59’27”W. 27.x.2009\ M. H. Simões col.”
15. 1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil, MG/Ingaí\ Res. Biol. Boqueirão\ Mata ciliar 21°20’47”S\ 44°59’27”W. 27.x.2009\ M. H. Simões col.”; *1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil, Minas Gerais\ Itanhandu\ 22°17’S 44°56’W\ 10.iii.2013\ M. G. Hermes col.” “Pachymenes ♀\ ater SSs\ Grandinete, Y. C. det. 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita); *1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil, Paraná, Piraquara\ Manciais da Serra\ 30.X.2006 P. Grossi col.” “Pachymenes ♀\ ater SSs\ Grandinete, Y. C. det. 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita); *1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil, Minas Gerais\ Passa Quatro, Flona\ 22°23’S 44°56’W\ 09.iii.2013\ M. G. Hermes col.” “Pachymenes ♀\ ater SSs\ Grandinete, Y. C. det. 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita)
19. 1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Jundiá\ Serra do Japi\ 14.x.2008\ Antikeira, P. A. P. col.” “EUM0367”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, MG/Ingaí\ Res. Biol. Boqueirão\ Mata ciliar 21°20’47”S\ 44°59’27”W 01.v.2009\ M. H. Simões col.”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “BRASIL, Paraná, Piraquara\ Mananciais da Serra\ 08.xi.2008, 25°29’S\ 48°58’W P. C. Grossi (leg.)” “Pachymenes ♀\ ater SSs\ Grandinete, Y. C. det. 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita); *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brazil, PR, Curitiba\ Rio Passaúna\ 29.III.2008\ G.A.R. Melo col.” “Ninho Paraná” (etiqueta manuscrita); *1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil, Minas Gerais\ Ingaí, Res. Biol.\ Boqueirão 21° 20’47’’S\ 44° 59’ 27’’ W, 08.x.2015\ E. P. Pires col.”
24. 1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Jundiá\ Serra do Japi\ 14.x.2008\ Antikeira, P.A.P. col.” “EUM0369”; *♀, AMNH: “Nova Teutonia\ Santa Cararina\ BRAZIL II-65\ Fritz Plaumann” (etiqueta parcialmente manuscrita) “Pachymenes ♀\ ater sss.\ Y. C. Grandinete det. 2015” (etiqueta parcialmente manuscrita); *1 ♀, AMNH: “ARG. -MISSIONES\ Dos de Mayo\ Fritz – XII. 73” “*Pachymenes ater*\ de Saussure, 1852\ Y. C. Grandinete det. 2014”
27. 1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil, Minas Gerais\ Ingaí, Res. Biol.\ Boqueirão 21° 20’47’’S\ 44° 59’ 27’’ W, 08.x.2015\ E. P. Pires col.”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil: SP, Gália e\ Alvinlândia\ Est. Ecol. Caetetus\ 24. ii. 2005\ Coleta ativa” “EUM0366” (verso da etiqueta).
29. 1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, Minas Gerais\ Ingaí, Res. Biol.\ Boqueirão 21° 20’47’’S\ 44° 59’ 27’’ W, 08.x.2015\ E. P. Pires col.”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brazil, PR, Curitiba\ Rio Passaúna\ 29.III.2008\ G.A.R. Melo col.” “Ninho Paraná” (etiqueta manuscrita).
- 1 ♀, LSBI/UFLA: “Brasil, Paraná\ Piraquara\ ii.2006\ P. C. Grossi col.” “Pachymenes ♀\ ater Sss.\ Grandinete, Y. C. det. 2014”; 2 ♀♀, UNISC: “BRA-RS-Santa Cruz do Sul\ Cinturão

Verde 01.04.2004\ leg: Marcel G. Hermes” “Pachymenes\ ater Sauss., 1852\ M. G. Hermes det., 2004”; 2 ♀♀, UNISC: “BRA-RS-Santa Cruz do Sul\ Cinturão Verde 05.03.2004\ leg: Marcel G. Hermes” “Pachymenes\ ater Sauss., 1852\ M. G. Hermes det., 2004”; 2 ♀♀, UNISC: “BRA-RS-Santa Cruz do Sul\ Cinturão Verde 29.iv.2004\ leg: Marcel G. Hermes” “Pachymenes\ ater Sauss., 1852\ M. G. Hermes det., 2004”; 1 ♀, UNISC: “BRA-RS-Santa Cruz do Sul\ Cinturão Verde 02.03.2004\ leg: Marcel G. Hermes” “Pachymenes\ ater Sauss., 1852\ M. G. Hermes det., 2004”; 1 ♀, UNISC: “BRA-RS-Santa Cruz do Sul\ Cinturão Verde 06.III.2004\ leg: Dione J. Krise” “Pachymenes\ ater Sauss., 1852\ M. G. Hermes det., 2004” 1 ♀, UNISC: “BRA-RS-Santa Cruz do Sul\ Cinturão Verde 05.02.2002\ leg: Dione J. Krise” “Pachymenes\ ater Sauss., 1852\ M. G. Hermes det., 2004” (etiqueta parcialmente manuscrita)

♂♂

3 ♂♂, IBILCE/UNESP: “Brazil, PR, Curitiba\Rio Passaúna\ 29.III.2008\ G. A. R. Melo col.” “Ninho Paraná” (etiqueta manuscrita) (genitália extraída)

1 ♂, AMNH: “BRAZIL: SP\ Est. Biol. Boracéia\ 23°39’S, 45°53’W\ 909 m, 2-5 May 1997\ James M. Carpenter” “Pachymenes\ ater\ Saussure ♂\ det. J. M. Carpenter” (etiqueta parcialmente manuscrita) (genitalia extraída)

2 ♂♂, LSBI/UFLA: “BRASIL, Paranáz Curitiba, Rio Passaúna\ 29.iii.2008,\ G. A. R. Melo (leg.)” “Pachymenes ♂\ ater Sss.\ Grandinete, Y. C. det. 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita).

1 ♂, LSBI/UFLA: “Brasil, Paraná, Piraquara\ Mananciais da Serra\ 12.II.2007 P. Grossi col.” “Pachymenes ♂\ ater Sss.\ Grandinete, Y. C. det. 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita)

2 ♂♂, LSBI/ULFA: “Brasil, SP, 5km a SWz de S. J. Barreiro, Serra\ da Bocaina 1050m\ 22.675°S 44.613°W\ 22.x.2011 M. G. Hermes” “Pachymenes ♂\ ater Sss.\ Grandinete, Y. C. det. 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita) (genitália extraída)

1 ♂, LSBI/UFLA: “Brasil, Minas Gerais\ Passa Quatro, Flona\ 22°23’S 44°56’W\ 09.iii.2013\ M. G. Hermes col.” “Pachymenes ♂\ ater Sss.\ Grandinete, Y. C. det. 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita) (genitália extraída)

1 ♂, LSBI/UFLA: “Brazil, PR, Tibagi\ P. E. Guartelá\ III.2010 Grossi &\ Parizotto cols.” “Pachymenes ♂\ ater Sss.\ Grandinete, Y. C. det. 2014” (etiqueta parcialmente manuscrita)

1 ♂, UNISC: “BRA-RS-Santa Cruz do Sul\ Cinturão Verde 05.02.2002\ leg: Dione J. Krise” (etiqueta parcialmente manuscrita) “N: 2364 L: 02\ P: 31 H: 15:00” (etiqueta parcialmente manuscrita) “Pachymenes\ ater Sauss., 1852\ M. G. Hermes det., 2004” (genitália extraída)

***Pachymenes ghiliani* (Spinola)**

♀♀

- *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Paulo de Faria\ 30.iii.2006\ Gomes, B. col.” “EUM0323”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Paulo de Faria\ 30.iii.2006\ Gomes, B. col.” “EUM0321”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Paulo de Faria\ 30.iii.2006\ Gomes, B. col.” “EUM0320”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Matão\ 22.x.2008\ Coleta ativa\ Tanaka, G. M. col.” “EUM0337”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Pindorama\ 23.ii.2011\ Coleta ativa\ Capusso, O. L. col.” “EUM0336”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Matão\ 09.i.2008\ Coleta ativa\ Tanaka, G. M. col.” “EUM0333”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Pindorama\ 02.ii.2010\ Coleta ativa\ Capusso, O. L. col.” “EUM0332”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Paulo de Faria\ 02.ii.2006\ Gomes, B. col.” “EUM0325”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Matão\ 28.vi.2007\ Noll, F. B. col.” “EUM0308”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Matão\ 01.ii.2007\ Noll, F. B. col.” “EUM0309”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Paulo de Faria\ 30.iii.2006\ Gomes, B. col.” “EUM0312”
12. 1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Paulo de Faria\ 18.v.2006\ Gomes, B. col.” “EUM0317”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Paulo de Faria\ 27.iv.2006\ Gomes, B. col.” “EUM0318”; *♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Paulo de Faria\ 22.iii.2005\ Gomes, B. col.” “EUM0319”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Paulo de Faria\ 30.iii.2006\ Gomes, B. col.” “EUM0326”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Paulo de Faria\ 11.v.2006\ Gomes, B. col.” “EUM0327”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brazil: RO, Itapuã do Oeste\ Floresta Nacional do Jamari\ 02.ix.2012\ Coleta ativa\ Gomes, B. col.” “EUM0328”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brazil: SP, Luiz Antônio\ Est. Ecol. Jataí (557m)\ 21°33’42”W/47°48’37”S\ 08.xi.2011 – Coleta ativa\ Grandinete, Y. C. col.” “EUM0345”
19. ♀, IBILCE/UNESP: “Brazil: RO, Porto Velho\ Universidade Federal de Rondônia\ 05.viii.20112 – Coleta Ativa\ Gomes, B. col.” “EUM0341”; 1* ♀, AMNH: “PERU: Madre de Dios\ Tambopata Wild. Res.\ 12°51’S,69 17’W, 290m\ 22-25 January, 1985\ J. Carpenter & D. Bowers” “*Pachymenes ghiliani* (Spinola, 1851)\ Y. C. Grandinete det. 2014”; *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Matão\ 15.iv.2008\ Noll, F. B. col.” “EUM0310”; *1 ♀, FFCLRP/USP: “F: Eumenidae\ S.F.:(” (etiqueta parcialmente manuscrita) “Loc: Cajuru SP\ Dat: 23-VI-984\ Col: Lacerda L. M.” (etiqueta manuscrita); *1 ♀, AMNH: “PARAGUAY: San\ Pedro. Rio Ypane\ Cororo\ XII.1983\ M. A. Fritz” “*Pachymenes ghiliani* (Spinola, 1851)\ Y. C. Grandinete det. 2014”; *1 ♀, AMNH: “PARAGUAY: San\ Pedro – Rio Ypane\ Cororo\ XII.1983\ M. A. Fritz” “*Pachymenes ghiliani* (Spinola, 1851)\ Y. C. Grandinete det.

2014”; *1 ♀, AMNH: “Bartica, BG\ V.13.1901” “*Pachymenes ghiliani* (Spinola)\ Det. J. M. Carpenter”; *1 ♀, AMNH: “BRITISH GUIANA\ Karabo, Bartica\ Dist. 1921” “Trop. Research Station\ New York Zool. Society\ No. 21/07” (etiqueta parcialmente manuscrita) “Gift of New York\ Zoo. Soc. Dept.\ Tropical Research\ William Beebe, Dir.” “*Pachymenes ghiliani* (Spinola)\ ♀ pallipes Sauss.\ det. J. v. Vecht 1976” “*Pachymenes* ♀\ *ghiliani* (Spin.)\ Y. C. Grandinete det. 2015” (etiqueta parcialmente manuscrita); *1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Paulo de\ Faria\ 13.iv.2006\ Gomes, B. col.” “EUM0314”; *1 ♀, AMNH: “San Jose\ (Costa Rica)” “425” “*Pachymenes* ♀\ *ghiliani* (Spin.)\ Y. C. Grandinete det. 2015” (etiqueta parcialmente manuscrita); *1 ♀, FFCLRP/USP: “Parque Est. Morro do Diabo\ Teodoro Sampaio-SP, Brasil\ 22°32’33”S, 52°19’40”W\ 14-16/11/1999 – Tavares leg.”

30. ♀, AMNH: “Belem, Para\ Brazil\ 5-V-1967\ Coll. Y. Sedman” “*Pachymenes* ♀\ *ghiliani* (Spin.)\ Y. C. Grandinete det. 2015” (etiqueta parcialmente manuscrita).

1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brazil: SP, Onda Verde\ Faz. Fischer\ 07.vi.2010\ Coleta ativa\ Capusso, O.L. col.” “EUM0335”; 1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brazil: SP, Onda Verde\ Faz. Fischer\ 17.xii.2009\ Coleta ativa\ Capusso, O.L. col.” “EUM0334”; 1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brazil: SP, Gália e\ Alvinlândia\ Est. Ecol. Caetetus\ 24.ii.2005\ Coleta ativa” “EUM0340”
1 ♀, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Paulo de\ Faria\ 13.iv.2006\ Gomes, B. col.” “EUM0324”.

♂♂

1 ♂, IBILCE/UNESP: “Brazil: SP, Pindorama\ 06.viii.2009\ Coleta ativa\ Capusso, O.L. col.” “EUM0331”; 1 ♂, IBILCE/UNESP: “Brazil, RO, Itapuã do Oeste\ Floresta Nacional do Jamari\ 18.viii.2012\ Coleta ativa\ Gomes, B. col.” (genitália extraída); 1 ♂, AMNH: “PARAGUAY: San\ Pedro, Rio Ypane\ Cororo\ XII.1983 (etiqueta parcialmente manuscrita) “*Pachymenes ghiliani* (Spinola, 1851)\ Y. C. Grandinete det. 2014”; 1 ♂, LSBI/UFLA: “BRASIL, AM, Presidente\ Figueiredo, AM 240 km 11\ Pousada Berro D’Água\ 23.viii.2008, 135 m, 2°03’44”S\ 59°58’28”W M. G. Hermes” “*Pachymenes* ♂\ *ghiliani* (Spin.)\ Grandinete, Y. C. det. 2014”; 1 ♂, IBILCE/UNESP: “Brazil: SP, Matão\ 22.x.2008\ Coleta ativa\ Tanaka, G. M. col.” “EUM0338”; 1 ♂, AMNH, “Restrepo\ Dept. Meta\ 500 M.” “Colombia\ 1936” “J. Bequaert\ Collector” “*Pachymenes ghiliani* (Spinola)\ Y. C. Grandinete det. 2014” (genitália extraída); 1 ♂, AMNH, “3” “BRAZIL: Est. Minas Gerais:\ Dionísio, 4 yr-old eucalyptus\ plantation, 21 April 2008\ R. Silva-Filho” (genitalia extraída)
1 ♂, IBILCE/UNESP: “Brazil: SP, Pindorama\ 02.ii.2010\ Coleta ativa\ Capusso, O. L. col.” “EUM0343” (genitália extraída); 1 ♂, IBILCE/UNESP: “Brasil, SP, Paulo de\ Faria\

13.iv.2006\ Gomes, B. col.” “EUM0311” (genitália extraída); 1 ♂, IBILCE/UNESP: “Brazil: SP, Magda\ 15.vii.2008\ Coleta ativa\ Tanaka, G. M. col.” “EUM0342” (genitália extraída).