



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THAIS KOTELOK DINIZ

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE
POPULAÇÕES DE *Euglossa stellfeldi* (APIDAE,
EUGLOSSINA) DE REMANESCENTES DE MATA
ATLÂNTICA DA COSTA BRASILEIRA**



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

Instituto Agronômico do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

THAIS KOTELOK DINIZ

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE
POPULAÇÕES DE *Euglossa stellfeldi* (APIDAE, EUGLOSSINA)
DE REMANESCENTES DE MATA ATLÂNTICA DA COSTA
BRASILEIRA**

Londrina
2019

THAIS KOTELOK DINIZ

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE
POPULAÇÕES DE *Euglossa stellfeldi* (APIDAE, EUGLOSSINA)
DE REMANESCENTES DE MATA ATLÂNTICA DA COSTA
BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Silvia Helena Sofia

Londrina
2019

THAIS KOTELOK DINIZ

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE
Euglossa stellfeldi (APIDAE, EUGLOSSINA) DE REMANESCENTES DE
MATA ATLÂNTICA DA COSTA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Silvia Helena Sofia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Dr^a Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki
Universidade Estadual de Maringá – UEL

Prof^a Dr^a Gabriele Antico Freiria
Centro Universitário Filadélfia – UNIFIL

Londrina, 22 de fevereiro de 2019.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Kotelok-Diniz, Thais

DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE *Euglossa stellfeldi* (APIDAE, EUGLOSSINA) DE REMANESCENTES DE MATA ATLÂNTICA DA COSTA BRASILEIRA / Thais Kotelok-Diniz. - Londrina, 2019.

78 f. il.

Orientador: Silvia Helena Sofia.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2019. Inclui bibliografia.

1. Abelhas das Orquídeas - Tese. 2. Diferenciação Genética - Tese. 3. Locos Microsatélites - Tese. 4. DNAm - Tese. I. Sofia, Silvia Helena. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

À minha família e amigos, em especial à minha mãe, que mais uma vez foi fundamental em mais uma etapa da minha vida, sempre me ajudando e apoiando com confiança.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e ao Departamento de Biologia Geral, por proporcionar as condições necessárias à realização deste trabalho. Também, à secretária Licia Munhoz do Departamento de Biologia Geral, por toda atenção e auxílios prestados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao CNPq e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Gabriele Antico Freiria e Dra. Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki, por prontamente aceitarem avaliar este trabalho e pela disponibilidade em contribuir pela melhoria do mesmo.

À orientadora Dra. Silvia Helena Sofia, por ser um exemplo de profissional, por toda a ajuda e disponibilidade sempre que eu precisei. Agradeço por todos os ensinamentos que obtive e por aqueles que ainda vou receber. Obrigada por toda ajuda e paciência no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Fernanda Simões de Almeida, por todos os ensinamentos e apoio no laboratório, assim como pelos momentos de descontração.

A todos os Professores que convivi durante a Pós-Graduação e que tanto contribuíram parte a minha formação. Obrigada por todos os ensinamentos.

Ao Dr. Dhiego Gomes Ferreira e novamente à Dra. Gabriele Antico Freiria que contribuíram de forma essencial na avaliação deste trabalho no Exame de Qualificação.

Aos técnicos do interlaboratório Dário Paschoal e Melyssa Amorim, por toda a disponibilidade em ajudar sempre que necessário e aos demais funcionários do Departamento por toda ajuda concedida.

À Dra. Isabel Alves-dos-Santos, Ms. Enderlei Dec, Dr. Guaraci Duran Cordeiro, Dr. Marco Antonio Del Lama, Dr. Léo Correia da Rocha-Filho, Dr. Douglas Caldeira Giangarelli, Dr. Wilson Frantine da Silva, Ms. Rafael Elias da Silva Penha, por terem cedido amostras que foram de grande importância para o desenvolvimento deste trabalho.

À Sarah e ao Lucas, por todo o auxílio com o preparo de placas e manejo do sequenciador.

À toda equipe do LAGEA, que além de colegas de laboratório se tornaram grandes amigos. Obrigada pela amizade, pelo companheirismo e por toda ajuda tanto profissional

quanto pessoal. Agradeço imensamente à todos que sempre estiveram dispostos a ajudar no que fosse, posso ter certeza que nunca estive sozinha.

Ao pessoal do LAGEA 2, Natália U., Welber, Rafael, Suzana e Natália H., por tornarem a viagem e o Encontro sobre Abelhas mais especial, muito obrigada pelo companheirismo. Agradeço também ao Welber pela coleta realizada na Bahia.

À Andressa, que no momento que comecei a ajudar ao mesmo tempo também aprendi muito. Obrigada pela amizade e por ser esta pessoa especial.

Aos meus colegas do mestrado.

Ao Douglas, por todo auxílio na identificação das amostras. Obrigada pela disponibilidade e pelos ensinamentos.

À Lenice, que sempre esteve disposta a ajudar, tirar dúvidas e conversar. Obrigada por toda a amizade e dedicação, e por sempre estar disposta a ouvir.

À Camila e à Caroline, por toda ajuda que foi dada no laboratório e na realização deste trabalho. Obrigada pela amizade, pelas conversas e conselhos.

Ao Wilson, por todo ensinamento, paciência e pela amizade. Obrigada por toda ajuda para a realização deste trabalho, pelas coletas realizadas e por ser este excelente profissional.

Ao Raul, pela amizade e por toda a ajuda disponibilizada para o desenvolvimento do trabalho, em especial na elaboração dos mapas.

Ao Gazal, pela amizade e por todos os jogos do Corinthians assistidos juntos. Obrigada pelas conversas e o apoio de sempre.

Às minhas “roommies” Cássia e Hellen, por aceitarem morar comigo e dividir o apartamento por esses dois anos e mais outros que virão. Tenho muito a agradecer por ter vocês comigo, sempre me apoiando, dando conselhos e nos momentos de descontração.

A todos os meus amigos, os que fiz antes do mestrado e os que vieram depois, muito obrigada pela amizade, companheirismo e por acreditarem em mim. Um agradecimento especial as minhas amigas Vanessa, Misley, Franciely e Tatiane por sempre torcerem por mim.

À toda minha família, meus avós, tias, primos, irmãos e em especial minha mãe Marlene, por toda confiança depositada em mim, por acreditar em minhas escolhas e por todo carinho de sempre.

Agradeço à todas as pessoas que acreditaram em mim e que de alguma forma deram a oportunidade para que eu pudesse chegar até aqui.

Muito Obrigada!

DINIZ, Thais Kotelok. **Diversidade genética e estrutura de populações de *Euglossa stellfeldi* (Apidae, Euglossina) de remanescentes de Mata Atlântica da Costa Brasileira**. 2019. 78 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A subtribo Euglossina (Hymenoptera, Apidae) é amplamente distribuída na região Neotropical, sendo mais diversificada e abundante em florestas úmidas. O grupo teve sua origem provavelmente na região da bacia Amazônica e diversas espécies ocorrem em diferentes formações vegetais. Na Mata Atlântica (MA) ocorrem cerca de 50 espécies do grupo, sendo metade destas endêmicas a este bioma. *Euglossa stellfeldi* Moure, 1947 é uma espécie de abelha das orquídeas (Apidae, Euglossina) endêmica da MA, apresentando uma distribuição que abrange áreas do sul (Santa Catarina) ao nordeste do Brasil (Alagoas). Como observado para outras espécies de Euglossina, populações de *E. stellfeldi* apresentam variações na coloração do integumento ao longo de sua distribuição, variando de azul-esverdeado ou azulado na região sul e coloração verde em direção à distribuição norte da espécie. Outro aspecto relevante diz respeito ao fato de pouco se saber sobre a estrutura genética de populações de *E. stellfeldi* de ambientes insulares em relação às de áreas continentais. Assim, este estudo teve como objetivo investigar a diversidade genética e estrutura de populações de *E. stellfeldi* amostradas em remanescentes de MA ocupando áreas continentais e ilhas, localizados ao longo das regiões sul e sudeste. As análises genéticas envolveram populações de 12 localidades, como segue: na região sul (JO: Joinville/SC, SF: São Francisco do Sul/SC, IS: Ilha do Superagui-Guaraqueçaba/PR, SM: Salto Morato-Guaraqueçaba/PR) e na região sudeste (IC: Ilha do Cardoso-Cananeia/SP, CA: Cananeia/SP, BE: Bertioga/SP, SS: São Sebastião/SP, IB: Ilhabela/SP, BU: Ilha dos Búzios-Ilhabela/SP, IA: Ilha Anchieta-Ubatuba/SP, UB: Picinguaba-Ubatuba/SP). Nas análises foram empregados marcadores nucleares (microssatélites) e mitocondriais (*citb* e *COI*). Para as análises de microssatélites foram amplificados 11 locos e genotipados 307 machos, foram identificados 139 alelos nas diferentes amostras. Para todos os estimadores de diversidade genética, a população de BU, a menor ilha dentre todas analisadas, foi a que apresentou os menores valores. O estimador Φ_{ST} (0,10) global indicou uma diferenciação genética significativa ($p < 0,05$) entre as populações analisadas. As comparações par a par, baseadas nos estimadores (Φ_{ST} e D_{est}), indicaram diferenciação genética significativa ($p < 0,05$) em 47 dos 55 pares de amostras analisadas. Nas análises mitocondriais foram utilizados 106 machos e analisada uma sequência concatenada de 1132 pb, sendo 460 pb do gene *citb* e 672 do gene *COI*, que resultaram em oito haplótipos identificados. Os marcadores mitocondriais revelaram níveis mais altos de estruturação genética do que os obtidos com os nucleares. Apenas para os marcadores mitocondriais foi encontrada correlação positiva significativa ($R^2=0,5268$; $p=0,010$) entre as distâncias genética (mt- Φ_{ST}) e geográfica (km). Apesar da baixa variação na sequência mitocondrial analisada, os resultados permitem sugerir uma possível quebra filogeográfica entre dois conjuntos de populações, um destes reunindo cinco populações acima de BE, que compartilharam de forma exclusiva o haplótipo 6 e, outro formado por seis populações mais ao sul de BE, compartilhando exclusivamente o haplótipo 1. A população de BE apresentou ambos os haplótipos e se mostrou como uma possível área de hibridização. Como já sugerido para outras espécies da subtribo, os resultados obtidos apontam para os machos como sexo dispersor também para *E. stellfeldi*.

Palavras-chave: Abelhas das Orquídeas. Diferenciação genética. Marcadores microssatélites. DNAm. *Citb*. *COI*.

Diniz, Thais Kotelok. **Genetic diversity and population structure of *Euglossa stellfeldi* (Apidae, Euglossina) from the Brazilian Atlantic Coastal Forest remnants**. 2019. 78 p. Dissertation (Master's degree in Genetic and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The subtribe Euglossina (Hymenoptera, Apidae), is largely distributed in the Neotropical region, being highly diverse and abundant in rainforests. This group had its probable origin in the Amazon basin region and several species occur in different plant formations. In the Atlantic Forest (AF) happen around to the 50 species of this group, being half of these endemic to this biome. *Euglossa stellfeldi* Moure, 1947 is a bee species of the orchids (Apidae, Euglossina) endemic to the AF, showing a distribution that covers south regions (Santa Catarina) to the northeast of Brazil (Alagoas). As observed for others Euglossina species, populations of *E. stellfeldi* showed color variations to the integument throughout its distribution, switching from blue-green or bluish in the southern region and green color towards the northern distribution of the species. Another relevant feature concerns the fact that little is known about the genetic structure to the *E. stellfeldi* populations from insular environments in front of continental regions. Therefore, this study aimed to investigate the genetic diversity and structure of *E. stellfeldi* populations sampled in AF remnants from continental and island areas, located along the south and southeast regions. Genetic analyzes involved populations from 12 places, as follows: in south region (JO: Joinville/SC, SF: São Francisco do Sul/SC, IS: Ilha do Superagui-Guaqueçaba/PR, SM: Salto Morato-Guaqueçaba/PR) and in the southeast region (IC: Ilha do Cardoso-Cananeia/SP, CA: Cananeia/SP, BE: Bertioga/SP, SS: São Sebastião/SP, IB: Ilhabela/SP, BU: Ilha dos Búzios-Ilhabela/SP, IA: Ilha Anchieta-Ubatuba/SP, UB: Picinguaba-Ubatuba/SP). In the analyzes were used nuclear (microsatellite) and mitochondrial markers (*citb* and *COI*). For the microsatellite analysis, 11 loci were amplified and genotyped 307 males, were identified 139 alleles in the different samples. For all genetic diversity estimators, the BU population, the smallest island among all analyzed, was the one with the lowest values. The Φ_{ST} (0.10) global estimator indicated a significant genetic differentiation ($p < 0.05$) among the populations analyzed. Peer-to-peer comparisons, based on the estimators (Φ_{ST} and D_{est}), showed significant genetic differentiation ($p < 0.05$) in 47 of the 55 samples pairs analyzed. For mitochondrial analyzes, 106 males were used and a concatenated sequence of 1132 bp was analyzed, being 460 bp of the gene *cyt b* and 672 of the *COI* gene, which resulted in eight haplotypes identified. Mitochondrial markers revealed higher levels of genetic structuration than observed with nuclear ones. Just mitochondrial markers showed a significant positive correlation ($R^2 = 0.5268$; $p = 0.010$) between genetic (mt- Φ_{ST}) and geographic (km) distances. Although, to the low variation in the mitochondrial sequence analyzed, the results suggest a possible phylogenetic break between two populations, one of these bringing together five populations above BE, that shared exclusively the haplotype 6 and other one formed by six populations from south of BE, sharing exclusively haplotype 1. The BE population presented both haplotypes and showed as a possible area of hybridization. As previously suggested for other species of the subtribe, the results obtained show the males as dispersing sex for *E. stellfeldi*.

Keywords: Orchid bees. Genetic differentiation. Microsatellites markers. DNAm. *Citb*. *COI*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Macho de *Euglossa stellfeldi* Moure, 1947 (Foto: FRANTINE SILVA, 2018).....18
- Figura 2** - Mapa da região leste do Brasil mostrando a origem geográfica dos exemplares de *Euglossa stellfeldi* utilizados no estudo de Ferrari e Melo (2014). Distribuição original da Mata Atlântica é indicada em cinza escuro. Diferentes formas de coloração estão ilustradas a direita. (Foto: FERRARI; MELO, 2014)19
- Figura 3** - (A) Superfície interior da tíbia posterior de um macho de *E. stellfeldi*. (B) Superfície exterior da tíbia média de um macho de *E. stellfeldi*, mostrando o tufo de pelos da área aveludada. (Foto: FARIA; MELO, 2007)20
- Figura 4** - Representação esquemática do genoma mitocondrial de *Apis mellifera* mostrando seus genes (Fonte: GONÇALVES, 2010)25
- Figura 5** - A) Mapa parcial do Brasil e distribuição dos gráficos de pizza indicando a frequência e distribuição de cada haplótipo; B) Rede de haplótipos obtida a partir do sequenciamento das regiões *citb* e *COI* (DNAm) em 110 amostras de *Euglossa stellfeldi* provenientes de 14 localidades. Os tamanhos dos círculos são proporcionais às frequências dos haplótipos. Amostras de Paraty (Rio de Janeiro) e Camacan (Bahia) obtidas do NCBI (FERRARI; MELO, 2014).....42
- Figura 6** - (A) Estimativa do número de agrupamentos (K) a partir da estatística ΔK de Evanno *et al.* (2005). (B) Representação gráfica dos agrupamentos bayesianos ($K=2$, $K=3$ e $K=5$), gerados a partir de onze *locos* de microssatélites para os onze pontos analisados de *Euglossa stellfeldi*.....45
- Figura 7** - Correlação entre distâncias geográfica (km) e genética, com base no estimador $mt-\Phi_{ST}$, entre as 12 áreas de estudo amostradas para *Euglossa stellfeldi*, a partir da análise de segmentos dos genes mitocondriais *citb* e *COI*.....46
- Figura 8** - Distribuição *mismatch* para os haplótipos mitocondriais obtidos para os doze pontos analisados para *Euglossa stellfeldi*, comparando distribuição esperada para o cenário de crescimento populacional (linha sólida; Exp) e a distribuição observada (linha pontilhada; Obs). (A) Populações ao sudeste (JO a CA); (B) populações ao sul (BE a UB); (C) todas as populações47

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Lista com os doze pontos amostrados para coleta de <i>Euglossa stellfeldi</i> nas regiões de Mata Atlântica, entre os estados de Santa Catarina e São Paulo. N = número de indivíduos coletados..... | 31 |
| Tabela 2 - Distância geográfica (km) entre os pontos em que as populações de <i>Euglossa stellfeldi</i> foram amostradas..... | 34 |
| Tabela 3 - Diversidade genética de <i>Euglossa stellfeldi</i> , obtida a partir de marcadores microssatélites e mitocondriais (DNAm). N – Número de indivíduos analisados, A – número total de alelos, R_A – riqueza alélica, \bar{N}_A – número médio de alelos, \bar{N}_E – número de alelos efetivos, N_P – número de alelos privados, H_E – heterozigosidade esperada, H' - diversidade Shannon-Wiener, J' - índice de equitabilidade, S – número de sítios polimórficos, h – número de haplótipos, H_d – Diversidade haplotípica, π – Diversidade nucleotídica, D – Teste de neutralidade de Tajima (1989), F_s – Teste de neutralidade de Fu (1997). Total – Estimativas gerais para todos os pontos analisados | 41 |
| Tabela 4 - Distribuição dos 8 haplótipos e seus sítios variáveis encontrados entre 110 amostras de <i>Euglossa stellfeldi</i> | 43 |
| Tabela 5 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) e variação genética (Φ_{ST}) para as amostras de <i>Euglossa stellfeldi</i> dos nove pontos estudados, mostrando a porcentagem de variação entre e dentro de populações, obtida a partir de marcadores microssatélites e mitocondriais..... | 43 |
| Tabela 6 - Diferenciação genética par a par obtida a partir de dados de microssatélites para amostras de <i>E. stellfeldi</i> a partir do D_{est} de Jost (2008) (Diagonal superior) e Φ_{ST} (Diagonal inferior) | 44 |
| Tabela 7 - Diferenciação genética par a par ($mt-\Phi_{ST}$) obtida para amostras de <i>Euglossa stellfeldi</i> , a partir de haplótipos mitocondriais..... | 45 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 | AS ABELHAS DAS ORQUÍDEAS (EUGLOSSINA) | 15 |
| 1.1.1 | <i>Euglossa stellfeldi</i> Moure, 1947 | 18 |
| 1.2 | IMPORTÂNCIA E FRAGILIDADE DA MATA ATLÂNTICA | 21 |
| 1.3 | POPULAÇÕES EM AMBIENTES INSULARES | 21 |
| 1.4 | MARCADORES MOLECULARES | 23 |
| 1.4.1 | Marcadores Microsatélites | 23 |
| 1.4.2 | Marcadores Mitocondriais | 24 |
| 2 | OBJETIVOS | 26 |
| 2.1 | OBJETIVOS GERAIS | 26 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 26 |
| 3 | MANUSCRITO | 27 |
| 3.1 | INTRODUÇÃO | 29 |
| 3.2 | MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 3.2.1 | Área de Estudo e Amostragem | 31 |
| 3.2.2 | Extração e Quantificação do DNA | 35 |
| 3.2.3 | Análises Moleculares | 35 |
| 3.2.3.1 | <i>Marcadores Microsatélites</i> | 35 |
| 3.2.3.2 | <i>Marcadores Mitocondriais</i> | 36 |
| 3.2.4 | Purificação e Sequenciamento | 37 |
| 3.2.5 | Análise dos Dados | 37 |
| 3.2.5.1 | <i>Marcadores Microsatélites</i> | 37 |
| 3.2.5.2 | <i>Marcadores Mitocondriais</i> | 38 |
| 3.3 | RESULTADOS | 39 |
| 3.3.1 | Diversidade Genética | 39 |
| 3.3.2 | Estrutura Genética | 43 |
| 3.4 | DISCUSSÃO | 47 |
| 3.5 | REFERÊNCIAS | 52 |
| 4 | CONCLUSÕES | 59 |
| 5 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 60 |
| | APÊNDICES | 68 |

1 INTRODUÇÃO

A subtribo Euglossina (Hymenoptera, Apidae) tem sua origem atribuída a região Neotropical, onde são amplamente distribuídas, com uma maior diversificação nas Américas do Sul e Central, com algumas espécies ocorrendo na América do Norte, ao sul dos Estados Unidos. As espécies desta subtribo ocorrem em diferentes biomas, entretanto são muito mais diversificadas e abundantes em florestas úmidas, com uma riqueza maior de espécies ocorrendo na região da Amazônia quando comparadas com regiões de Mata Atlântica (SILVEIRA et al., 2002). A subtribo reúne cerca de 240 espécies que estão distribuídas em cinco gêneros - *Aglae*, *Eufriesea*, *Euglossa*, *Eulaema* e *Exaerete* (MOURE et al., 2012).

Devido a capacidade de conseguir voar longas distâncias, as abelhas desta subtribo são consideradas importantes polinizadores de diversas espécies vegetais da região Neotropical (JANZEN, 1971). Em razão disto, algumas espécies de Euglossina são caracterizadas por possuírem uma dispersão sexo-assimétrica, em que as fêmeas tendem a permanecer próximas aos ninhos após emergência, sendo consideradas colonizadoras, e os machos apresentando a função de sexo dispersor, promovendo o fluxo gênico e a variabilidade genética (LÓPEZ-URIBE, 2006; CERÂNTOLA, 2009).

Uma abordagem que tem sido muito importante para a compreensão dos processos que determinam a distribuição geográfica da diversidade biológica de diversas espécies de abelhas é a teoria de biogeografia de ilhas (MACARTHUR; WILSON, 1967). Esta teoria relaciona as alterações na abundância e riqueza de comunidades, principalmente em relação ao tamanho dos fragmentos e seu grau de isolamento. Estudos envolvendo a diversidade genética de diferentes espécies de abelhas em ambientes insulares são importantes para avaliar a variabilidade genética, que sendo baixa pode ser prejudicial às populações, estando relacionada à baixa capacidade adaptativa dessas populações podendo acarretar em sua extinção.

Aproximadamente 50 espécies de Euglossina ocorrem na Mata Atlântica, e estudos mostram que dentro da ampla faixa de distribuição latitudinal deste bioma ocorre uma queda na diversidade de espécies da subtribo Euglossina, da região norte em direção a região sul da América do Sul (REBÊLO, 2001; NEMÉSIO, 2010; MATTOZO et al., 2011). A fragmentação do habitat é considerada uma das principais causas no declínio nas populações de polinizadores em todo o mundo (WINFREE et al., 2009; MARTINS; MELO, 2010; POTTS et al., 2010). Neste contexto, estudos indicam que algumas espécies de abelhas são sensíveis à esta fragmentação (SOFIA; SUZUKI, 2004; GIANGARELLI et al., 2009),

correlacionando o tamanho dos fragmentos com a abundância de abelhas (BROSI, 2009) e comprometendo o seu deslocamento (POWELL; POWELL, 1987).

Euglossa stellfeldi Moure, 1947 é uma espécie pertencente a subtribo Euglossina, endêmica da Mata Atlântica, com uma distribuição geográfica estendendo-se ao longo da costa brasileira, em regiões tanto do continente quanto em ilhas, abrangendo porções das regiões sul, sudeste e nordeste do Brasil. Esta espécie possui um padrão de coloração com espécimes na região sul do Brasil apresentando coloração azul ou verde-azulada e com espécimes na região mais ao norte do Brasil com coloração verde (FARIA JR; MELO, 2007). Estudos realizados com *Euglossa iopocila* Dressler, que apresenta um padrão semelhante de distribuição da cor do integumento, revelaram uma importante estrutura genética entre as populações e registraram uma importante quebra filogeográfica entre os clados mais ao norte e os clados mais ao sul (PENHA et al., 2015; FRANTINE-SILVA et al., 2017). Um estudo genético realizado com *E. stellfeldi* mostrou uma estruturação genética significativa quando comparados ambientes de ilhas com áreas continentais (ROCHA-FILHO et al., 2013).

As abelhas desta subtribo apresentam características genéticas que a tornam um relevante material biológico para o estudo das influências do tamanho populacional reduzido em ilhas naturais ou em fragmentos florestais. Em decorrência deste fato, marcadores moleculares têm sido ferramentas importantes nas análises envolvendo estudos populacionais, abordando a estrutura e a diversidade genética das populações de diferentes espécies (SUZUKI et al., 2010; CERÂNTOLA et al., 2011; LÓPEZ-URIBE et al., 2011; FREIRIA et al., 2012; GIANGARELLI et al., 2015; PENHA et al., 2015; FRANTINE-SILVA et al., 2017). Até o presente momento, os estudos acerca da diversidade genética e estrutura de populações de *Euglossa stellfeldi* ainda são escassos (ROCHA-FILHO et al., 2013; FERRARI; MELO, 2014).

1.1 AS ABELHAS DAS ORQUÍDEAS (EUGLOSSINA)

Euglossina (Hymenoptera, Apidae) é uma subtribo considerada de origem Neotropical, originando-se provavelmente na bacia amazônica. O seu surgimento ocorre no final do Cretáceo, há aproximadamente 80 milhões de anos, período no qual a América do Sul encontrava-se isolada dos demais continentes (SILVEIRA et al., 2002; ROUBIK; HANSON, 2004). Dada sua origem, o grupo é amplamente distribuído na região Neotropical, a área de ocorrência é do norte da Argentina ao sul dos Estados Unidos, com maior diversificação nas Américas do Sul e Central (REBÊLO, 2001). Além disso, algumas espécies são encontradas na América do Norte (SILVEIRA et al., 2002). Com relação aos ecossistemas, as espécies

desta subtribo são encontradas em vários deles, como Mata Atlântica (PERUQUETTI et al., 1999; NEMÉSIO, 2009), Floresta Amazônica (REBÊLO, 2001), Cerrado (ALVARENGA et al., 2007; JUSTINO; AUGUSTO, 2012) e Caatinga (DRESSLER, 1982; ZANELLA, 2000), sendo mais diversificadas e abundantes em florestas úmidas, com uma maior riqueza de espécies na Amazônia, especialmente mais ao interior e ao sul de sua distribuição (SILVEIRA et al., 2002; ROUBIK; HANSON, 2004; RAMÍREZ et al., 2010).

As abelhas desta subtribo possuem tamanhos de moderados a grandes, variando de 8,5mm a 29mm, apresentam coloração metálica brilhante (SILVEIRA et al., 2002) e com características morfológicas únicas como possuir uma probóscide longa, maiores nas espécies do gênero *Euglossa* (MICHENER, 2000). Além disso, os machos apresentam tíbias posteriores grandes, as quais são intumescidas e possuem uma fenda pilosa na metade apical da margem posterior. As tíbias possuem o órgão tibial formado por um tecido esponjoso onde são estocados compostos aromáticos. Uma característica marcante desta subtribo é o fato de seus machos coletarem substâncias aromáticas, geralmente produzidas em flores de Orchidaceae, Araceae, Solanaceae, entre outras fontes, tais compostos são muito provavelmente utilizados na atração das fêmeas (SILVEIRA et al., 2002). As abelhas desta subtribo são consideradas importantes polinizadoras de mais de 60 famílias vegetais e cerca de 700 espécies de orquídeas neotropicais (RAMÍREZ et al., 2002; ROUBIK; HANSON, 2004; ROCHA-FILHO et al., 2012; FERREIRA-CALIMAN et al., 2018), fato que levou o grupo a ser popularmente conhecido como “abelhas das orquídeas” (DRESSLER, 1982; CAMERON, 2004). Um estudo realizado com espécies desta subtribo evidenciou a preferência na busca destes compostos aromáticos em espécies vegetais nativas (FERREIRA-CALIMAN et al., 2018).

Devido ao comportamento de coletar fragrâncias, os machos de Euglossina podem ser atraídos por iscas utilizando fragrâncias artificiais sintetizadas (DODSON et al., 1969; OLIVEIRA; CAMPOS, 1996; ELTZ et al., 1999; OLIVEIRA, 2000). A utilização destas iscas permitiu um grande avanço no estudo da subtribo e com isso, a realização de vários estudos de levantamento de espécies (RAMÍREZ et al., 2002; NEMÉSIO, 2009; JUSTINO; AUGUSTO, 2012; DEC; MOUGA, 2014), assim como a realização de estudos para compreensão dos efeitos da fragmentação em remanescentes florestais (RAMALHO, 2006) que algumas espécies de Euglossina aparentam ser sensíveis a alterações nos ambientes (POWELL; POWELL, 1987; GIANGARELLI et al., 2009).

Outra característica relevante, que tornam as abelhas da subtribo Euglossina importantes agentes polinizadores em florestas da região Neotropical é a capacidade de

conseguir voar longas distâncias (JANZEN, 1971; POKORNY et al., 2015). Em um estudo realizado com a espécie *Euglossa cordata*, os autores evidenciam que os machos desta espécie migram e disseminam o material genético entre as populações, caracterizando uma dispersão sexo-assimétrica (CERÂNTOLA et al., 2011). Em razão deste fato, é reconhecido em algumas espécies de Euglossina a função de dispersão sexo-assimétrica, sendo que os machos teriam a função de sexo dispersor, promovendo o fluxo gênico e a entrada de variação genética, e as fêmeas com comportamento filopátrico, permanecendo próximas as áreas de nidificação, sendo consideradas colonizadoras (LÓPEZ-URIBE, 2006; CERÂNTOLA, 2009).

O gênero *Euglossa* é o mais diversificado dos cinco gêneros pertencentes a subtribo Euglossina, sendo estas as menores (9-19mm) e as mais coloridas abelhas da subtribo, com espécies apresentando coloração metálico brilhante, a maioria com coloração verde e algumas com coloração azulada, violeta e cobreada (DRESSLER, 1982; MICHENER, 2000; SILVERIA et al., 2002; CAMERON, 2004; ROUBIK; HANSON, 2004). O gênero tem sua distribuição em vários países da região Neotropical, ocorrendo do Paraguai até regiões do sul do México (MICHENER, 2000; MOURE et al., 2012).

Do pouco que se conhece, a maioria das espécies de Euglossina parecem não apresentar comportamento social, entretanto, em alguns casos, as fêmeas podem compartilhar um mesmo ninho cooperativamente (DRESSLER, 1982; GARÓFALO et al., 1998; SILVEIRA et al., 2002), apresentando aspectos bionômicos que são sugeridos como precursores da origem da eusocialidade em Apinae (GARÓFALO, 1985; AUGUSTO; GARÓFALO, 2004; OTERO et al., 2008; ANDRADE-SILVA et al., 2012, 2015; FREIRIA et al., 2017). A maioria das espécies deste gênero constroem seus ninhos como uma urna de resina, aglomerados dentro de cavidades pré-existente em troncos de árvores, em barrancos ou edificações e algumas espécies constroem expostos sobre ramos ou gravetos (SILVEIRA et al., 2002). Deste modo, o hábito de nidificar em cavidades pré-existentes é o mais frequente, enquanto que os ninhos aéreos são considerados raros, o que pode ocasionar dificuldade de visualização em campo (GARÓFALO, 1994; AUGUSTO; GARÓFALO, 2007; OTERO et al., 2008; AUGUSTO; GARÓFALO, 2009; ANDRADE-SILVA et al., 2012, 2015; FREIRIA et al., 2017).

Nas últimas décadas, uma série de levantamentos de Euglossina foram realizados ao longo da Mata Atlântica e uma parte significativa destes foram revistos em Nemésio (2009). Das cerca de 240 espécies da subtribo, mais de 50 espécies têm ocorrência reconhecida na Mata Atlântica, sendo metade destas endêmicas a este bioma (NEMÉSIO; SILVEIRA, 2007; NEMÉSIO, 2009). Porém, enquanto a diversidade de espécies da subtribo encontra-se bem

conhecida para a Mata Atlântica, ainda são poucos os estudos genéticos envolvendo espécies endêmicas à este bioma (FREIRIA et al., 2012; ROCHA-FILHO et al., 2013; GIANGARELLI et al., 2015; PENHA et al., 2015; FRANTINE-SILVA et al., 2017). De modo similar, são poucos os estudos que visam avaliar a dispersão sexo-assimétrica de espécies desta subtribo (LÓPEZ-URIBE, 2006; CERÂNTOLA, 2009), relacionado ao provável comportamento filopátrico das fêmeas (LÓPEZ-URIBE et al., 2014; PENHA et al., 2015) e a hipótese de que machos de Euglossina atuam como o sexo dispersor (CERÂNTOLA et al., 2011; ROCHA-FILHO et al., 2013; LÓPEZ-URIBE et al., 2014; PENHA et al., 2015; SUNI, 2017).

1.1.1 *Euglossa stellfeldi* Moure, 1947

Euglossa stellfeldi Moure, 1947 (Figura 1) é uma espécie pertencente a subtribo Euglossina, considerada uma espécie endêmica da Mata Atlântica. Com sua ocorrência descrita em áreas litorâneas, em regiões continentais e em ilhas. A amplitude de sua ocorrência estende-se entre os estados de Santa Catarina e São Paulo (DRESSLER, 1982; MATTOZO et al., 2011; CORDEIRO et al., 2013), seguindo pela região do Rio de Janeiro (NEMÉSIO, 2009), até à região serrana do Espírito Santo (BUYS et al., 2013) e na porção litorânea do sul da Bahia e Alagoas (ANDRADE-SILVA et al., 2012; FERRARI; MELO, 2014).

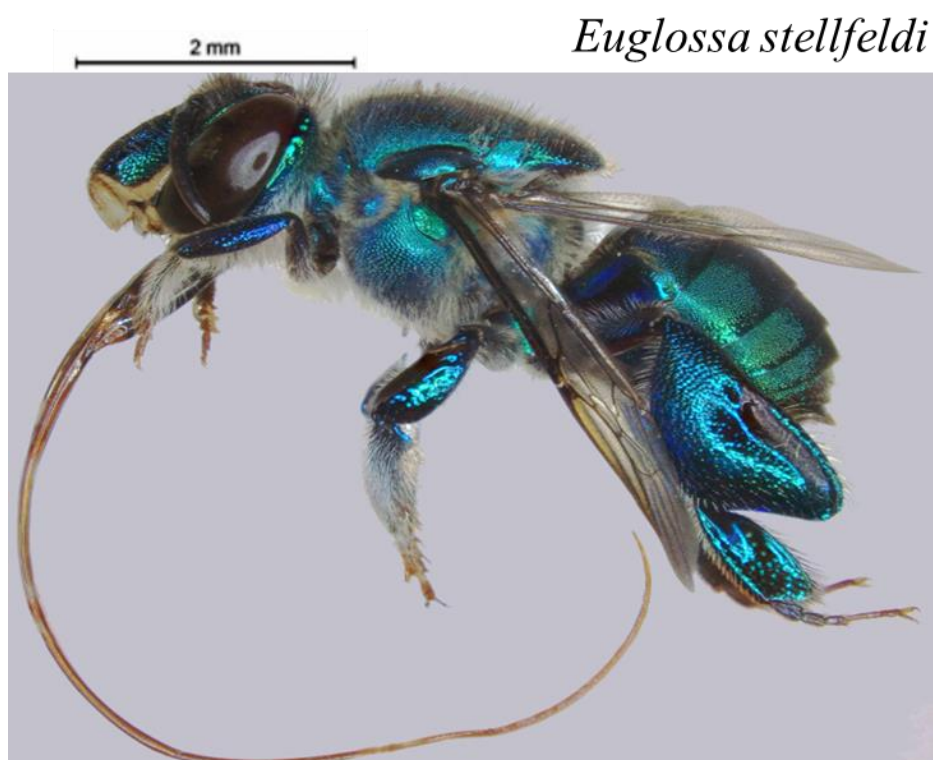


Figura 1. Macho de *Euglossa stellfeldi* Moure, 1947 (Foto: FRANTINE-SILVA, 2018).

A espécie possui um notável padrão de coloração ao longo de sua distribuição, com indivíduos de coloração azul restritos às porções de maior latitude, ao sul do Brasil, e indivíduos de coloração verde, com distribuição mais ao norte, em porções de menor latitude da região de ocorrência (FERRARI, 2012). Entretanto, alguns indivíduos apresentam coloração intermediária, azul-esverdeado, ocorrendo na porção média de distribuição da espécie, do litoral nordeste de São Paulo e litoral sudeste do Rio de Janeiro, possivelmente revelando a existência de uma zona de hibridização (FERRARI; MELO, 2014) (Figura 2).

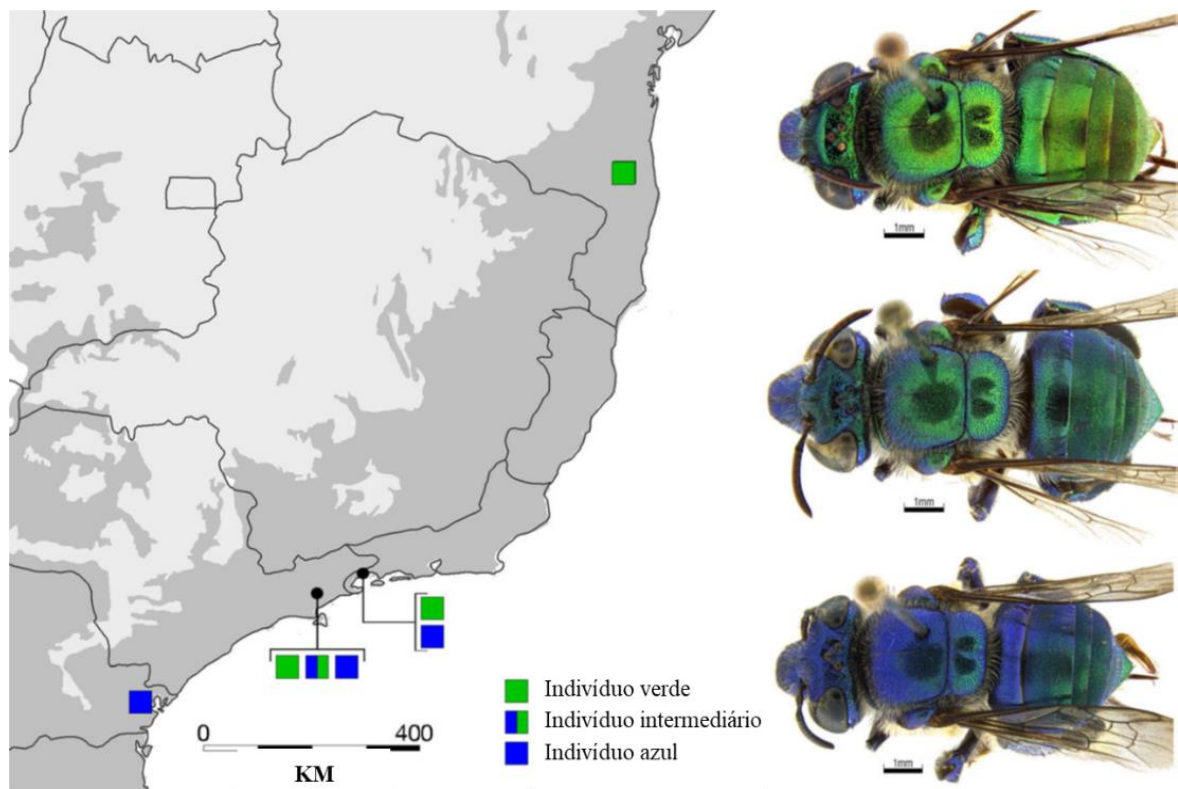


Figura 2. Mapa da região leste do Brasil mostrando a origem geográfica dos exemplares de *Euglossa stellfeldi* utilizados no estudo de Ferrari e Melo (2014). Distribuição original da Mata Atlântica é indicada em cinza escuro. Diferentes formas de coloração podem ser observadas a direita. (Foto: FERRARI; MELO, 2014).

Devido a ocorrência deste padrão de coloração, espécies similares a *E. stellfeldi* foram descritas por Dressler (1982), denominada *Euglossa carinilabris*, a qual ocorre na Bahia, apresentando coloração verde-dourada (FARIA JR; MELO, 2007) e por Nemésio (2007), denominada de *Euglossa solangeae*. Contudo, estudos posteriores evidenciaram que os diferentes padrões de coloração: *E. solangeae* para a forma verde-azulada com distribuição do Paraná ao norte de São Paulo e *E. carinilabris* apresentando coloração verde-dourada com distribuição do norte de São Paulo até Alagoas (NEMÉSIO, 2009), seriam a forma de distribuição apenas litorânea até então atribuída como *E. stellfeldi*, correspondendo a estas

duas espécies (FARIA; MELO, 2007). Posteriormente, o *status* de *E. stellfeldi* foi reavaliado, com a transferência da espécie do subgênero *Glossura* Cockerell, 1917 para *Glossurella* Dressler, 1982, o que tornaria *Glossura* um grupo mais homogêneo (FARIA; MELO, 2007).

Características estruturais únicas encontradas na tíbia posterior e média de machos de *E. stellfeldi* são utilizadas para facilitar a identificação desta espécie quando comparadas com outras espécies de *Euglossa* similares (Figura 3).

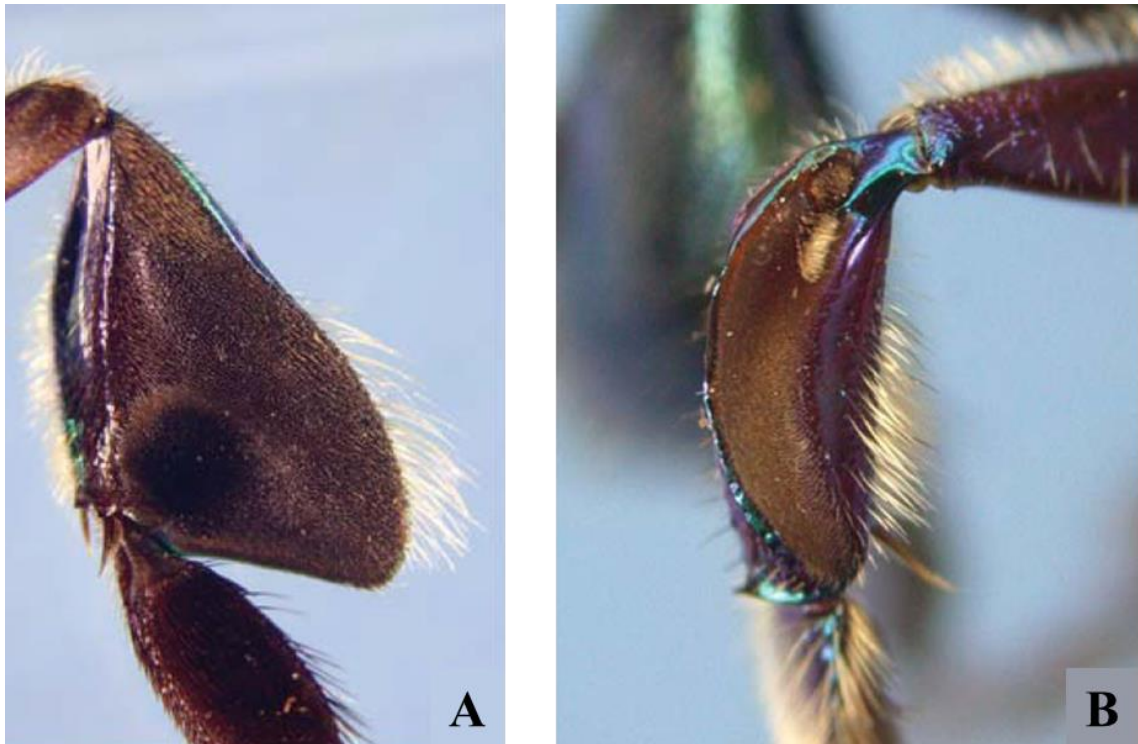


Figura 3. (A) Superfície interior da tíbia posterior de um macho de *E. stellfeldi*. (B) Superfície exterior da tíbia média de um macho de *E. stellfeldi*, mostrando o tufo de pelos da área aveludada. (Foto: FARIA; MELO, 2007).

Alguns estudos já foram realizados com *E. stellfeldi* em ambientes de Mata Atlântica, relacionados a sua área de ocorrência e avaliações morfológicas (FARIA JR; MELO, 2007; NEMÉSIO, 2009; ANDRADE-SILVA et al., 2012; CORDEIRO et al., 2013; BUYS et al., 2013; COSTA; FRANCOY, 2017). De modo distinto, ainda são poucos os estudos genéticos envolvendo *E. stellfeldi* (ROCHA-FILHO et al., 2013; FERRARI; MELO, 2014). No estudo de Rocha-Filho et al. (2013) os autores avaliaram a estrutura genética de *E. stellfeldi*, que apresentou uma estruturação genética significativa em ambientes insulares comparados com áreas continentais. Entretanto, ainda são escassos estudos envolvendo esta espécie em ambiente insulares, assim como estudos que avaliam seus possíveis padrões de dispersão sexo-assimétrica.

1.2 IMPORTÂNCIA E FRAGILIDADE DA MATA ATLÂNTICA

A Mata Atlântica (MA) abriga mais de 50 espécies de Euglossina, mais de 60% de todas as espécies terrestres do planeta (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005) e é considerada uma das 25 áreas de maior biodiversidade do mundo (MYERS et al., 2000). Deste modo, é classificada como uma das áreas mais ricas em espécies da fauna e da flora mundial, apresentando aproximadamente 2.300 espécies de vertebrados e 20.000 espécies vegetais, sendo que uma parte significativa destas espécies são endêmicas a este bioma (PINTO et al., 2006). A MA é composta por diferentes formações vegetais, incluindo: Floresta Ombrófila do Litoral (Serra do Mar), ao longo das encostas do litoral sul ao nordeste do Brasil; Floresta Semidecidual do Planalto, do planalto central e interior do sudeste do Brasil; Floresta de Araucária dos estados sulinos; Manguezais; Restingas; Campos de Altitude (TONHASCA, 2005; MORELLATO; HADDAD, 2000). Seus domínios avançam para dentro de regiões tropicais e subtropicais ao longo de uma ampla faixa latitudinal e longitudinal, contribuindo com elevados graus de endemismo da fauna e flora (RIBEIRO et al., 2009), além de variedade na composição vegetal (MORELLATO; HADDAD, 2000; GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005).

Atualmente encontra-se com apenas 7% de sua cobertura total (IBGE, 2017), sendo apontada como uma das florestas tropicais mais ameaçadas de extinção, sofrendo grande pressão antrópica. O total de desflorestamento identificado nas áreas dos 17 estados onde a MA ocorre, no período de 2015 a 2016, foi de 29.075 hectares, comparando com o período de 2014 a 2015 com 18.433 hectares desmatados, houve um aumento de 57,7% na taxa de desflorestamento (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2017). Dentre os seus maiores remanescentes, estão os “Corredores da Biodiversidade” classificados como “Corredor do Centro de Endemismo Pernambuco” (PE-AL), “Corredor Central” (BA-ES-MG) e “Corredor da Serra do Mar” (MG-RJ-SP-PR) (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005).

1.3 POPULAÇÕES EM AMBIENTES INSULARES

Os estudos de populações de diferentes organismos que habitam ilhas podem contribuir para o entendimento de diferentes processos, tais como: extinção, colonização, dispersão e competição, sendo assim fundamentais nos estudos de ecologia e biologia evolutiva. Na década de 1960, MacArthur e Wilson (1967) sugeriram o modelo denominado “Teoria da Biogeografia de Ilhas”. Este modelo propõe explicar os padrões de distribuição biogeográfica das espécies, constituindo a relação nas alterações da abundância e riqueza de

espécies em relação ao tamanho da área amostrada, assim como ao seu grau de isolamento (PRESTON, 1962). Portanto, diferentes padrões são propostos para entender esta relação (MACARTHUR; WILSON, 1967):

- Padrão espécie-área - ilhas maiores comportam populações também maiores e devido a isso apresentam uma menor taxa de extinção, o contrário também pode ocorrer, em que ilhas menores comportam populações menores, apresentando assim uma maior taxa de extinção;
- Padrão espécie-isolamento - ilhas mais isoladas apresentam uma menor taxa de imigração, enquanto que ilhas mais próximas do continente ou de outras ilhas a probabilidade de receber imigrante é maior;
- Padrão endemismo-isolamento - ilhas mais isoladas apresentam uma maior porcentagem de endêmicos. Tal padrão pode ocorrer devido ao isolamento geográfico que pode promover o baixo fluxo gênico entre as populações das ilhas e de outros ambientes.

Os processos ecológicos de imigração e extinção são apontados como chave para compreender a diversidade de espécies em ilhas. As taxas de imigração em uma ilha estão intimamente relacionadas ao grau de isolamento da mesma, sendo que quanto mais isolada, menor a taxa de imigração. No entanto, relacionada às taxas de extinção está o tamanho da ilha, na qual quanto menor a área, maior a taxa de extinção (MACARTHUR; WILSON, 1967).

Do mesmo modo, outro processo ecológico importante são as colonizações, estando relacionadas com o comportamento de migração ou dispersão dos organismos (OLIVIERI, 2009). Um organismo colonizador carrega consigo apenas uma pequena fração da variabilidade genética total da população original, com isso, a variabilidade genética de uma população insular recém-formada será menor do que a população original (MAYR, 1942). Assim como com populações que posteriormente se tornam isoladas em decorrência de um gargalo genético (FRANKHAM, 1997). Outro fator que pode de algum modo influenciar a baixa variabilidade genética de uma população que se formou recentemente é o pequeno tamanho populacional que estas possuem (FRANKHAM, 1997). De fato, populações restritas a ilhas possuem maior probabilidade de extinção devido a algum efeito de deriva genética (WRIGHT, 1931).

O estudo genético envolvendo populações de abelhas presentes em ambientes insulares são importantes para o conhecimento dos fatores envolvidos na diversidade e estrutura genética. Até o presente momento, alguns estudos buscaram investigar a estrutura e

diversidade genética de espécies de abelhas que ocorrem em ambientes insulares (ROCHA-FILHO et al., 2013; BOFF et al., 2014; GIANGARELLI et al., 2015; PENHA et al., 2015; FRANCISCO et al., 2016; SORO et al., 2017).

1.4 MARCADORES MOLECULARES

Marcadores moleculares têm sido ferramentas importantes para análises envolvendo diferentes grupos de abelhas. São considerados todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA, que segue padrões mendelianos de herança (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). Considerando os estudos populacionais, podemos destacar o uso de marcadores microssatélites e mitocondriais que apresentam resultados satisfatórios nos estudos envolvendo abelhas (SUZUKI et al., 2010; CERÂNTOLA et al., 2011; LÓPEZ-URIBE et al., 2011; FREIRIA et al., 2012; GIANGARELLI et al., 2015; PENHA et al., 2015; FRANCISCO et al., 2016; FRANTINE-SILVA et al., 2017).

1.4.1 Marcadores Microssatélites

Os microssatélites ou *simple sequence repeats* (SSR) são pequenas sequências de DNA de 1 a 6 bases repetidas em *tandem* (FRANKHAM et al., 2010), estão presentes em regiões codificadoras e não-codificadoras do DNA e geralmente são caracterizados por um alto grau de polimorfismos, resultando assim em uma grande quantidade de alelos por loco, diminuindo as chances de indivíduos não relacionados compartilharem alelos (WEBSTER; REICHART, 2005). Os polimorfismos observados em locos microssatélites podem resultar em ganho ou perda de repetições durante o processo de replicação do DNA ou de pareamentos incorretos de cromossomos homólogos. Dentre estes, os erros que ocorrem devido aos deslizamentos da enzima DNA Polimerase durante a replicação do DNA, possivelmente, constituem o principal mecanismo na origem de novos alelos. Por outro lado, pareamentos errôneos e crossing-overs desiguais, parecem ter um papel mais importante no surgimento de polimorfismos em microssatélites com repetições maiores que 10 pares de bases (ELLEGREN, 2004).

Devido ao seu padrão de herança codominante, os marcadores microssatélites possibilitam análises mais robustas, flexíveis e informativas (SUNNUCKS, 2000), sendo bastante utilizados em trabalhos de diferenciação genética realizados em populações de abelhas (ARIAS et al., 2006; CERÂNTOLA et al., 2011; ZIMMERMANN et al., 2011;

FREIRIA et al., 2012; ROCHA-FILHO et al., 2013; PENHA et al., 2015). Desta forma, diversos *primers* de microssatélites foram desenvolvidos para diferentes grupos de abelhas, sendo considerados marcadores espécies-específicos (SOUZA et al., 2007; BRITO et al., 2009; PAXTON et al., 2009; LÓPEZ-URIBE et al., 2011; PENHA et al., 2015). Entretanto, algumas espécies que são relacionadas mantêm conservação de sítios de microssatélite e, com isso, *primers* heterólogos que foram desenvolvidos para uma espécie podem ser empregados no estudo das demais espécies do gênero ou em gêneros da mesma família, o que é conhecido como transferabilidade ou amplificação de espécie cruzada (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; CHISTIYAKOV et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006).

Os marcadores microssatélites são considerados importantes em estudos de diversidade e estrutura genética entre populações da subtribo Euglossina, sendo que a estruturação pode estar relacionada ao tamanho das áreas (ZIMMERMANN et al., 2011) e as distâncias entre os fragmentos (SOFIA et al., 2005; CERÂNTOLA et al., 2011; FREIRIA et al., 2012; ROCHA-FILHO et al., 2013). Além disso, estes marcadores, quando combinados com dados mitocondriais, também são importantes considerando-se estudos de investigação sobre dispersão sexo-assimétrica, trazendo informações a respeito da dinâmica de dispersão e colonização, assim como em relação à capacidade de voo e tamanho populacional (LÓPEZ-URIBE, 2006; CERÂNTOLA, 2009). Em relação a estes fatos, fica evidente a grande eficiência destes marcadores em estudos de populações de abelhas.

1.4.2 Marcadores Mitocondriais

O DNA mitocondrial é uma ferramenta importante para estudos genéticos de populações, por possuir características como herança uniparental (materna), padrão haploide, tamanho reduzido e ausência de recombinação genética (AVISE et al., 1987; AVISE, 2009), fornecendo informações adicionais aos dados do genoma nuclear. Outra característica importante desta molécula é possuir uma estrutura genética simples, com ausência de sequências repetitivas, pseudogenes e *íntrons*, possuindo um conteúdo gênico bastante conservado (MORITZ et al., 1987). Sua organização inclui 37 genes, dos quais, 22 são genes que formam RNA transportadores (RNAt), dois genes formam as subunidades ribossômicas (12S e 16S), três formam as subunidades de enzima citocromo oxidase (*COI*, *COII* e *COIII*), um forma o citocromo B, dois formam as subunidades da enzima ATPase (subunidades 6 e 8) e sete formam as subunidades da enzima NADH desidrogenase (Figura 2). Possui também

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo investigar a diversidade genética e estrutura de populações de *E. stellfeldi* amostradas em doze remanescentes de Mata Atlântica, seis áreas continentais e seis ilhas, localizados ao longo das regiões sul e sudeste, utilizando marcadores mitocondriais e nucleares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a estrutura e diversidade genética entre ilhas e áreas continentais.
- Obter informações que contribuam para o melhor entendimento da biologia da espécie e manejo adequado de suas populações que ocorrem em regiões de Mata Atlântica do continente e ilhas.
- Testar as seguintes hipóteses de trabalho:
 - I. A dispersão na espécie *E. stellfeldi* é sexo assimétrica, os machos atuam como dispersores e as fêmeas no processo de colonização de áreas.
 - II. A diversidade genética que ocorre em áreas continentais e insulares é diferente, com as ilhas apresentando uma menor variabilidade.

3 MANUSCRITO

Diversidade genética e estrutura de populações de *Euglossa stellfeldi* (Apidae, Euglossina) de remanescentes de Floresta Ombrófila Densa do bioma Mata Atlântica

Trabalho a ser submetido ao periódico Apidologie

Diversidade genética e estrutura de populações de *Euglossa stellfeldi* (Apidae, Euglossina) de remanescentes de Floresta Ombrófila Densa do bioma Mata Atlântica

RESUMO

Euglossa stellfeldi Moure, 1947 é uma espécie de abelha das orquídeas (Apidae, Euglossina), endêmica da Mata Atlântica (MA), apresentando uma distribuição que abrange áreas de Floresta Ombrófila Densa do sul (Santa Catarina) ao nordeste do Brasil (Alagoas). Como observado para outras espécies de Euglossina, populações de *E. stellfeldi* apresentam variações na coloração do integumento ao longo de sua distribuição, variando de azul-esverdeado ou azulado na região sul e coloração verde em direção à distribuição norte da espécie. Enquanto não se sabe exatamente as causas relacionadas a este padrão de variação, estudos genéticos com populações de uma outra espécie, com padrões similares de distribuição geográfica e variação de coloração de integumento, revelaram importante estrutura genética entre as populações da espécie estudada. Outro aspecto relevante diz respeito ao fato de pouco se saber sobre a estrutura genética de populações de *E. stellfeldi* de ambientes insulares em relação às de áreas continentais. Assim, este estudo teve como objetivo investigar a diversidade genética e estrutura de populações de *E. stellfeldi* amostradas em remanescentes de MA ocupando áreas continentais e ilhas, localizados ao longo das regiões sul e sudeste. As análises genéticas envolveram populações de 12 localidades, incluindo seis ilhas, como segue: na região sul (JO: Joinville/SC, SF: São Francisco do Sul/SC, IS: Ilha do Superagui-Guaraqueçaba/PR, SM: Salto Morato-Guaraqueçaba/PR) e na região sudeste (IC: Ilha do Cardoso-Cananeia/SP, CA: Cananeia/SP, BE: Bertioga/SP, SS: São Sebastião/SP, IB: Ilhabela/SP, BU: Ilha dos Búzios-Ilhabela/SP, IA: Ilha Anchieta-Ubatuba/SP, UB: Picinguaba-Ubatuba/SP). Nas análises foram empregados marcadores nucleares (microssatélites) e mitocondriais (*citb* e *COI*). Para as análises de microssatélites foram amplificados 11 locos e genotipados 307 machos, foram identificados 139 alelos nas diferentes amostras. Para todos os estimadores de diversidade genética, a população de BU, a menor ilha dentre todas analisadas, foi a que apresentou os menores valores. O estimador Φ_{ST} (0,10) global indicou uma diferenciação genética significativa ($p < 0,05$) entre as populações analisadas. As comparações par a par, baseadas nos estimadores (Φ_{ST} e D_{est}), indicaram diferenciação genética significativa ($p < 0,05$) em 47 dos 55 pares de amostras analisadas. Nas análises mitocondriais foram utilizados 106 machos e analisada uma sequência concatenada de 1132 pb, sendo 460 pb do gene *citb* e 672 do gene *COI*, que resultaram em oito haplótipos identificados. Os marcadores mitocondriais revelaram níveis mais altos de estruturação genética do que os obtidos com os nucleares. Apenas para os marcadores mitocondriais foi encontrada correlação positiva significativa ($R^2=0,5268$; $p=0,010$) entre as distâncias genética ($mt-\Phi_{ST}$) e geográfica (km). Apesar da baixa variação na sequência mitocondrial analisada, os resultados sugerem uma possível quebra filogeográfica entre dois conjuntos de populações, um destes reunindo cinco populações acima de BE, que compartilharam de forma exclusiva o haplótipo 6 e, outro formado por seis populações mais ao sul de BE, compartilhando exclusivamente o haplótipo 1. A população de BE apresentou ambos os haplótipos e se mostrou como uma possível área de hibridização. Como já sugerido para outras espécies da subtribo, também em *E. stellfeldi* os machos se mostram como o provável sexo dispersor.

Palavras chave: Abelhas das Orquídeas; Diferenciação Genética; Locos Microssatélites; DNAMt; *citb*; *COI*.

3.1 INTRODUÇÃO

Euglossa stellfeldi é uma espécie de Euglossina endêmica à Mata Atlântica (MA), com ocorrência associada à Floresta Ombrófila Densa, um tipo de formação vegetal que se estende ao longo da costa brasileira, mas que se mostra, assim como o restante da MA, bastante fragmentada em decorrência da ação antrópica (Metzger, 2009).

A distribuição geográfica de *E. stellfeldi* neste bioma abrange áreas do litoral brasileiro, desde o estado de Santa Catarina, no sul do Brasil, até o município de Maceió no estado de Alagoas, na região do litoral nordeste (Faria Jr e Melo, 2007; Ferrari e Melo, 2014). Há também vários registros na literatura de populações de *E. stellfeldi* presentes em ilhas continentais (Cordeiro *et al.*, 2013; Rocha-Filho e Garófalo, 2013) e artificial (Giangarelli, 2015).

Assim como já descrito para outras espécies de Euglossina, grupo este popularmente conhecido como abelhas das orquídeas (DRESSLER, 1982), *E. stellfeldi* possui uma variação de coloração do integumento, apresentando coloração azul ou verde-azulada nos seus limites mais ao sul de sua distribuição geográfica, mostrando tal padrão nas populações dos estados de São Paulo (região Sudeste) e Paraná e Santa Catarina (região Sul), e coloração verde nas porções mais ao norte da distribuição da espécie, abrangendo os estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo (sudeste do Brasil), e os estados da Bahia e Alagoas (nordeste do país).

Estudos recentes envolvendo *Euglossa iopoecila* Dressler, outra espécie de Euglossina endêmica à MA, com distribuição geográfica e variação da cor do integumento bastante similares aos descritos para *E. stellfeldi*, revelaram uma importante estrutura genética entre as populações de *E. iopoecila* ao longo das áreas de distribuição da mesma (Penha *et al.*, 2015; Frantine-Silva *et al.*, 2017). Além disto, estes autores também registraram uma importante quebra filogeográfica entre os conjuntos de populações das porções mais ao norte e mais ao sul de ocorrência da espécie. Ainda, ao analisar populações de ilhas e áreas continentais de *E. iopoecila*, Penha *et al.* (2015) e Frantine-Silva *et al.* (2017) não encontraram qualquer indicativo de perda de diversidade genética ou efeitos evidentes do isolamento das ilhas na estruturação genética das populações estudadas.

De forma distinta, um estudo genético realizado com *E. stellfeldi* mostrou uma estruturação genética significativa quando comparados as populações de uma ilha e uma área no continente (Rocha-Filho *et al.*, 2013). Para este fato, os autores sugerem que a capacidade de dispersão desta espécie pode ser diferente do que outras espécies de Euglossina. Assim, apesar de serem abelhas reconhecidamente dotadas de grande capacidade de voo (Janzen,

1971; Pokorny *et al.*, 2015), com algumas espécies sendo capazes, inclusive, de transpor grandes corpos d'água (Dressler, 1982; Wikelski *et al.*, 2010), os resultados obtidos por Rocha-Filho *et al.* (2013) com populações de *E. stellfeldi* podem, de fato, estar indicando uma possível limitação desta espécie de transpor grandes distâncias separando ilhas do continente.

Estudos com outras espécies da subtribo, a exemplo de *E. cordata* (Rocha-Filho *et al.*, 2013; Boff *et al.*, 2014), *Eulaema cingulata* (Rocha-Filho *et al.*, 2013) e *E. iopoecila* (Penha *et al.*, 2015), avaliando a estrutura genética entre populações de ilhas e continente têm mostrado que tais espécies, aparentemente, estariam sendo capazes de manter o fluxo gênico entre tais ambientes, indicando que porções d'água não estariam constituindo barreiras, pelo menos, ao deslocamento destas espécies de Euglossina. Contudo, as informações disponíveis na literatura ainda estão restritas a poucos estudos e espécies deste e de outros grupos de Apidae (Francisco *et al.*, 2016).

Outro aspecto relevante envolvendo o estudo genético de populações de abelhas das orquídeas relaciona-se ao fato de que fêmeas parecem mostrar um padrão de dispersão distinto dos machos, pois estas usualmente tendem a permanecer nos seus ninhos de origem após a emergência ou então, fundar novos ninhos nas proximidades do ninho de origem (Augusto e Garófalo, 2004; Cerântola *et al.*, 2011; Rocha-Filho *et al.*, 2013). De modo distinto, os machos deixam seus ninhos de origem após emergência, não mais voltando a estes (Dodson *et al.*, 1969). Com base nestes dois tipos de comportamentos e resultados obtidos em análises genéticas de populações de diferentes espécies, alguns autores têm sugerido que em Euglossina há um viés no modo de dispersão sexo-assimétrica, sendo os machos considerados o sexo dispersor (Cerântola *et al.*, 2011; López-Uribe *et al.*, 2014).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos investigar: i) a diversidade genética e a estrutura de populações de *E. stellfeldi* coletadas ao longo do Corredor de Biodiversidade da Serra do Mar, uma das maiores áreas de MA ainda com um bom status de conservação (Pinto *et al.*, 2006), além de algumas populações coletadas em áreas localizadas no limite sul de ocorrência da espécie; ii) comparar a estrutura e diversidade genética entre populações de ilhas e continente; iii) obter informações que corroborem ou não a hipótese de dispersão sexo-assimétrica em abelhas Euglossina. Para responder esta última questão envolvendo machos como sexo dispersor e comportamento filopátrico de fêmeas, foram utilizados marcadores mitocondriais e microssatélites. Neste caso, espera-se encontrar uma maior diferenciação genética nas análises obtidas com marcadores mitocondriais, do que com os nucleares.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Área de Estudo e Amostragem

As coletas de machos de *E. stellfeldi* foram realizadas em doze localidades de Mata Atlântica (Tabela 1) (Apêndice A-1) correspondendo a uma parte da zona de distribuição desta espécie (Faria Jr e Melo, 2007): regiões sul (JO: Joinville/SC, SF: São Francisco do Sul/SC, IS: Superagui-Guaraqueçaba/PR, SM: Salto Morato-Guaraqueçaba/PR) e sudeste (IC: Ilha do Cardoso-Cananeia/SP, CA: Cananeia/SP, BE: Bertioga/SP, SS: São Sebastião/SP, IB: Ilhabela/SP, BU: Ilha dos Búzios-Ilhabela/SP, IA: Ilha Anchieta-Ubatuba/SP, UB: Picinguaba-Ubatuba/SP). A seguir é apresentada uma breve descrição das áreas onde as amostras foram obtidas:

Tabela 1. Lista com os doze pontos amostrados para coleta de *Euglossa stellfeldi* nas regiões de Mata Atlântica, entre os estados de Santa Catarina e São Paulo. N = número de indivíduos coletados.

| Sigla | N | Nome | Município | Estado | Coordenadas geográficas |
|--------------|------------|---|----------------------|--------|-------------------------------|
| JO | 20 | Joinville - Área de Proteção Ambiental Serra Dona Francisca | Joinville | SC | 26°12'45.04"S - 49°2'36.89"O |
| SF | 10 | São Francisco do Sul - Vila da Glória | São Francisco do Sul | SC | 26°15'22.44"S - 48°38'1.94"O |
| IS* | 29 | Ilha do Superagui - Parque Nacional do Superagui | Guaraqueçaba | PR | 25°19'53.00"S - 48°09'21.00"O |
| SM | 14 | Salto Morato - Reserva Natural Salto Morato | Guaraqueçaba | PR | 25°10'54.00"S - 48°17'52.00"O |
| IC* | 15 | Ilha do Cardoso - Parque Estadual Ilha do Cardoso | Cananeia | SP | 25°8'33.29"S - 47°57'48.86"O |
| CA* | 16 | Cananeia | Cananeia | SP | 24°59'58.98"S - 47°54'58.24"O |
| BE | 15 | Bertioga - Parque Estadual Restinga de Bertioga | Bertioga | SP | 23°47'20.05"S - 46°3'30.40"O |
| SS | 16 | São Sebastião - Parque Estadual da Serra do Mar | São Sebastião | SP | 23°43'17.82"S - 45°39'55.46"O |
| IB* | 24 | Ilhabela - Parque Estadual de Ilhabela | Ilhabela | SP | 23°51'7.00"S - 45°20'38.00"O |
| BU* | 19 | Ilha dos Búzios | Ilhabela | SP | 23°47'23°49"S - 45°06'45°09"O |
| IA* | 29 | Ilha Anchieta - Parque Estadual da Ilha Anchieta | Ubatuba | SP | 23°33'5.72"S - 45°4'0.11"O |
| UB | 7 | Picinguaba - Parque Estadual da Serra do Mar | Ubatuba | SP | 23°22'16.00"S - 45°0'10.00"O |
| Total | 214 | | | | |

* Ambientes insulares.

Áreas continentais:

1. JOINVILLE (JO - Apêndice A-2): localizado na Área de Proteção Ambiental (APA) Serra Dona Francisca, na porção oeste de Santa Catarina. Apresenta mais de 400 km² e ocupa 35% da extensão territorial do município de Joinville, englobando a região das encostas da Serra do Mar e Planalto Ocidental. As coletas foram realizadas em uma região de difícil acesso, sendo considerada uma área bastante acidentada, deste modo apresenta vegetação com pouca ou nenhuma intervenção humana (Dec, 2015).

2. SÃO FRANCISCO DO SUL (SF - Apêndice A-2): município localizado no vilarejo Vila da Glória, região nordeste de Santa Catarina, litoral atlântico. É formado principalmente por pescadores, cercado por uma extensa área, de aproximadamente 216 mil m², de Mata Atlântica abrigando morros e cachoeiras, com uma vegetação em diferentes níveis de regeneração em razão da exploração da madeira que ocorreu até a década de 80. As coletas ocorreram na borda da vegetação que se encontra em estágio médio de regeneração, em uma propriedade privada na área rural da Estrada do Saí, na face oeste do Morro do Cantagalo (Dec, 2015).

3. SALTO MORATO (SM - Apêndice A-2): é uma Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN), localizada no município de Guaraqueçaba, litoral norte do estado do Paraná. Apresenta cerca de 23,40 km² e está inserida no maior remanescente contínuo de Mata Atlântica do Brasil, no Corredor de Biodiversidade da Serra do Mar, sendo reconhecida como Patrimônio Natural da Humanidade pela Unesco (Penha, 2013).

4. BERTIOGA (BE - Apêndice A-3): o município de Bertiooga está localizado no litoral norte do estado de São Paulo, com cerca de 490 km² de extensão territorial e 33 km de praias. As coletas foram realizadas no Parque Estadual Restinga de Bertiooga, que está totalmente inserida no município de Bertiooga, com uma extensão de 93,12 km². Apresenta vegetações de mangues, restingas e Floresta Ombrófila Densa. O parque forma um “corredor ecológico” ligando áreas do litoral à Serra do Mar (Travalini e da Cunha, 2016).

5. SÃO SEBASTIÃO (SS - Apêndice A-3): o núcleo São Sebastião está localizado no Parque Estadual da Serra do Mar, no município de São Sebastião, litoral norte de São Paulo. Possui uma extensão de 262,68 km², apresentando uma grande área de vegetação de Mata Atlântica (Francisco, 2012).

6. PICINGUABA (UB - Apêndice A-3): o núcleo Picinguaba está localizado no município de Ubatuba, no litoral norte do estado de São Paulo, no Parque Estadual da Serra do Mar. Possui uma área de 470 km², fazendo parte do corredor de Mata Atlântica,

apresentando diferentes ecossistemas, como manguezal, mata de restinga, ambiente marinho costeiro, campo de altitude e Floresta Ombrófila Densa de encosta (Rocha-Filho, 2011).

Áreas insulares:

1. ILHA DO SUPERAGUI (IS - Apêndice A-2): a ilha está localizada no município de Guaraqueçaba, no litoral norte do estado do Paraná. Pertence ao Parque Nacional do Superagui e possui uma área com mais de 330 km². Estando a aproximadamente 1 km da Ilha das Peças e 7,8 km da Ilha do Mel, a distância mais próxima do continente é de 15 km do balneário Pontal do Sul, no município de Pontal do Paraná. Situado no domínio de Mata Atlântica, apresenta formações de Floresta Ombrófila Densa, além de vegetações de praias, duna, restinga e manguezais (Giangarelli, 2015).

2. ILHA DO CARDOSO (IC - Apêndice A-2): a ilha está localizada no município de Cananeia no extremo sul do litoral do estado de São Paulo. Pertence ao Parque Estadual da Ilha do Cardoso sendo composto por uma grande área de floresta primária preservada. Apresenta uma grande diversidade de aspectos de vegetação da Mata Atlântica, desde manguezais e restingas à Floresta Ombrófila Densa. Possui uma área de 225 km² e sua distância mínima do continente é de 80 m, podendo chegar a 2 km em algumas regiões. (Francisco, 2012).

3. CANANEIA (CA - Apêndice A-2): o município de Cananeia está situado no extremo sul do litoral de São Paulo, no centro de um corredor biológico de 110 km que se estende desde a foz do Rio Ribeira em Iguape (SP) até a baía de Paranaguá (PR). Possui uma área de 1.242 km², sendo considerado um dos últimos remanescentes de Mata Atlântica intocada na costa brasileira, sendo considerada pela UNESCO como Patrimônio Natural da Humanidade. Apresenta também mangues, dunas e restingas (Bondioli *et al.*, 2005).

4. ILHABELA (IB - Apêndice A-3): a ilha está localizada no município de Ilhabela, no litoral norte do estado de São Paulo. Pertence ao parque-arquipélago Parque Estadual de Ilhabela que é composto por um total de 12 ilhas, com uma área de 347,5 km². A sua distância mínima do continente é de aproximadamente 2 km, com o distrito São Francisco da Praia, no município de São Sebastião. A região apresenta grande área de Mata Atlântica preservada pela presença de Unidades de Conservação (Cordeiro, 2009; Penha, 2013).

5. ILHA ANCHIETA (IA - Apêndice A-3): a ilha está localizada no município de Ubatuba, no litoral norte do estado de São Paulo. Pertence ao Parque Estadual da Ilha Anchieta, possuindo uma área de 8,28 km² e está a aproximadamente 600 m do continente, em “Ponta da Espia”, ponto mais próximo do continente com a ilha, localizado na região de

Ubatuba (Rocha-Filho *et al.*, 2013). Apresenta 17 km de costões rochosos e sete praias, possuindo vegetação de Mata Atlântica, como Floresta Ombrófila Densa, além de restinga e vegetação de costões rochosos (Rocha-Filho, 2011).

6. ILHA DOS BÚZIOS (BU - Apêndice A-3): a ilha está localizada no município de Ilhabela, no litoral norte do estado de São Paulo. Pertence ao Parque Estadual de Ilhabela, apresentando uma área de 7,55 km², estando a aproximadamente 24 km do continente e 15 km da porção leste de Ilhabela. A ilha é habitada por uma comunidade de caiçaras tradicionais que além de utilizar da cultura de mandioca e banana, também vivem da pesca. Devido a isto é comum observar as margens do arquipélago redes de espera e armadilhas de pesca. Uma característica interessante desta ilha é não possuir praias, sendo seus entornos formados por costões rochosos (Francisco, 2012).

As coletas foram realizadas ao longo de 515,90 km de Mata Atlântica, sendo esta a maior distância entre os pontos de Joinville (JO) e de Picinguaba (UB), e a menor distância entre os pontos de Cananeia (CA) e Ilha do Cardoso (IC) com 15,09 km (Tabela 2).

Tabela 2. Distância geográfica (km) entre os pontos em que as populações de *Euglossa stellfeldi* foram amostradas.

| Pontos | Distância Geográfica (km) | | | | | | | | | | | |
|--------|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|----|
| | JO | SF | IS | SM | IC | CA | BE | SS | IB | BU | IA | UB |
| JO | -- | | | | | | | | | | | |
| SF | 40,92 | -- | | | | | | | | | | |
| IS | 132,50 | 114,09 | -- | | | | | | | | | |
| SM | 136,37 | 124,39 | 21,82 | -- | | | | | | | | |
| IC | 160,90 | 141,58 | 29,17 | 33,76 | -- | | | | | | | |
| CA | 174,46 | 154,54 | 41,48 | 40,92 | 15,09 | -- | | | | | | |
| BE | 394,57 | 368,38 | 262,55 | 264,22 | 233,43 | 223,60 | -- | | | | | |
| SS | 444,18 | 411,32 | 309,28 | 313,46 | 281,01 | 270,60 | 49,73 | -- | | | | |
| IB | 455,82 | 426,11 | 329,16 | 334,14 | 301,48 | 292,46 | 80,13 | 35,80 | -- | | | |
| BU | 476,99 | 446,58 | 350,37 | 355,50 | 324,11 | 314,49 | 101,97 | 55,22 | 22,49 | -- | | |
| IA | 498,91 | 468,49 | 370,35 | 374,62 | 341,94 | 332,84 | 113,38 | 64,22 | 43,92 | 28,61 | -- | |
| UB | 515,90 | 487,74 | 387,30 | 392,23 | 358,98 | 349,50 | 126,98 | 77,97 | 64,08 | 49,64 | 21,20 | -- |

JO = Joinville; SF = São Francisco do Sul; IS = Ilha do Superagui; SM = Salto Morato; IC = Ilha do Cardoso; CA = Cananeia; BE = Bertioga; SS = São Sebastião; IB = Ilhabela; BU = Ilha dos Búzios; IA = Ilha Anchieta; UB = Picinguaba.

Amostras de 214 machos (Tabela 1) de *Euglossa stellfeldi*, distribuídas ao longo dos doze pontos amostrados, foram obtidas utilizando o método de captura ativa com rede entomológica e com armadilhas do tipo pet (Mattozo *et al.*, 2011). Os machos foram atraídos à iscas odores contendo uma das seguintes essências: eugenol, eucaliptol, vanilina, beta-ionona, salicilato de metila, cinamato de metila, benzoato de benzila e acetato de benzila, de

acordo com (Giangarelli e Sofia, 2011). Algumas amostras já haviam sido coletadas e estavam mantidas em microtubos contendo álcool e acondicionadas em *freezer* (-20°C) no Laboratório de Genética e Ecologia Animal da UEL (*2009-2014 - IS, SM, IC, SS, IB e UB). O restante das amostras foi cedido pelos seguintes pesquisadores: Ms. Enderlei Dec e Dra. Isabel Alves-dos-Santos (*2013/2014 - JO e SF), Dr. Guaraci Duran Cordeiro (*2009 - IB, CA, BE e BU), Dr. Léo Correia da Rocha-Filho e Dr Marco Antonio Del Lama (*2007 a 2009 - IA). Todas as amostras cedidas foram da terceira perna direita de cada indivíduo, estavam mantidas em microtubos contendo álcool e acondicionadas em *freezer* (-20°C). *Data da coleta.

3.2.2 Extração e Quantificação do DNA

A extração do DNA total foi realizada a partir de amostras da musculatura torácica ou da terceira perna direita de cada indivíduo que foram lavadas em álcool 70% para a remoção de eventuais contaminantes. O método de extração seguiu os protocolos de Freiria *et al.* (2012) e Penha *et al.* (2015), brevemente descritos a seguir: as amostras foram colocadas em microtubos contendo 300 µL de tampão de extração (Tris-HCL 500mM, EDTA 20mM, NaCl 10 mM pH8,0 e 1% SDS) e 5 µL de proteinase K (20 µg/µL), sendo posteriormente dilaceradas com o auxílio de uma pequena tesoura e mantidas em banho seco a 55°C por duas horas. Posteriormente, foram realizadas três lavagens sucessivas em: fenol; fenol/clorofórmio/álcool isoamílico; e, clorofórmio/álcool isoamílico.

O produto da extração foi ressuspendido em 50 µL de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e armazenado a -20°C. A concentração do DNA foi determinada a partir de espectrofotometria utilizando o quantificador NanoDrop 2000c UV-Vis (Thermo Science) e, posteriormente, diluídas em água ultrapura na concentração de 5ng/µL.

3.2.3 Análises Moleculares

3.2.3.1 Marcadores *Microsatélites*

Nas análises de *microsatélites* foram consideradas as amostras de apenas 11 das 12 localidades, excluindo-se neste caso as amostras de Ubatuba, onde foram coletados apenas sete (7) machos. Este procedimento foi adotado para tentar evitar um viés indesejado nos resultados. No total foram avaliados 207 machos, com um N variando de 10 a 29 por área de estudo.

Para as ampliações dos locos microssatélites foram selecionados 11 pares de *primers* polimórficos para *E. stellfeldi* (ann2, ann3, ann6, ann8, ann24, ann37, ann41, iop1, iop3, Egc 26 e Egc 51) descritos para outras espécies de *Euglossa* (Souza *et al.*, 2007; Paxton *et al.*, 2009; Penha *et al.*, 2015). Embora o *primer* iop2 tenha sido utilizado nas reações, não foi incluído nos dados por se mostrar monomórfico.

Nas reações de amplificação foi utilizado o protocolo de Penha *et al.* (2015), com pequenas modificações. As ampliações foram realizadas em volume final de 10µL contendo 1X GoTaq Green Master Mix (Promega), 10ng da amostra de DNA a 5ng/µL, 1% de glicerol, 0,125µM de *primer* M13 marcado com fluorescência (Schuelke, 2000) (FAM, HEX, NED ou PET, Applied Biosystems, CA), 0,125µM de *primer Reverse*, 0,0125µM de *primer Forward* e água ultrapura para completar o volume final. A reação foi conduzida em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.) com desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 10 ciclos que por sua vez consistem em três etapas: desnaturação a 94°C por 30s, anelamento definido para cada *primer* (Apêndice A-4) por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, seguida por mais 25 ciclos de três etapas: 89°C por 30s, anelamento por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, seguida por uma extensão final a 72°C por 30 min. Posteriormente, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático ABI-PRISM 3500 xL (Applied Biosystems).

3.2.3.2 Marcadores Mitocondriais

Para as análises do DNA mitocondrial foram sequenciados os genes *citocromo b* (*citb* – 461pb), *primers* CB-N-11367 (Crozier *et al.*, 1991; Simon *et al.*, 1994; Arias *et al.*, 2008): 5'-ATT ACA CCT CCT AAT TTA TTA GGA AT-3' e CB-J-10933 (Crozier *et al.*, 1991; Arias *et al.*, 2008): 5'-TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC-3' e *citocromo c oxidase subunidade 1* (*COI* – 671pb), *primers* LepF1: 5'-ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA T-3' e LepR1: 5'-TAA ACT TCT GGA TGT CCA AAA A-3' (Hebert *et al.*, 2004). Nas reações de amplificação foi utilizado o protocolo de Frantine-Silva *et al.* (2017), com pequenas modificações. As ampliações dos genes *citb* e *COI* foram realizadas em volume final de 15µL contendo 10ng DNA, 1x de tampão, 0,2mM de dNTPs, 3mM de MgCl₂, 0,5µM de cada *primer*, 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e água ultrapura para completar o volume. A reação foi conduzida em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.) com desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguidas de 35 ciclos que por sua vez consistem em

três etapas: desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 50°C - *citb*; 54°C - *COI* por 30s e extensão a 72°C por 1 min, seguida por uma extensão final a 72°C por 10 min.

Para checagem da amplificação, os segmentos de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio e visualizados em transluminador de luz UV. Um marcador de 100pb (Invitrogen) foi aplicado ao gel para a estimativa do peso molecular dos produtos amplificados.

3.2.4 Purificação e Sequenciamento

Após a amplificação das regiões *citb* e *COI*, foi realizada a purificação das amostras seguindo protocolo de Frantine-Silva *et al.* (2017), utilizando o reagente Illustra Exo Pro-Star (GE Helthcare Bio-Sciences Ltda), visando a eliminação de possíveis interferentes. Para a reação de sequenciamento foi utilizado o Kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) seguindo protocolo de Frantine-Silva *et al.* (2017). O produto da reação foi purificado e precipitado, sendo posteriormente sequenciados em sequenciador automático ABI-PRISM 3500 xL (Applied Biosystems).

3.2.5 Análises dos Dados

3.2.5.1 Marcadores Microsatélites

Para a análise e visualização dos dados de genotipagem obtidos por meio do sequenciador automático foi utilizado o *software* GeneMarker V2.2.0 (*SoftGenetics, State College, PA*). Para a checagem de possíveis erros de leitura foi utilizado o *software* Micro-Checker (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

O *software* GenAlEx 6.5 (Peakall e Smouse, 2012) foi utilizado para estimar medidas descritivas e de diversidade genética, tais como: número médio de alelos por loco (N_A), número de alelos efetivos (N_E), número de alelos privados (N_P) e a heterozigosidade média esperada (H_E). O *software* FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001) foi utilizado para calcular as medidas de riqueza alélica (R_A).

A estatística F (Wright, 1951), utilizada para a análise da estrutura genética das populações, foi obtida pelo *software* GenAlEx 6.5, o qual, por meio da análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), estima os valores de Φ_{ST} (um análogo ao F_{ST}). Esta análise gerou estimativas da variância genética dentro e entre populações, o índice de Φ_{ST} global e entre pares de populações, utilizado como estimativa da diferenciação genética

entre estas (Excoffier e Lischer, 2010). A significância de Φ_{ST} foi estimada através de 1000 aleatorizações e foram considerados valores significativos de $p < 0,05$.

O *software* GenAlEx 6.5 também foi utilizado para calcular os valores de índices de estruturação genética par-a-par para os estimadores Φ_{ST} e D_{est} de Jost (2008). O estimador D de Jost é calculado com base no número de alelos efetivos, medindo a fração de variação alélica entre as populações (Jost, 2008; Ryman e Leimar, 2009). De acordo com Jost (2008), o índice D mede os desvios da diferenciação total, indicando a proporção de diversidade alélica presente entre as populações. Entretanto, no caso do índice F_{ST} é medido os desvios da panmixia, sendo proporcional ao desvio das frequências alélicas entre as populações (Whitlock, 2011). Sendo assim, o estimador D_{est} fornece níveis de diferenciação mais compatíveis com a realidade pois pode contornar o problema de não detecção de diferenciação genética (Jost, 2008; Heller e Siegismund, 2009).

O *software* Structure versão 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000) foi utilizado para obter a estruturação populacional dos grupos amostrados, sendo estimado o número de *clusters* (K) mais prováveis via análise Bayesiana. Foram testadas as possibilidades da existência de uma a 10 populações e a análise de cada K foi repetida 20 vezes, com 10.000 interações no “*burn-in*” e 100.000 interações na Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC). Os aplicativos *online* STRUCTURE HARVESTER 0.6.93 (Earl e Vonholdt, 2012) e CLUMPAK (<http://clumpak.tau.ac.il/>) (Kopelman *et al.*, 2015) foram utilizados para inferir estatisticamente qual o K mais provável e para agrupar os resultados do Structure via método de ΔK de Evanno (Evanno *et al.*, 2005).

O teste de Mantel (1000 permutações) foi utilizado para estimar a existência de possíveis correlações entre distância geográfica (km) e os valores de distância genética (Φ_{ST} e D_{est}). Para esta análise foi utilizado o *software* GenAlEx 6.5. Foram considerados valores significativos de $p < 0,05$.

3.2.5.2 Marcadores Mitocondriais

Para a visualização, checagem e edição manual das sequências que foram obtidas dos gene mitocondriais *citb* e *COI*, foi utilizado o *software* MEGA 6.05 (Tamura *et al.*, 2013), sendo estas sequências alinhadas via algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). O *software* BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999) foi utilizado para a produção de uma matriz com as sequências concatenadas dos genes *citb* e *COI*. As sequências obtidas foram comparadas com sequências

disponibilizadas online no GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) (Altschul *et al.*, 1997).

O *software* DnaSP v. 5 (Librado e Rozas, 2009) foi utilizado para a classificação das sequências em haplótipos, assim como calcular a diversidade nucleotídica e haplotípica, frequência de diferenças entre pares de sequências (distribuição mismatch), detecção de variações demográficas com base em modelos de tamanho efetivo populacional constante via testes D de Tajima (Tajima, 1989) e F_s de Fu (Fu, 1997).

O *software* Network v. 4.6 (Polzi e Daneshmand, 2003) foi utilizado para a construção de uma rede de relações haplotípicas através do método “median-joining” (Bandelt *et al.*, 1999). Para a construção da rede de haplótipos, além das sequências obtidas neste trabalho, foram inseridas 6 sequências de amostras de *E. stellfeldi* que estão disponíveis no GenBank para os genes *citb* e *COI*: BFs06a – Paraty/RJ (*citb* = KF443122.1, *COI* = KF443096.1); BFs07 – Camacan/BA (*citb* = KF443121.1, *COI* = KF443095.1); BFs06v – Paraty/RJ (*citb* = KF443120.1, *COI* = KF443094.1); BFs05v – Ubatuba/SP (*citb* = KF443119.1, *COI* = KF443093.1); BFs05a – Ubatuba/SP (*citb* = KF443117.1, *COI* = KF443091.1) e BFs01 – Camacan/BA (*citb* = KF443116.1, *COI* = KF443090.1). Posteriormente, os diferentes haplótipos obtidos neste trabalho serão depositados no GenBank.

O *software* Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier e Lischer, 2010) foi utilizado para calcular a análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992). Esta análise gerou estimativas da variância genética dentro e entre populações, o índice de $mt-\Phi_{ST}$ global e entre pares de populações, utilizando como estimativa a distância genética entre estas (Excoffier e Lischer, 2010). A significância de $mt-\Phi_{ST}$ foi estimada através de 1000 aleatorizações, sendo considerados valores significativos de $p < 0,05$.

O teste de Mantel (1000 permutações) foi utilizado para estimar a existência de possíveis correlações entre distância geográfica (km) e os valores de distância genética ($mt-\Phi_{ST}$). Para esta análise foi utilizado o *software* GenAlEx 6.5 (Peakall e Smouse, 2012). Foram considerados valores significativos de $p < 0,05$.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Diversidade Genética

Nas análises com os dados nucleares foram genotipados um total de 207 machos de *Euglossa stellfeldi* para os 11 locos microssatélites. As análises revelaram um total de 139 alelos (A) entre os 11 pontos analisados, variando de 36 (BU) a 74 (IA) (Tabela 3). Os

menores índices de diversidade genética ($N_A = 0,273$; $N_E = 2,114$; $R_A = 3,069$), foram obtidos em um ambiente insular (BU). As estimativas de heterozigosidade esperada (H_E) indicaram um nível moderado de diversidade alélica entre os pontos, sendo que a maior foi obtida para IB (0,694) e a menor para BU (0,397), com um heterozigosidade média total esperada de 0,689. O maior número de alelos privados (N_P) foram obtidos em IC e IB (10), sendo estes dois ambientes insulares, e os menores foram obtidos em SF (0) e CA (1), (Tabela 3).

A quantidade de alelos encontrados por loco variou de 4 (Egc 26) a 23 (iop1), sendo este o loco mais polimórfico, e o tamanho dos alelos genotipados variou de 125 a 276 pares de bases (pb) (Apêndice B-1). As frequências dos alelos de cada loco para os onze pontos analisados são apresentadas no Apêndice B-2. O loco iop1 apresentou a maior quantidade de alelos em IB (14) e a menor em BU (4), sendo que os alelos encontrados em BU também são encontrados em IB. O loco Egc 26 foi o menos polimórfico apresentando o menor número de alelos entre todas as populações, com 1 alelo presente em todas as populações e 2 alelos exclusivos de dois ambientes insulares (IC e IA) (Apêndice B-3).

Nas análises mitocondriais foram analisados 106 machos de *E. stellfeldi* para os genes *citb* e *COI*, sendo amplificada uma sequência de 460 pares de bases para o gene *citb* e de 672 pares de bases para o gene *COI*, sendo confeccionada uma matriz concatenada contendo as duas sequências, totalizando 1132 pares de bases. Para as análises mitocondriais o número de machos analisados variou de 7 a 10. Os índices de frequências nucleotídicas para cada um dos genes e a matriz de dados concatenados estão apresentados no Apêndice B-4.

Foram obtidos onze sítios polimórficos (S), os quais combinaram-se em oito diferentes haplótipos (h) distribuídos entre as doze localidades amostradas. Os maiores valores de diversidade genética foram obtidos em SM, BE, SS e IA, em que SM e BE apresentaram o maior número de haplótipos (4), seguidos por IA (3) e SS (2). A fixação haplotípica observada em JO, SF, IS, IC, CA, IB, BU e UB ocasionaram a ocorrência dos menores valores de diversidade haplotípica (H_d) e nucleotídica (π) para essas localidades (Tabela 3).

Um total de oito haplótipos mitocondriais diferentes foram obtidos entre as amostras estudadas, variando de um (JO, SF, IS, IC, CA, IB, BU, UB, RJ e BA) a quatro (SM e BE) por amostra. O haplótipo H6 foi o mais frequente, sendo encontrado em oito dos quatorze pontos, bem como o haplótipo H1 que foi encontrado em sete dos quatorze pontos. Enquanto que o haplótipo H2 foi exclusivo de BE e SM, os haplótipos H3 e H4 foram exclusivos de SM, o haplótipo H5 foi exclusivo em BE e SS e os haplótipos H7 e H8 foram exclusivos de IA (Figura 5). A distribuição dos haplótipos e seus sítios variáveis estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 3. Diversidade genética de *Euglossa stellfeldi*, obtida a partir de marcadores microssatélites e mitocondriais (DNAmT). *N* – Número de indivíduos analisados, *A* – número total de alelos, *R_A* – riqueza alélica, \bar{N}_A – número médio de alelos, \bar{N}_E – número de alelos efetivos, *N_P* – número de alelos privados, *H_E* – heterozigosidade esperada, *S* – número de sítios polimórficos, *h* – número de haplótipos, *Hd* – Diversidade haplotípica, π – Diversidade nucleotídica, *D* – Teste de neutralidade de Tajima (1989), *F_S* – Teste de neutralidade de Fu (1997). Total – Estimativas gerais para todos os pontos analisados.

| Local | Microssatélites | | | | | | | DNAmT | | | | | | |
|--------------|-----------------|----------|----------------------|-------------|-------------|----------------------|----------------------|----------|----------|----------|-----------|--------|----------|----------------------|
| | <i>N</i> | <i>A</i> | <i>R_A</i> | \bar{N}_A | \bar{N}_E | <i>N_P</i> | <i>H_E</i> | <i>N</i> | <i>S</i> | <i>h</i> | <i>Hd</i> | π | <i>D</i> | <i>F_S</i> |
| JO | 20 | 66 | 5,350 | 6,000 | 3,823 | 6 | 0,655 | 8 | 0 | 1 | 0,000 | 0,000% | 0,000 | 0,000 |
| SF | 10 | 44 | 4,000 | 4,000 | 3,129 | 0 | 0,565 | 9 | 0 | 1 | 0,000 | 0,000% | 0,000 | 0,000 |
| IS | 29 | 66 | 4,904 | 6,000 | 3,649 | 3 | 0,612 | 8 | 0 | 1 | 0,000 | 0,000% | 0,000 | 0,000 |
| SM | 14 | 58 | 5,080 | 5,273 | 3,617 | 3 | 0,629 | 8 | 3 | 4 | 0,643 | 0,066% | -1,447 | -1,832 |
| IC | 15 | 62 | 5,345 | 5,636 | 4,022 | 10 | 0,636 | 10 | 0 | 1 | 0,000 | 0,000% | 0,000 | 0,000 |
| CA | 16 | 55 | 4,711 | 5,000 | 3,552 | 1 | 0,603 | 10 | 0 | 1 | 0,000 | 0,000% | 0,000 | 0,000 |
| BE | 15 | 48 | 4,206 | 4,364 | 3,063 | 2 | 0,569 | 10 | 9 | 4 | 0,800 | 0,347% | 1,034 | 2,272 |
| SS | 16 | 55 | 4,760 | 5,000 | 3,442 | 4 | 0,615 | 8 | 8 | 2 | 0,250 | 0,177% | -1,701* | 3,555* |
| IB | 24 | 73 | 5,711 | 6,636 | 4,656 | 10 | 0,694 | 9 | 0 | 1 | 0,000 | 0,000% | 0,000 | 0,000 |
| BU | 19 | 36 | 3,069 | 3,273 | 2,114 | 2 | 0,397 | 10 | 0 | 1 | 0,000 | 0,000% | 0,000 | 0,000 |
| IA | 29 | 74 | 5,419 | 6,727 | 4,153 | 5 | 0,664 | 9 | 2 | 3 | 0,556 | 0,054% | -0,583 | -0,532 |
| UB | - | - | - | - | - | - | - | 7 | 0 | 1 | 0,000 | 0,000% | 0,000 | 0,000 |
| TOTAL | 207 | 139 | 12,636 | 12,636 | 4,697 | - | 0,689 | 106 | 11 | 8 | 0,596 | 0,281% | 1,326 | 2,750 |

JO = Joinville; **SF** = São Francisco do Sul; **IS** = Ilha do Superagui; **SM** = Salto Morato; **IC** = Ilha do Cardoso; **CA** = Cananeia; **BE** = Bertioga; **SS** = São Sebastião; **IB** = Ilhabela; **BU** = Ilha dos Búzios; **IA** = Ilha Anchieta; **UB** = Pinguaba. *Valores significativos ($p < 0,05$).

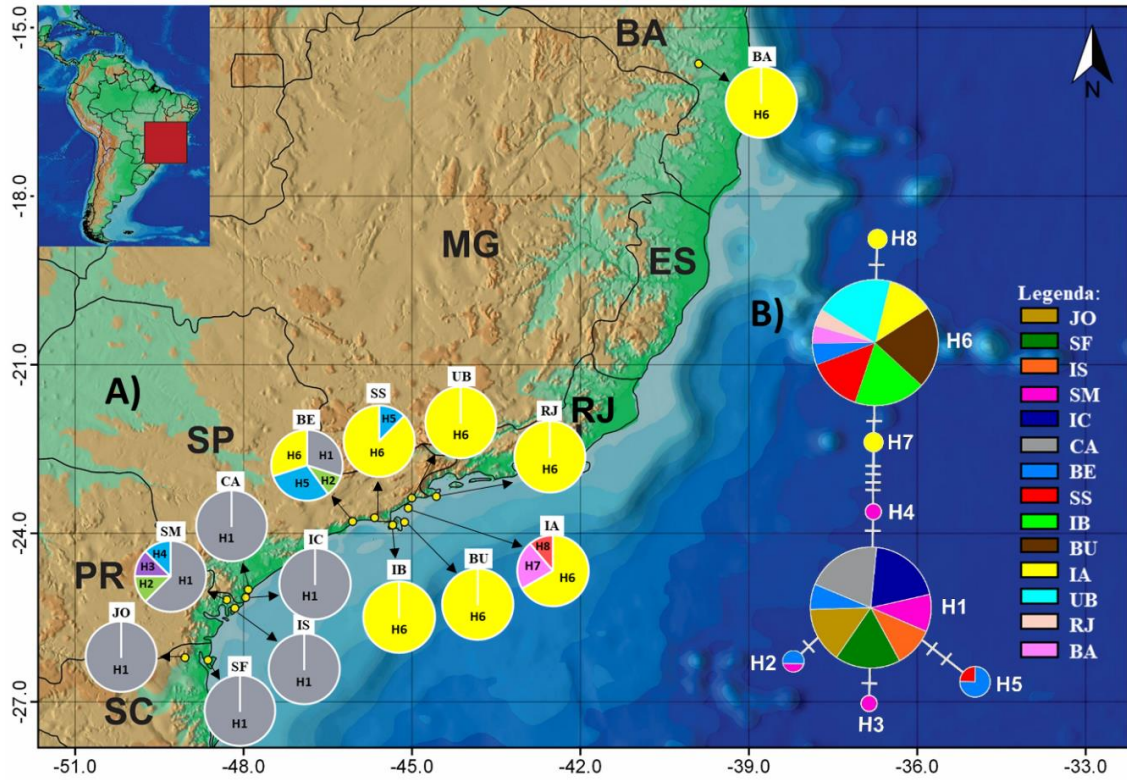


Figura 5. (A) Mapa parcial do Brasil e distribuição dos gráficos indicando a frequência e distribuição de cada haplótipo; (B) Rede de haplótipos obtida a partir do sequenciamento das regiões *citb* e *COI* (DNAm) em 110 amostras de *Euglossa stellfeldi* provenientes de 14 localidades. Os tamanhos dos círculos são proporcionais às frequências dos haplótipos. Amostras de Paraty (Rio de Janeiro) e Camacan (Bahia) obtidas do NCBI (Ferrari e Melo, 2014).

Tabela 4. Distribuição dos 8 haplótipos da matriz concatenada e seus sítios variáveis encontrados entre 110 amostras* de *Euglossa stellfeldi*.

| | 154 | 171 | 199 | 246 | 249 | 306 | 313 | 372 | 497 | 595 | 874 |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| H1 | G | T | T | C | A | A | C | T | T | A | T |
| H2 | G | C | T | C | A | A | C | T | T | A | T |
| H3 | G | T | T | C | A | A | T | T | T | A | T |
| H4 | A | T | T | C | A | A | C | T | T | A | T |
| H5 | A | T | A | T | A | T | C | T | C | G | T |
| H6 | G | T | T | C | G | A | C | C | T | A | T |
| H7 | A | T | A | T | A | T | C | T | T | G | T |
| H8 | A | T | A | T | A | T | C | T | C | G | A |

*Foram incluídas amostras de Paraty (Rio de Janeiro) e Camacan (Bahia) obtidas do NCBI (Ferrari e Melo, 2014).

3.3.2 Estrutura Genética

A análise de variância molecular (AMOVA), realizada a partir dos dados de microssatélites, revelou uma moderada diferenciação genética entre as amostras das onze localidades ($\Phi_{ST} = 0,1008$; $p < 0,001$) e uma elevada variação dentro das amostras ou ‘populações’ (89,91%) (Tabela 5).

Tabela 5. Análise da Variância Molecular (AMOVA) e variação genética (Φ_{ST}) para as amostras de *Euglossa stellfeldi* dos nove pontos estudados, mostrando a porcentagem de variação entre e dentro de populações, obtida a partir de marcadores microssatélites e mitocondriais.

| Microssatélites | | | | | |
|----------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------|
| Fonte de variação | Graus de Liberdade | Soma dos Quadrados | Componentes de variação | Porcentagem de variação | Φ_{ST} |
| Entre populações | 10 | 179,059 | 0,388 | 10,08% | |
| Dentro de populações | 403 | 1392,864 | 3,456 | 89,91% | 0,1008* |
| Total | 413 | 1571,923 | 3,844 | | |
| DNAmT | | | | | |
| Fonte de variação | Graus de Liberdade | Soma dos Quadrados | Componentes de variação | Porcentagem de variação | mt- Φ_{ST} |
| Entre populações | 11 | 137,051 | 1,376 | 81,29% | |
| Dentro de populações | 94 | 29,769 | 0,316 | 18,71% | 0,8129* |
| Total | 105 | 166,821 | 1,692 | | |

*Valores significativos ($p < 0,001$).

De forma distinta, a AMOVA com base nos marcadores mitocondriais, revelou uma forte estruturação genética ($\Phi_{ST} = 0,8129$ $p < 0,01$) entre os diferentes pares de amostras das doze localidades (Tabela 5), com a maior parte da variação genética conspicuamente presente entre as amostras (81,29%).

Ainda com relação aos marcadores microssatélites, na análise de diferenciação genética par a par, para ambos os estimadores usados (Φ_{ST} e D_{est}) foram encontrados valores significativos de diferenciação para os mesmos 47 pares de amostras dos 55 analisados (Tabela 6). Como esperado, em todos os comparativos, os valores de D_{est} foram superiores aos de Φ_{ST} . Dentre os valores significativos, para ambos os estimadores, os maiores valores foram obtidos entre BU e as amostras das demais localidades. (Tabela 6).

Tabela 6. Diferenciação genética par a par obtida a partir de dados de microssatélites para amostras de *E. stellfeldi* a partir do D_{est} de Jost (2008) (Diagonal superior) e Φ_{ST} (Diagonal inferior).

| | JO | SF | IS | SM | IC | CA | BE | SS | IB | BU | IA |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| JO | ----- | 0,089* | 0,000 | 0,119* | 0,272* | 0,111* | 0,131* | 0,180* | 0,081* | 0,408* | 0,056* |
| SF | 0,061* | ----- | 0,092* | 0,000 | 0,221* | 0,115* | 0,142* | 0,072* | 0,024 | 0,329* | 0,051 |
| IS | 0,021 | 0,061* | ----- | 0,128* | 0,184* | 0,066* | 0,081* | 0,166* | 0,095* | 0,275* | 0,069* |
| SM | 0,058* | 0,038 | 0,060* | ----- | 0,202* | 0,152* | 0,188* | 0,028 | 0,005 | 0,342* | 0,049* |
| IC | 0,089* | 0,098* | 0,072* | 0,081* | ----- | 0,085* | 0,113* | 0,268* | 0,196* | 0,200* | 0,214* |
| CA | 0,056* | 0,074* | 0,043* | 0,072* | 0,055* | ----- | 0,046 | 0,128* | 0,097* | 0,208* | 0,097* |
| BE | 0,064* | 0,085* | 0,050* | 0,085* | 0,065* | 0,047 | ----- | 0,203* | 0,148* | 0,249* | 0,099* |
| SS | 0,071* | 0,062* | 0,068* | 0,042 | 0,095* | 0,066* | 0,089* | ----- | 0,055* | 0,299* | 0,063* |
| IB | 0,040* | 0,042 | 0,041* | 0,030 | 0,067* | 0,049* | 0,063* | 0,039* | ----- | 0,362* | 0,012 |
| BU | 0,167* | 0,170* | 0,131* | 0,156* | 0,114* | 0,114* | 0,136* | 0,144* | 0,143* | ----- | 0,280* |
| IA | 0,034* | 0,048 | 0,035* | 0,038* | 0,049* | 0,049* | 0,052* | 0,040* | 0,022 | 0,123* | ----- |

JO = Joinville; SF = São Francisco do Sul; IS = Ilha do Superagui; SM = Salto Morato; IC = Ilha do Cardoso; CA = Cananeia; BE = Bertioga; SS = São Sebastião; IB = Ilhabela; BU = Ilha dos Búzios; IA = Ilha Anchieta.
*Valores significativos ($p < 0,05$).

Na análise obtida com os dados nucleares de correlação entre as distâncias geográfica (km) e genética (Φ_{ST} e D_{est}), envolvendo os 11 pontos amostrados, não foi encontrada nenhuma correlação significativa para os estimadores Φ_{ST} ($R^2 = 0,0014$, $p = 0,410$) e D_{est} ($R^2 = 0,00005$, $p = 0,460$).

Na análise bayesiana foi obtido um K provável igual a dois (Figura 6-A). Novamente, nesta análise a amostra de BU apresentou um padrão mais homogêneo, com menos mistura, entre seus 19 indivíduos analisados (Figura 6-B).

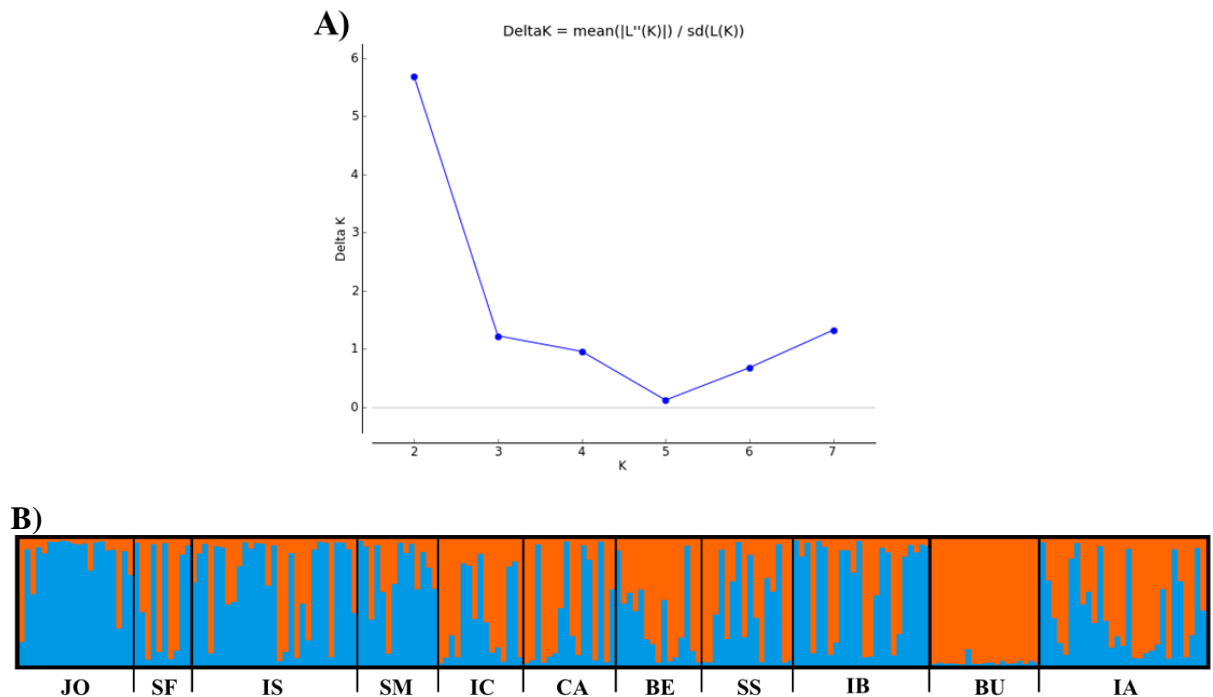


Figura 6. (A) Estimativa do número de agrupamentos (K) a partir da estatística ΔK de Evanno *et al.* (2005). (B) Representação gráfica do agrupamento bayesiano ($K=2$), gerado a partir de onze locos de microssatélites para os onze pontos analisados de *Euglossa stellfeldi*. **JO** = Joinville; **SF** = São Francisco do Sul; **IS** = Ilha do Superagui; **SM** = Salto Morato; **IC** = Ilha do Cardoso; **CA** = Cananeia; **BE** = Bertioga; **SS** = São Sebastião; **IB** = Ilhabela; **BU** = Ilha dos Búzios; **IA** = Ilha Anchieta.

Para os dados de DNAmT, as comparações genéticas par a par mostraram diferenciação genética significativamente diferente de zero entre 36 dos 66 comparativos realizados. Em todos os casos os valores de $mt-\Phi_{ST}$ encontrados foram $> 0,213$, indicando estruturação genética variando de alta a muito alta. O maior $mt-\Phi_{ST}$ entre os pontos analisados que se mostraram altamente estruturadas foi de $mt-\Phi_{ST} = 1$, sendo encontrado em 15 comparativos (Tabela 7).

Tabela 7. Diferenciação genética par a par ($mt-\Phi_{ST}$) obtida para amostras de *Euglossa stellfeldi*, a partir de haplótipos mitocondriais.

| | JO | SF | IS | SM | IC | CA | BE | SS | IB | BU | IA | UB |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|------|
| JO | ----- | | | | | | | | | | | |
| SF | 0,000 | ----- | | | | | | | | | | |
| IS | 0,000 | 0,000 | ----- | | | | | | | | | |
| SM | 0,000 | 0,015 | 0,000 | ----- | | | | | | | | |
| IC | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,029 | ----- | | | | | | | |
| CA | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,029 | 0,000 | ----- | | | | | | |
| BE | 0,178 | 0,196 | 0,178 | 0,133 | 0,213* | 0,213 | ----- | | | | | |
| SS | 0,818* | 0,828* | 0,818* | 0,756* | 0,838* | 0,838* | 0,356* | ----- | | | | |
| IB | 1,000* | 1,000* | 1,000* | 0,942* | 1,000* | 1,000* | 0,582* | 0,015 | ----- | | | |
| BU | 1,000* | 1,000* | 1,000* | 0,946* | 1,000* | 1,000* | 0,598* | 0,029 | 0,000 | ----- | | |
| IA | 0,944* | 0,948* | 0,944* | 0,887* | 0,951* | 0,951* | 0,526* | 0,000 | 0,083 | 0,098 | ----- | |
| UB | 1,000* | 1,000* | 1,000* | 0,934* | 1,000* | 1,000* | 0,546* | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,047 | ---- |

JO = Joinville; **SF** = São Francisco do Sul; **IS** = Ilha do Superagui; **SM** = Salto Morato; **IC** = Ilha do Cardoso; **CA** = Cananeia; **BE** = Bertioga; **SS** = São Sebastião; **IB** = Ilhabela; **BU** = Ilha dos Búzios; **IA** = Ilha Anchieta; **UB** = Pinguaba. *Valores significativos ($p < 0,05$).

De um modo geral, para ambos os tipos de marcadores utilizados, com exceção de BU (Ilha de Búzios), não se observou qualquer tendência clara de estruturação genética entre áreas insulares e áreas continentais próximas (Tabelas 6 e 7), a exemplo de ISxSM, ICxCA, IBxSS. No caso dos marcadores mitocondriais, esta ausência de estruturação genética é ainda mais evidente (Tabela 7).

De forma distinta do encontrado para os marcadores nucleares, o teste de Mantel, realizado a partir das análises dos dados mitocondriais revelou uma correlação positiva significativa entre as distâncias genética mt- Φ_{ST} e geográfica ($R^2 = 0,5268$; $p = 0,010$) (Figura 7).

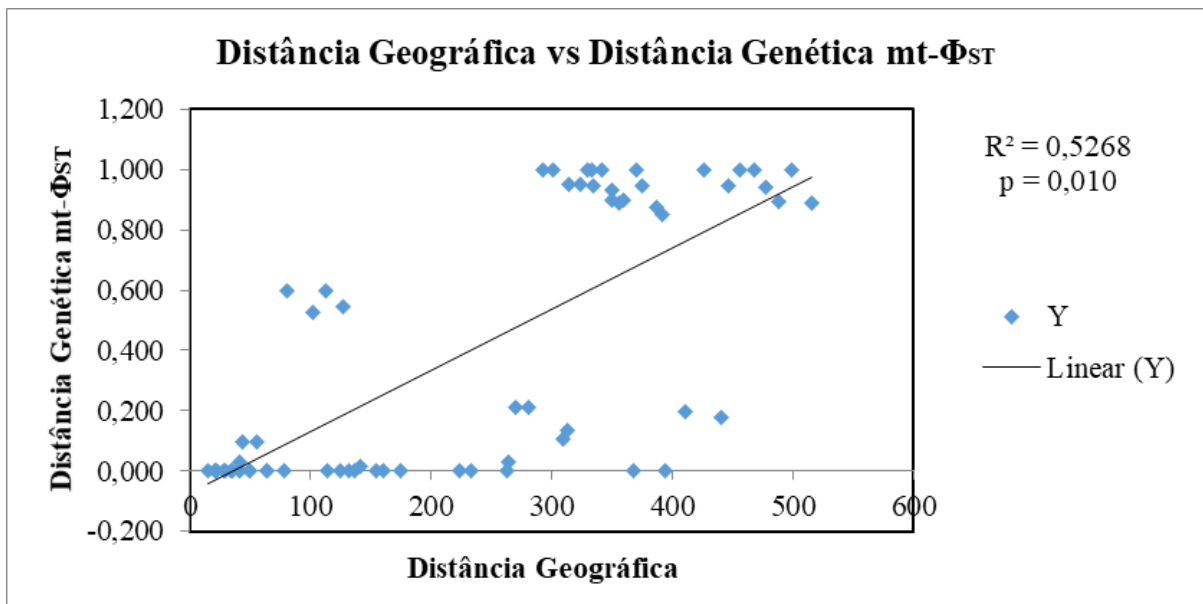


Figura 7. Correlação entre distâncias geográfica (km) e genética, com base no estimador mt- Φ_{ST} , entre as 12 áreas de estudo amostradas para *Euglossa stellfeldi*, a partir da análise de segmentos dos genes mitocondriais *citb* e *COI*.

Nas análises demográficas, com base nos marcadores mitocondriais, foram gerados três padrões de distribuição *mismatch*, incluindo: i) populações ao sudeste, de BE a UB (Figura 8-A); ii) populações ao sul, de JO a CA (Figura 8-B); iii) todas as populações (Figura 8-C). O conjunto de todas as populações e o conjunto das populações ao sudeste apresentaram uma distribuição próxima a um padrão multimodal, sugerindo uma estabilidade populacional, enquanto que, o conjunto das populações ao sul apresentaram uma distribuição próxima a um padrão unimodal, sugerindo, neste caso, um padrão de expansão populacional.

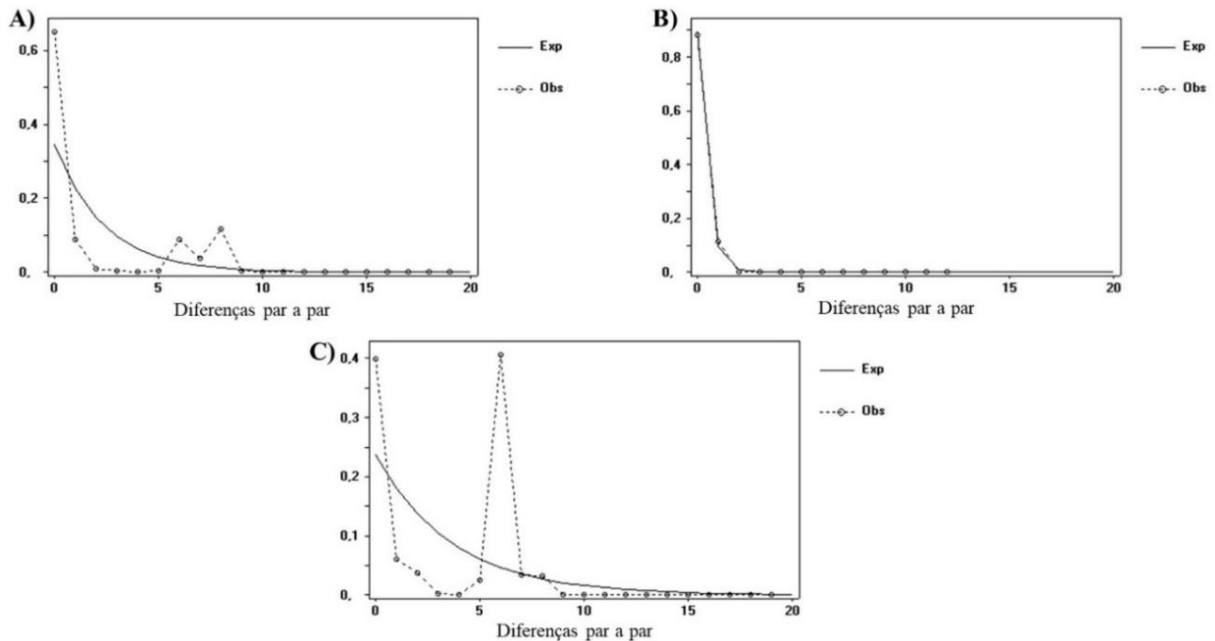


Figura 8. Distribuição *mismatch* para os haplótipos mitocondriais obtidos para os doze pontos analisados para *Euglossa stellfeldi*, comparando distribuição esperada para o cenário de crescimento populacional (linha sólida; Exp) e a distribuição observada (linha pontilhada; Obs). (A) Populações ao sudeste (BE a BU); (B) populações ao sul (JO a CA); (C) todas as populações. JO = Joinville; SF = São Francisco do Sul; IS = Ilha do Superagui; SM = Salto Morato; IC = Ilha do Cardoso; CA = Cananeia; BE = Bertioiga; SS = São Sebastião; IB = Ilhabela; BU = Ilha dos Búzios; IA = Ilha Anchieta; UB = Pinguaba.

3.4 DISCUSSÃO

Dentre os principais resultados obtidos nas análises de estrutura genética, merece destaque as diferenças encontradas entre os marcadores utilizados, com os marcadores mitocondriais (*citb* e *COI*) revelando maiores níveis de estruturação genética comparados aos nucleares. Pela natureza de herança materna do DNAm, os resultados corroboram com o que tem sido identificado em estudos com diferentes espécies da subtribo, que atribuíram a maior estruturação genética relacionada aos marcadores mitocondriais ao comportamento filopátrico das fêmeas (López-Uribe *et al.*, 2014; Penha *et al.*, 2015). Tais resultados reforçam também a ideia de que machos de *Euglossina* atuam como o sexo dispersor (Cerântola *et al.*, 2011; Rocha-Filho *et al.*, 2013; López-Uribe *et al.*, 2014; Penha *et al.*, 2015; Suni, 2017), confirmando uma das hipóteses aqui delineadas.

Como já salientado, diferente das fêmeas, as quais tendem a permanecer próximas ao local onde nasceram, fundando novos ninhos ou até mesmo, em algumas espécies, participando da reativação do ninho materno (Augusto e Garófalo, 2004, 2011), já os machos abandonam o ninho após emergência (Dodson *et al.*, 1969). Tal comportamento pode estar relacionado ao fato de que estudos realizados com diferentes espécies de *Euglossina* utilizando dados de microssatélites relatem níveis relativamente baixos de estrutura genética

(Freiria *et al.*, 2012; Rocha-Filho *et al.*, 2013; López-Uribe *et al.*, 2014; Penha *et al.*, 2015), quando comparados aos revelados por marcadores mitocondriais (López-Uribe *et al.*, 2014; Penha *et al.*, 2015).

Nos resultados com os marcadores nucleares, com ênfase às análises de diferenciação genética par a par (Φ_{ST} e D_{est}) e na análise Bayesiana (Structure), merece destaque a alta estruturação genética obtida em BU, assim como os baixos índices de diversidade genética encontrados com estes mesmos marcadores. Embora a restrição ao fluxo gênico seja um fator determinante na estruturação genética de populações (Frankham, 2008), declínios populacionais, com perdas locais de diversidade, devem também ser considerados em situações como a observada para a população da BU. Este resultado pode ser devido ao fato desta ser uma ilha relativamente pequena (7,55 km²), na qual populações menores podem estar sujeitas à perda de variabilidade genética pela ação da deriva genética (Wright, 1931). Do mesmo modo, este resultado poderia ser explicado pelo isolamento de BU, que apesar de não estar muito distante de IB (15 km) e do continente (24 km), poderia estar influenciando o baixo fluxo gênico entre essas populações. De modo distinto, os resultados descritos por Francisco *et al.* (2016), revelaram uma baixa estruturação genética entre populações de *Bombus morios* de ilhas e continentes, incluindo Ilha dos Búzios. Entretanto, no caso desta espécie, pelo maior tamanho dos indivíduos quando comparados a *E. stellfeldi*, espera-se uma maior capacidade de dispersão, uma vez que as espécies de abelhas de maior tamanho corpóreo teriam maior capacidade de dispersão (Greenleaf *et al.*, 2007). Outro estudo que avaliou a estrutura genética entre continente e ilhas foi realizado por Rocha-Filho *et al.* (2013), e diferentemente do presente trabalho, os autores registraram para populações de *E. stellfeldi* localizados em Ubatuba-Picinguaba e Ilha Anchieta uma diferenciação genética significativa, entre as amostras de ilha e continente ($F_{ST} = 0,028$, $p = 0,016$), no entanto, os autores encontram uma baixa estruturação. Curiosamente, este resultado não se repetiu para outras espécies da subtribo (Rocha-Filho *et al.*, 2013), os autores sugerem distintas capacidades de dispersão entre espécies deste grupo de abelhas, o que, de acordo com estes autores, requer o desenvolvimento de diferentes estratégias conservacionistas para as espécies de Euglossina (Rocha-Filho *et al.*, 2013).

Adicionalmente aos resultados discutidos no parágrafo anterior, vale destacar os maiores valores de diversidade genética encontrados em IB, sendo este um ponto próximo a BU, o qual foram encontrados os menores índices de diversidade, além da alta estruturação. Isto pode ser explicado pelo fato da ocorrência de alguma restrição ao fluxo gênico ou devido a BU ser uma ilha pequena, em comparação a IB, o que diminuiria sua variabilidade genética,

pois populações menores estão mais sujeitas à perda de variabilidade por deriva genética (Wright, 1931; Frankham, 1997). Assim como IB, os outros ambientes insulares (IS, IC, IA) apresentaram índices altos de diversidade genética. Entretanto, quando observado os dados nucleares de diferenciação genética par a par, é relevante a estruturação genética significativa encontrada entre os ambientes insulares, destacando, com exceção de BU, a população de IC, que de modo similar apresentou elevados índices de estruturação. De modo distinto de BU, IC é uma ilha relativamente grande (225 km²) e os resultados encontrados podem ser explicados devido a alguma barreira geográfica, neste caso o oceano, que poderia estar limitando o fluxo gênico, ou algum efeito de deriva genética nesta população.

Assim como outros estudos com espécies de Euglossina, que apresentam uma maior sensibilidade a habitats fragmentados ou com algum tipo de interferência antrópica (Powell e Powell, 1987; Tonhasca *et al.*, 2002; Giangarelli *et al.*, 2009), a estrutura genética significativa encontrada para as populações de *E. stellfeldi*, mesmo baixa em vários casos, pode estar indicando uma limitação na capacidade de dispersão desta espécie em comparação à outras espécies da subtribo (Cerântola *et al.*, 2011; Rocha-Filho *et al.*, 2013; Suni, 2017). Além disto, a atuação do mar como uma barreira ao fluxo gênico entre populações de abelhas Euglossina de áreas continentais e ilhas tem sido reconhecida em alguns estudos (Rocha-Filho *et al.*, 2013; Boff *et al.*, 2014). Contudo, no presente trabalho, tal fato parece ter relação apenas com o que foi observado em BU. Na verdade, os resultados aqui obtidos com ambos os tipos de marcadores moleculares não são indicativos de que o mar esteja constituindo uma barreira relevante à dispersão de *E. stellfeldi*, sendo BU a única exceção a esta conclusão. Neste caso, o tamanho reduzido da ilha e a maior distância desta do continente, quando se considerada todas as demais ilhas estudadas, parecem ser os fatores mais plausíveis para explicar os resultados de maior estruturação e menor diversidade genética encontrados.

Em um estudo que envolveu diversas espécies de Euglossina, a IC foi a localidade com o maior número de machos diploides detectados para a espécie *Euglossa annectans* (Giangarelli *et al.*, 2015). Tais autores sugerem que o isolamento das ilhas poderia ter reduzido a diversidade genética nas populações desta espécie, e neste caso o mar poderia estar agindo como barreira ao fluxo gênico. O mesmo foi sugerido para populações de *Euglossa cordata* que mostraram menor diversidade genética em ambientes insulares (Boff *et al.*, 2014). Além disto, Giangarelli *et al.* (2015) sugerem que *E. annectans* possa ser uma espécie mais sensível à fragmentação de habitats. De modo similar, Mattozo *et al.* (2011) também chamam atenção para o fato de *E. stellfeldi* ser mais sensível a interferências antrópicas em comparação com outras espécies de *Euglossa*, enfatizando a ausência desta espécie em áreas

impactadas. Chama-se atenção para o fato de que todas as áreas estudadas do estudo, são reservas governamentais ou privadas com condições de preservação bem maiores do que usualmente é encontrado em demais áreas de MA (Ribeiro *et al.*, 2009).

Os maiores valores de diferenciação relevados pelo estimador D_{est} em relação aos obtidos com seu análogo Φ_{ST} , nas análises de microssatélites relacionadas aos comparativos entre pares de amostras, estão em conformidade com alguns resultados obtidos com outras espécies de Euglossina (Freiria *et al.*, 2012; Penha *et al.*, 2015). Essa diferença entre os estimadores pode ser explicada pelo fato do índice D_{est} ser um estimador que corrige o viés originado a partir de diferenças nas frequências alélicas em amostragens aleatórias (Jost, 2008; Bird *et al.*, 2011), evitando assim valores tendenciosos em situações de amostragens pequenas e discrepantes.

Outro resultado importante encontrado é a estrutura e diversidade genética obtidas a partir do marcador mitocondrial. A rede de haplótipos apresentou uma importante diferenciação genética, sendo que as populações mais ao sul compartilham um haplótipo diferente das populações mais ao sudeste e de RJ e BA. Entretanto, vale destacar que exclusivamente BE apresentou estes dois haplótipos (H1 e H6), o que pode ser explicado pelo fato desta população ser uma possível zona de hibridização dos pontos analisados neste trabalho, com isso, ainda compartilhando os dois haplótipos. Apesar da baixa variação na sequência mitocondrial analisada, os resultados obtidos em BE sugerem uma possível zona de hibridização e quebra filogeográfica entre o conjunto de populações ao sul, de JO a CA, que compartilham de forma exclusiva o H1, e o conjunto de populações do sudeste ao norte, de SS a BA, que compartilham exclusivamente o H6. Alguns estudos populacionais envolvendo diferentes espécies animais que apontam para esta possível zona de hibridização no estado de São Paulo (Grazziotin *et al.*, 2006; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Batalha-Filho *et al.*, 2010; Thomé *et al.*, 2010; Raposo do Amaral *et al.*, 2013; Penha *et al.*, 2015). No estudo de Grazziotin *et al.* (2006) com uma espécie de serpente, os autores obtiveram um padrão distinto de distribuição haplotípica das populações do clado norte comparados com as populações do clado sul, apontando para uma possível ocorrência de uma zona de barreira genética em SP. Tal fato é atribuído a um possível evento relacionado ao final do Pleistoceno ou aos níveis de flutuações climáticas que ocorreram no Holoceno. Destaca-se também o número de haplótipos obtidos em BE e SM, entretanto a frequência desses haplótipos é menor em SM, quando comparados com BE, indicando que o grupo de populações mais ao sul podem estar em expansão populacional como apontado com os resultados da distribuição *Mismatch*. O mesmo foi encontrado com os valores de Φ_{ST} par a par, que se mostraram bastante

significativos e corroboram com os resultados da rede de haplótipos onde ocorre uma separação evidente quando comparado populações do sul com as do sudeste. Outro resultado importante é o número de haplótipos obtidos em IA, que apesar de ser um ambiente insular possui uma quantidade significativa de haplótipos (H6, H7 e H8) quando comparados com as outras ilhas.

Os valores significativos obtidos com o teste de neutralidade de Tajima (D) em SS, podem indicar seleção natural ou populações instáveis e valores negativos, mesmo que não significativos, como em SM e IA, podem indicar eventos de expansão populacional (Tajima, 1989; Excoffier *et al.*, 2010). Os resultados da análise de correlação entre distância geográfica (km) e a distância genética ($mt-\Phi_{ST}$), também mostraram uma forte correlação significativa, demonstrando que pode haver um padrão gerado pelo isolamento por distância entre as populações (Wright, 1943), o que gera uma correlação de frequências gênicas que diminuem à medida que o número de passos mutacionais entre as populações aumentam (Kimura e Weiss, 1964). Quando os valores de $mt-\Phi_{ST}$ estimados com os genes mitocondriais (*COI* e *citb*) são comparados aos valores de Φ_{ST} estimados para os locos microssatélites, observa-se que os dados significativos de diferenciação obtidos com o DNAm foram maiores que os dados obtidos com DNA nuclear. Esses resultados podem estar associados a dispersão sexo-assimétrica da espécie, na qual as fêmeas são consideradas filopátricas e responsáveis pela ocupação das áreas, atuando como colonizadoras e os machos atuando como dispersores, sendo os responsáveis pelo surgimento de novos alelos na população. Neste contexto, a proximidade geográfica influencia os eventos de colonização, sendo mais favorável quanto maior a proximidade física entre o novo local e o de origem (Cerântola, 2009).

No presente estudo, embora as coletas de *E. stellfeldi* tenham sido realizadas em porções mais ao norte de UB, nenhum indivíduo foi coletado nas áreas amostradas. De acordo com Faria Jr e Melo (2007), a distribuição geográfica de *E. stellfeldi* avança até porções da Bahia e Alagoas. Contudo, é muito provável que populações desta espécie nos limites mais ao norte de distribuição de *E. stellfeldi* sejam menores, uma vez que nos diversos levantamentos realizados nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Alagoas, os registros de *E. stellfeldi* são raros (Ferrari e Melo, 2014) ou mesmo inexistentes (Ramalho *et al.*, 2009; Nemésio, 2010, 2011, 2012). Neste sentido, aparentemente, algumas das áreas amostradas referem-se às de maior abundância de indivíduos nas populações desta espécie endêmica à Mata Atlântica. Portanto, a relevância maior deste estudo está em fornecer as primeiras informações sobre a diversidade genética e estrutura de populações de *E. stellfeldi* na sua principal região de distribuição na Mata Atlântica. Não menos importante é o fato de que,

embora muitas das áreas amostradas pertençam a reservas governamentais, os resultados obtidos revelam uma estruturação genética importante entre as populações da espécie estudada, com algumas áreas, a exemplo de BU, merecendo maior atenção para um manejo adequado voltado à conservação das populações de *E. stellfeldi*. Outro resultado importante é a dispersão sexo-assimétrica encontrada com os marcadores microssatélites e mitocondriais, em que o DNAm_t apresentou uma maior estruturação entre suas populações, reforçando a ideia da filopatria das fêmeas e os dados microssatélites, apesar de uma moderada estruturação, evidenciam que os machos atuam como sexo dispersor.

Agradecimentos

Ao CNPq e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro ao projeto e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado concedida. Aos pesquisadores: Ms. Enderlei Dec, Dra. Isabel Alves dos Santos, Dr. Guaraci Duran Cordeiro, Dr. Léo Correia Rocha Filho, Dr Marco Antonio Del Lama, Dr. Douglas Caldeira Giangarelli, Dr. Wilson Frantine da Silva, Ms. Rafael Elias da Silva Penha pela doação das amostras de *Euglossa stellfeldi*.

3.5 REFERÊNCIAS

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402.
- Arias, M. C., Silvestre, D., de Oliveira Francisco, F., Weinlich, R., & Sheppard, W. S. (2008). An oligonucleotide primer set for PCR amplification of the complete honey bee mitochondrial genome. *Apidologie*, 39(4), 475-480.
- Augusto, S. C., & Garófalo, C. A. (2004). Nesting biology and social structure of *Euglossa* (*Euglossa*) *townsendi* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Insectes Sociaux*, 51(4), 400-409.
- Augusto, S. C., & Garófalo, C. A. (2011). Task allocation and interactions among females in *Euglossa carolina* nests (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Apidologie*, 42(2), 162.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48.

- Batalha-Filho, H., Waldschmidt, A. M., Campos, L. A., Tavares, M. G., & Fernandes-Salomão, T. M. (2010). Phylogeography and historical demography of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie*, *41*(5), 534-547.
- Bird, C. E., Karl, S. A., Smouse, P. E., & Toonen, R. J. (2011). Detecting and measuring genetic differentiation. *Phylogeography and Population Genetics in Crustacea*, *19*(3), 1-55.
- Boff, S., Soro, A., Paxton, R. J., & Alves-dos-Santos, I. (2014). Island isolation reduces genetic diversity and connectivity but does not significantly elevate diploid male production in a neotropical orchid bee. *Conservation Genetics*, *15*(5), 1123-1135.
- Bondioli, A. C. V., Nagaoka, S. M., & Monteiro-Filho, E. L. A. (2005). Ocorrência, distribuição e status de conservação das tartarugas marinhas presentes na região de Cananéia, SP. *II Jornada de conservação e pesquisa de tartarugas marinhas no Atlântico Sul Ocidental. Praia do Cassino. Rio Grande, RS. Livro de Resumos*, 53-55.
- Cerântola, N. D. C. M. (2009). O padrão de dispersão é sexo-assimétrico nos Euglossíneos (Hymenoptera: Apidae: Euglossini)? Um estudo de caso: *Euglossa cordata*. *Universidade Federal de São Carlos, São Carlos*.
- Cerântola, N. D. C. M., Oi, C. A., Cervini, M., & Del Lama, M. A. (2011). Genetic differentiation of urban populations of *Euglossa cordata* from the state of São Paulo, Brazil. *Apidologie*, *42*(2), 214-222.
- Cordeiro, G. D. (2009). Abelhas solitárias nidificantes em ninhos-armadilha em quatro áreas de Mata Atlântica do estado de São Paulo. *Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto*.
- Cordeiro, G. D., Boff, S., de Almeida Caetano, T., Fernandes, P. C., & Alves-dos-Santos, I. (2013). Euglossine bees (Apidae) in Atlantic forest areas of São Paulo state, southeastern Brazil. *Apidologie*, *44*(3), 254-267.
- Crozier, Y. C., Koulianos, S., & Crozier, R. H. (1991). An improved test for Africanized honeybee mitochondrial DNA. *Experientia*, *47*(9), 968-969.
- Dec, E., & da Silva Mouga, D. M. D. (2014). Diversidade de abelhas (Hymenoptera: Apidae) em área de mata atlântica em Joinville, Santa Catarina. *Acta Biológica Catarinense*, *1*(2).
- Dec, E. (2015). *As espécies da tribo Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em diferentes cotas altimétricas em áreas de Mata Atlântica na região norte de Santa Catarina*, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.
- Dodson, C. H., Dressler, R. L., Hills, H. G., Adams, R. M., & Williams, N. H. (1969). Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science*, *164*(3885), 1243- 1249.
- Dressler, R. L. (1982). Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics*, *13*(1), 373-394.

- Earl, D. A. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359-361.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5(1), 113.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611-2620.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564-567.
- Faria Jr, L. R., & Melo, G. A. (2007). Species of *Euglossa* (Glossura) in the Brazilian Atlantic forest, with taxonomic notes on *Euglossa stellfeldi* Moure (Hymenoptera, Apidae, Euglossina). *Revista Brasileira de Entomologia*, 51(3), 275-284.
- Ferrari, B. R., & Melo, G. A. (2014). Deceiving colors: recognition of color morphs as separate species in orchid bees is not supported by molecular evidence. *Apidologie*, 45(5), 641-652.
- Fitzpatrick, S. W., Brasileiro, C. A., Haddad, C. F., & Zamudio, K. R. (2009). Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Molecular Ecology*, 18(13), 2877-2896.
- Francisco, F. D. O. (2012). *Estrutura e diversidade genética de populações insulares e continentais de abelhas da Mata Atlântica*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.
- Francisco, F. O., Santiago, L. R., Mizusawa, Y. M., Oldroyd, B. P., & Arias, M. C. (2016). Genetic structure of island and mainland populations of a Neotropical bumble bee species. *Journal of Insect Conservation*, 20(3), 383-394.
- Frantini-Silva, W., Giangarelli, D. C., Penha, R. E., Suzuki, K. M., Dec, E., Gaglianone, M. C., Alves-dos-Santos, I. & Sofia, S. H. (2017). Phylogeography and historical demography of the orchid bee *Euglossa iopoecila*: signs of vicariant events associated to Quaternary climatic changes. *Conservation Genetics*, 18(3), 539-552.
- Frankham, R. (2008). Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology*, 17(1), 325-333.
- Freiria, G. A., Ruim, J. B., de SOUZA, R. F., & Sofia, S. H. (2012). Population structure and genetic diversity of the orchid bee *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae,

- Euglossini) from Atlantic Forest remnants in southern and southeastern Brazil. *Apidologie*, 43(4), 392-402.
- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915-925.
- Giangarelli, D. C., Freiria, G. A., Colatreli, O. P., Suzuki, K. M., & Sofia, S. H. (2009). *Eufriesea violacea* (Blanchard) (Hymenoptera: Apidae): an orchid bee apparently sensitive to size reduction in forest patches. *Neotropical Entomology*, 38(5), 610-615.
- Giangarelli, D. C., & Sofia, S. H. (2011). First record of the orchid bee *Euglossa viridis* (Perty) (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) from Parana state, southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 71(1), 223-223.
- Giangarelli, D. C. (2015) *As abelhas das orquídeas da Ilha do Superagui: uma abordagem ecológica e molecular*. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Londrina.
- Giangarelli, D. C., Freiria, G. A., Ferreira, D. G., Aguiar, W. M., Penha, R. E., Alves, A. N., Gaglianone, M. C. & Sofia, S. H. (2015). Orchid bees: a new assessment on the rarity of diploid males in populations of this group of Neotropical pollinators. *Apidologie*, 46(5), 606-617.
- Goudet, J. F. S. T. A. T. (2001). FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86(6), 485-486.
- Grazziotin, F. G., Monzel, M., Echeverrigaray, S., & Bonatto, S. L. (2006). Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, 15(13), 3969-3982.
- Greenleaf, S. S., Williams, N. M., Winfree, R., & Kremen, C. (2007). Bee foraging ranges and their relationship to body size. *Oecologia*, 153(3), 589-596.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98).
- Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812-14817.
- Heller, R., & Siegismund, H. R. (2009). Relationship between three measures of genetic differentiation GST, DEST and G'ST: how wrong have we been? *Molecular Ecology*, 18(10), 2080-2083.
- Janzen, D. H. (1971). Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. *Science*, 171(3967), 203-205.

- Jost, L. O. U. (2008). GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, 17(18), 4015-4026.
- Kimura, M., & Weiss, G. H. (1964). The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, 49(4), 561.
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15(5), 1179-1191.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
- López-Urbe, M. M., Zamudio, K. R., Cardoso, C. F., & Danforth, B. N. (2014). Climate, physiological tolerance and sex-biased dispersal shape genetic structure of Neotropical orchid bees. *Molecular Ecology*, 23(7), 1874-1890.
- Mattozzo, V., Faria, L. R., & Melo, G. A. (2011). Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) in the coastal forests of southern Brazil: diversity, efficiency of sampling methods and comparison with other Atlantic forest surveys. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 51(33).
- Metzger, J. P. (2009). Conservation issues in the Brazilian Atlantic forest. *Biological Conservation*, 142, 1138-1140.
- Moure, J. S. (1947). *Novos agrupamentos genéricos e algumas espécies novas de abelhas sulamericanas*. Publicações Avulsas do Museu Paranaense, 1-37.
- Nemésio, A. (2010). *Eulaema* (Apeulaema) *felipei* sp. n. (Hymenoptera: Apidae: Euglossina): a new forest-dependent orchid bee found at the brink of extinction in northeastern Brazil. *Zootaxa*, 2424, 51-62.
- Nemésio, A. (2011). *Euglossa marianae* sp. n. (Hymenoptera: Apidae): a new orchid bee from the Brazilian Atlantic Forest and the possible first documented local extinction of a forest-dependent orchid bee. *Zootaxa*, 2892(1), 59-68.
- Nemésio, A. (2013). The orchid-bee faunas (Hymenoptera: Apidae) of 'Parque Nacional do Monte Pascoal', 'Parque Nacional do Descobrimento' and three other Atlantic Forest remnants in southern Bahia, eastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 73(2), 437-446.
- Paxton, R. J., Zobel, M. U., Steiner, J., & Zillikens, A. (2009). Microsatellite loci for *Euglossa annectans* (Hymenoptera: Apidae) and their variability in other orchid bees. *Molecular Ecology Resources*, 9(4), 1221-1223.
- Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 288-295.
- Penha, R. E. S. (2013). *Estrutura genética de Euglossa iopoecila* (Apidae, Euglossini) em remanescentes de Mata Atlântica. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Londrina.

- Penha, R. E., Gaglianone, M. C., Almeida, F. S., Boff, S. V., & Sofia, S. H. (2015). Mitochondrial DNA of *Euglossa iopoecila* (Apidae, Euglossini) reveals two distinct lineages for this orchid bee species endemic to the Atlantic Forest. *Apidologie*, *46*(3), 346-358.
- Pinto, L. P., Bedê, L., Paese, A., Fonseca, M., Paglia, A., & Lamas, I. (2006). Mata Atlântica Brasileira: os desafios para conservação da biodiversidade de um hotspot mundial. *Biologia da conservação: essências. São Carlos: RiMa*, 91- 118.
- Pokorny, T., Loose, D., Dyker, G., Quezada-Euán, J. J. G., & Eltz, T. (2015). Dispersal ability of male orchid bees and direct evidence for long-range flights. *Apidologie*, *46*(2), 224-237.
- Polzin, T., & Daneshmand, S. V. (2003). On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters*, *31*(1), 12-20.
- Powell, A. H., & Powell, G. V. (1987). Population dynamics of male euglossine bees in Amazonian forest fragments. *Biotropica*, 176-179.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, *155*(2), 945-959.
- Ramalho, A. V., Gaglianone, M. C., & Oliveira, M. L. D. (2009). Comunidades de abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em fragmentos de Mata Atlântica no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, *53*(1), 95-101.
- Raposo do Amaral, F., Albers, P. K., Edwards, S. V., & Miyaki, C. Y. (2013). Multilocus tests of Pleistocene refugia and ancient divergence in a pair of Atlantic Forest antbirds (*Myrmeciza*). *Molecular Ecology*, *22*(15), 3996-4013.
- Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J., & Hirota, M. M. (2009). The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, *142*(6), 1141-1153.
- Rocha Filho, L. C. D. (2011). *Estrutura genética e ecologia de comunidades das abelhas Euglossini (Hymenoptera; Apidae) do Parque Estadual da Serra do Mar e Parque Estadual da Ilha Anchieta, Ubatuba, SP, Brasil*, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.
- Rocha-Filho, L. C., Cerântola, N. D. C. M., Garófalo, C. A., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Del Lama, M. A. (2013). Genetic differentiation of the Euglossini (Hymenoptera, Apidae) populations on a mainland coastal plain and an island in southeastern Brazil. *Genetica*, *141*(1-3), 65-74.
- Rocha-Filho, L. C., & Garófalo, C. A. (2014). Phenological patterns and preferences for aromatic compounds by male euglossine bees (Hymenoptera, Apidae) in two coastal ecosystems of the Brazilian Atlantic Forest. *Neotropical Entomology*, *43*(1), 9-20.
- Ryman, N., & Leimar, O. (2009). GST is still a useful measure of genetic differentiation—a comment on Jost's D. *Molecular Ecology*, *18*(10), 2084-2087.

- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18(2), 233.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6), 651-701.
- Souza, R. O., Cervini, M., Del Lama, M. A., & Paxton, R. J. (2007). Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 1352-1356.
- Suni, S. S. (2017). Dispersal of the orchid bee *Euglossa imperialis* over degraded habitat and intact forest. *Conservation Genetics*, 18(3), 621-630.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Thomé, M. T. C., Zamudio, K. R., Giovanelli, J. G., Haddad, C. F., Baldissera Jr, F. A., & Alexandrino, J. (2010). Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(3), 1018-1031.
- Tonhasca Jr, A., Blackmer, J. L., & Albuquerque, G. S. (2002). Within-habitat heterogeneity of euglossine bee populations: a re-evaluation of the evidence. *Journal of Tropical Ecology*, 18(6), 929-933.
- Travalini, V., & da Cunha, C. M. L. (2016). Análise da dinâmica do uso da terra no município de Bertioga/SP. *Revista Geonorte*, 3, 506-517.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P., & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535-538.
- Whitlock, M. C. (2011). $G'ST$ and D do not replace FST . *Molecular Ecology*, 20(6), 1083-1091.
- Wikelski, M., Moxley, J., Eaton-Mordas, A., Lopez-Urbe, M. M., Holland, R., Moskowicz, D., Roubik, D. W. & Kays, R. (2010). Large-range movements of neotropical orchid bees observed via radio telemetry. *PLoS One*, 5(5), e10738.
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16(2), 97.
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28(2), 114.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Human Genetics*, 15(1), 323-354.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o estudo de populações de *Euglossa stelfeldi* permitem as seguintes conclusões:

- Os dados mitocondriais reforçam a ideia de dispersão sexo-assimétrica, indicando uma alta estruturação populacional, sugerindo que as fêmeas possuem comportamento filopátrico, sendo responsáveis pela ocupação das áreas após emergência e os machos constituem o sexo dispersor.
- Os dados nucleares indicam uma maior estruturação genética encontrada na população da Ilha dos Búzios (BU) em relação às demais estudadas, que aponta para a necessidade de maior atenção ou para o manejo de populações que ocorrem em ambientes insulares.
- Os resultados obtidos com os dados mitocondriais sugerem uma possível zona de hibridização e quebra filogeográfica na população de Bertiooga (BE).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA, P. E. F.; FREITAS, R. F.; AUGUSTO, S. C. Diversidade de *Euglossini* (Hymenoptera: Apidae) em áreas de cerrado do triângulo mineiro, MG. **Bioscience Journal**, v. 23, p. 30-37, 2007.
- ANDRADE-SILVA, A. C. R.; NEMÉSIO, A.; DE OLIVEIRA, F. F.; NASCIMENTO, F. S. Spatial-temporal variation in orchid bee communities (Hymenoptera: Apidae) in remnants of arboreal Caatinga in the Chapada Diamantina region, State of Bahia, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 41, n. 4, p. 296-305, 2012.
- ARIAS, M. C.; BRITO, R. M.; FRANCISCO, F. O.; MORETTO, G. OLIVEIRA, F. F.; SILVESTRE, D.; SHEPPARD, W. S. Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 259-274, 2006.
- AUGUSTO, S. C.; GARÓFALO, C. A. Nesting of *Euglossa* (*Euglossa*) *melanotricha* Moure (Hymenoptera: Apidae) in the ground of cerrado. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 1, p. 153-156, 2007.
- AUGUSTO, S. C.; GARÓFALO, C. A. Bionomics and sociological aspects of *Euglossa fimbriata* (Apidae, Euglossini). **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 525-538, 2009.
- AUGUSTO, S. C.; GARÓFALO, C. A. Nesting biology and social structure of *Euglossa* (*Euglossa*) *townsendi* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). **Insectes Sociaux**, v. 51, n. 4, p. 400-409, 2004.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, n.1, p. 489-522, 1987.
- AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, n. 1, p. 3-15, 2009.
- BOFF, S.; SORO, A.; PAXTON, R. J.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Island isolation reduces genetic diversity and connectivity but does not significantly elevate diploid male production in a neotropical orchid bee. **Conservation Genetics**, v. 15, n. 5, p. 1123-1135, 2014.
- BROSI, B. J. The effects of forest fragmentation on euglossine bee communities (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Biological Conservation**, v. 142, n. 2, p. 414-423, 2009.
- BUYS, S. C.; SCHMITTEL, A. C.; SILVA, M. F.; SOARES, R. C.; RODRIGUES, C. L.; DE ANTUNES, C. A. Inventário de abelhas Euglossini (Hymenoptera, Apidae) da Estação Biológica de Santa Lúcia (Santa Teresa, ES, sudeste do Brasil), com uma lista das espécies da tribo que ocorrem no Estado do Espírito Santo. **Acta Biológica Paranaense**, v. 42, n. 1-4, p. 217-228, 2013.

- CAMERON, S. A. Phylogeny and biology of neotropical orchid bees (Euglossini). **Annual Reviews in Entomology**, v. 49, n. 1, p. 377-404, 2004.
- CERÂNTOLA, N. C. M. **O Padrão de Dispersão é Sexo-Assimétrico nos Euglossíneos (Hymenoptera: Apidae: Euglossini)? Um estudo de caso: *Euglossa cordata***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- CERÂNTOLA, N. D. C. M.; OI, C. A.; CERVINI, M.; DEL LAMA, M. A. Genetic differentiation of urban populations of *Euglossa cordata* from the state of São Paulo, Brazil. **Apidologie**, v. 42, n. 2, p. 214-222, 2011.
- CHISTIYAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, n. 1-4, p. 1-29, 2006.
- CORDEIRO, G. D.; BOFF, S.; CAETANO, T. DE A.; FERNANDES, P. C.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Euglossine bees (Apidae) in Atlantic forest areas of São Paulo state, southeastern Brazil. **Apidologie**, v. 44, n. 3, p. 254-267, 2013.
- COSTA, C. P.; FRANCOY, T. M. The Impact of Different Phytophysiognomies on the Compositions of Orchid Bee Communities (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) in the Atlantic Forest in Brazil. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 110, n. 3, p. 255-262, 2017.
- DEC, E.; DA SILVA MOUGA, D. M. D. Diversidade de abelhas (Hymenoptera: Apidae) em área de mata atlântica em Joinville, Santa Catarina. **Acta Biológica Catarinense**, v. 1, n. 2, 2014.
- DODSON, C. H.; DRESSLER, R. L.; HILLS, H. G.; ADAMS, R. M.; WILLIAMS, N. H. Biologically active compounds in orchid fragrances. **Science**, v. 164, n. 3885, p. 1243-1249, 1969.
- DRESSLER, R. L. Biology of the orchid bees (Euglossini). **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 13, n. 1, p. 373-394, 1982.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 435-445, 2004.
- ELTZ, T.; WHITTEN, W. M.; ROUBIK, D. W.; LINSENMAYER, K. E. Fragrance collection, storage, and accumulation by individual male orchid bees. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 1, p. 157-176, 1999.
- FARIA JR, L. R. R.; MELO, G. A. R. Species of *Euglossa* (Glossura) in the Brazilian Atlantic forest, with taxonomic notes on *Euglossa stellfeldi* Moure (Hymenoptera, Apidae, Euglossina). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 51, n. 3, p. 275-284, 2007.
- FERRARI, B. R. **Filogeografia de espécies de *Euglossa* (Hymenoptera, Apidae) da Mata Atlântica**. Dissertação de Mestrado, 2012.
- FERRARI, B. R.; MELO, G. A. R. Deceiving colors: recognition of color morphs as separate species in orchid bees is not supported by molecular evidence. **Apidologie**, v. 45, n. 5, p. 641-652, 2014.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 1995.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, p. 220, 1998.

FERREIRA-CALIMAN, M. J.; ROCHA-FILHO, L. C. D.; FREIRIA, G. A.; GARÓFALO, C. A. Floral sources used by the orchid bee *Euglossa cordata* (Linnaeus, 1758)(Apidae:Euglossini) in an urban area of South-eastern Brazil. **Grana**, v. 57, n. 6, p. 471-480, 2018.

FRANCISCO, F. O. **Estrutura e diversidade genética de populações insulares e continentais de abelhas da Mata Atlântica**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2012.

FRANCISCO, F. O.; SANTIAGO, L. R.; MIZUSAWA, Y. M.; OLDROYD, B. P.; ARIAS, M. C. Genetic structure of island and mainland populations of Neotropical bumble bee species. **Journal of Insect Conservation**, v. 20, n. 3, p. 383-394, 2016.

FRANKHAM, R. Do island populations have less genetic variation than mainland populations? **Heredity**, v. 78, n. 3, p. 311, 1997.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. J. D.; BRISCOES, D. D. A. **Introduction to Conservation Genetics**. 2ª ed. Cambridge University Press, p. 618, 2010.

FRANTINE-SILVA, W.; GIANGARELLI, D. C.; PENHA, R. E. S.; SUZUKI, K. M.; DEC, E.; GAGLIANONE, M. C.; ALVES-DOS-SANTOS, I.; SOFIA, S. H. Phylogeography and historical demography of the orchid bee *Euglossa iopoecila*: signs of vicariant events associated to Quaternary climatic changes. **Conservation Genetics**, v. 18, n. 3, p. 539-552, 2017.

FREIRIA, G. A.; RUIIM, J. B.; SOUZA, R. F.; SOFIA, S. H. Population structure and genetic diversity of the orchid bee *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) from Atlantic Forest remnants in southern and southeastern Brazil. **Apidologie**, v. 43, n. 4, p. 392-402, 2012.

FREIRIA, G. A.; GARÓFALO, C. A.; DEL LAMA, M. A. The primitively social behavior of *Euglossa cordata* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini): a view from the perspective of kin selection theory and models of reproductive skew. **Apidologie**, v. 48, n. 4, p. 523-532, 2017.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Atlas Dos Remanescentes Florestais Da Mata Atlântica Período 2015-2016**. SOS Mata Atlântica/INPE/ISA, São Paulo, 2017.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas. **Fundação SOS Mata Atlântica e Conservation International**. São Paulo, 2005.

GARÓFALO, C. A. Social structure of *Euglossa cordata* nests (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Entomologia Generalis**, p. 77-83, 1985.

GARÓFALO, C. A. Biologia de nidificação dos euglossinae (Hymenoptera, Apidae). **Anais do Encontro sobre Abelhas**, v. 1, p. 17-25, 1994.

- GARÓFALO, C. A.; CAMILLO, E.; AUGUSTO, S. C.; JESUS, B. M. V. D.; SERRANO, J. C. Nest structure and communal nesting in *Euglossa* (Glossura) *annectans* Dressler (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 3, p. 589-596, 1998.
- GIANGARELLI, D. C.; FREIRIA, G. A.; COLATRELI, O. P.; SUZUKI, K. M.; SOFIA, S. H. *Eufriesea violacea* (Blanchard) (Hymenoptera: Apidae): an orchid bee apparently sensitive to size reduction in forest patches. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 5, p. 610-615, 2009.
- GIANGARELLI, D. C.; FREIRIA, G. A.; FERREIRA, D. G.; AGUIAR, W. M.; PENHA, R. E. S.; ALVES, A. N.; GAGLIANONE, M. C.; SOFIA, S. H. Orchid bees: a new assessment on the rarity of diploid males in populations of this group of Neotropical pollinators. **Apidologie**, v. 46, n. 5, p. 606-617, 2015.
- GONÇALVES, P. H. P. **Análise da variabilidade genética de uma pequena população de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2010.
- IBGE, D. D. G. Mapa de vegetação do Brasil. **Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE**, Rio de Janeiro, 2017.
- JANZEN, D. H. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. **Science**, v. 171, n. 3967, p. 203-205, 1971.
- JUSTINO, D. G.; AUGUSTO, S. C. Avaliação da eficiência de coleta utilizando armadilhas aromáticas e riqueza de *Euglossini* (Hymenoptera, Apidae) em áreas de Cerrado do Triângulo Mineiro. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 12, n. 3, 2012.
- LEYS, R.; COOPER, S. J. B.; SCHWARZ, M. P. Molecular phylogeny of the large carpenter bees, genus *Xylocopa* (Hymenoptera: Apidae), based on mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 17, n. 3, p. 407-418, 2000.
- LÓPEZ-URIBE, M. M. **Dinâmica e estrutura genética populacional de abelhas Euglossini (Hymenoptera: Apidae) visitantes florais de *Thevetia peruviana* (Apocynaceae) em áreas urbanas**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.
- LÓPEZ-URIBE, M. M.; GREEN, A. N.; RAMÍREZ, S. R.; BOGDANOWICZ, S. M.; DANFORTH, B. N. Isolation and cross-species characterization of polymorphic microsatellites for the orchid bee *Eulaema meriana* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Conservation Genetics Resources**, v. 3, n. 1, p. 21-23, 2011.
- LÓPEZ-URIBE, M. M.; ZAMUDIO, K. R.; CARDOSO, C. F.; DANFORTH, B. N. Climate, physiological tolerance and sex-biased dispersal shape genetic structure of Neotropical orchid bees. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 7, p. 1874-1890, 2014.
- LUNA-LUCENA, D.; MOURE-OLIVEIRA, D.; FERREIRA, K. M.; LUCENA, D. A.; GARÓFALO, C. A.; MORAES, E. M.; DEL LAMA, M. A. High mitochondrial DNA diversity and lack of population structure in a solitary cavity-nesting bee in an urban landscape. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 121, n. 3, p. 564-575, 2017.

- MACARTHUR, R. H.; WILSON, E. O. **The theory of island biogeography**. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 1967.
- MARTINS, A. C.; MELO, G. A. R. Has the bumblebee *Bombus bellicosus* gone extinct in the northern portion of its distribution range in Brazil? **Journal of Insect Conservation**, v. 14, n. 2, p. 207-210, 2010.
- MATTOZO, V.; FARIA, L. R. R.; MELO, G. A. R. Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) in the coastal forests of southern Brazil: diversity, efficiency of sampling methods and comparison with other Atlantic forest surveys. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 51, n. 33, p. 505-515, 2011.
- MAYR, E. **Systematics and the Origin of Species**. Columbia University Press, New York, NY, 1942.
- MICHENER, C. D. **The bees of the world**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, p. 754-760, 2000.
- MORELLATO, L. P. C.; HADDAD, C. F. B. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 32, n. 4b, p. 786-792, 2000.
- MORITZ, C. T. E. D.; DOWLING, T. E.; BROWN, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, n. 1, p. 269-292, 1987.
- MOURE, J. S. Novos agrupamentos genéricos e algumas espécies novas de abelhas sulamericanas. **Publicações Avulsas do Museu Paranaense**. p. 1-37, 1947.
- MOURE, J. S.; MELO, G. A. R.; FARIA JR, L. R. R. Euglossini Latreille, 1802. In MOURE, J. S.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version**. 2012. Disponível em: <<http://www.moure.cria.org.br/catalogue>>. Acesso em: 07 ago. 2017.
- MYERS, N; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.
- NEMÉSIO, A. Three new species of *Euglossa* Latreille (Hymenoptera: Apidae) from Brazil. **Zootaxa**, v. 1547, n. 1, p. 21-31, 2007.
- NEMÉSIO, A. Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of the Brazilian Atlantic Forest. **Zootaxa**, v. 2041, p. 1-242, 2009.
- NEMÉSIO, A. *Eulaema (Apeulaema) felipei* sp. n. (Hymenoptera: Apidae: Euglossina): a new forest-dependent orchid bee found at the brink of extinction in northeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 2424, p. 51-62, 2010.
- NEMÉSIO, A.; SILVEIRA, F. A. Diversity and distribution of orchid bees (Hymenoptera: Apidae) with a revised checklist of species. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 6, p. 874-888, 2007.

OLIVEIRA, M. L.; CAMPOS, L. A. O. Preferência por estratos florestais e por substâncias odoríferas em abelhas Euglossinae (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 13, n. 4, p. 1075-1085, 1996.

OLIVEIRA, M. L. **O gênero *Eulaema* Lepeletier, 1841 (Hymenoptera, Apidae, Euglossini): filogenia, biogeografia e relações com as Orchidaceae**. Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2000.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLIVIERI, I. Dispersal. In: GILLESPIE, R. G.; CLAGUE, D. A. **Encyclopedia of Islands**, University of California Press, Berkeley, CA, p. 224-228, 2009.

OTERO, J. T.; ULLOA-CHACÓN, P.; SILVERSTONE-SOPKIN, P.; GIRAY, T. Group nesting and individual variation in behavior and physiology in the orchid bee *Euglossa nigropilosa* Moure (Hymenoptera, Apidae). **Insectes Sociaux**, v. 55, n. 3, p. 320-328, 2008.

PAXTON, R. J.; ZOBEL, M. U.; STEINER, J.; ZILLIKENS, A. Microsatellite loci for *Euglossa annectans* (Hymenoptera: Apidae) and their variability in other orchid bees. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 4, p. 1221-1223, 2009.

PENHA, R. E. S.; GAGLIANONE, M. C.; ALMEIDA, F. S.; BOFF, S. V.; SOFIA, S. H. Mitochondrial DNA of *Euglossa iopoecila* (Apidae, Euglossini) reveals two distinct lineages for this orchid bee species endemic to the Atlantic Forest. **Apidologie**, v. 46, N. 3, p. 346-358, 2015.

PEREZ-SWEENEY, B. M.; RODRIGUES, F. P.; MELNICK, D. J. Metodologias Moleculares utilizadas em genética da conservação, p. 343-380. In: CULLEN JR, L.; RUNDAN, R.; PADUA, C. V (Eds.). **Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. Editora UFPR, Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Curitiba, Paraná, Brasil, 2003.

PERUQUETTI, R. C.; CAMPOS, L. A. O.; COELHO, C. D. P.; ABRANTES, C. V. M.; LISBOA, L. C. O. Abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância, riqueza e aspectos biológicos. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16 n. 2, p. 101-118, 1999.

PINTO, L. P.; BEDÊ, L.; PAESE, A.; FONSECA, M.; PAGLIA, A.; LAMAS, I. Mata Atlântica brasileira: Os desafios para conservação da biodiversidade de um *hotspot* mundial. In: ROCHA, C. F. D.; BERGALLO, H. G.; SLUYS, M. V.; ALVES, M. A. S. orgs. **Biologia da conservação: Essências**. São Carlos, Rima. p. 69-96, 2006.

POKORNY, T.; LOOSE, D.; DYKER, G.; QUEZADA-EUAN, J. J. G.; ELTZ, T. Dispersal ability of male orchid bees and direct evidence for long-range flights. **Apidologie**, v. 46, n. 2, p. 224-237, 2015.

POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W. E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.

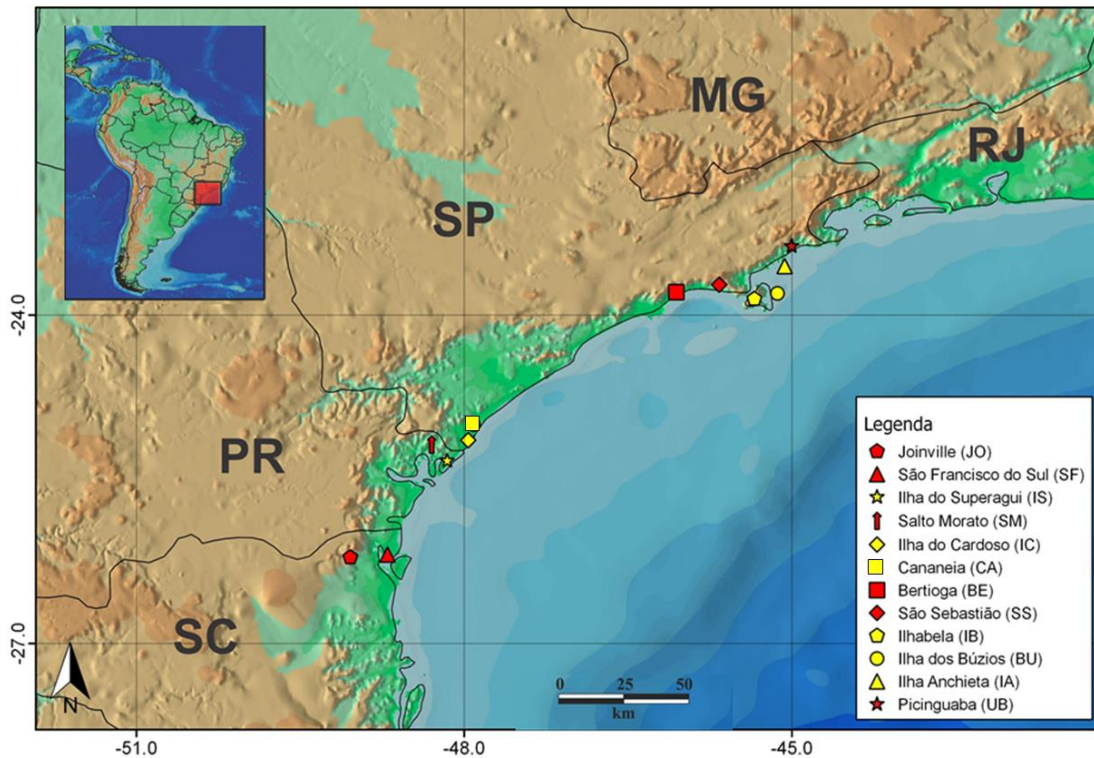
- POWELL, A. H.; POWELL, G. V. N. Population dynamics of male euglossine bees in Amazonian forest fragments. **Biotropica**, v. 19, p. 176-179, 1987.
- PRESTON, F. W. The canonical distribution of commonness and rarity: Part I. **Ecology**, v. 43, n. 2, p. 185-215, 1962.
- RAMALHO, A. V. **Comunidades de abelhas Euglossini (Hymenoptera; Apidae) em remanescentes de Mata Atlântica na bacia do Rio São João, RJ**. Dissertação de Mestrado: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, p. 69, 2006.
- RAMÍREZ, S.; DRESSLER, R. L.; OSPINA, M. Abejas euglossinas (Hymenoptera: Apidae) de la Región Neotropical: listado de especies con notas sobre su biología. **Biota Colombiana**, v. 3, n. 1, p. 7-118, 2002.
- RAMÍREZ, S. R.; ROUBIK, D. W.; SKOV, C.; PIERCE, N. E. Phylogeny, diversification patterns and historical biogeography of euglossine orchid bees (Hymenoptera: Apidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 100, n. 3, p. 552-572, 2010.
- REBÊLO, J. M. M. **História natural das euglossíneas: as abelhas das orquídeas**. São Luís, Lithograf Editora, p. 152, 2001.
- RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.
- ROCHA-FILHO, L. C., KRUG, C. SILVA, C. I.; GARÓFALO, C. A. Floral resources used by Euglossini bees (Hymenoptera: Apidae) in coastal ecosystems of the Atlantic Forest. **Psyche: A Journal of Entomology**, v. 2012, 2012.
- ROCHA-FILHO, L. C.; CERÂNTOLA, N. C. M.; GARÓFALO, C. A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; DEL LAMA, M. A. Genetic differentiation of the Euglossini (Hymenoptera, Apidae) populations on a mainland coastal plain and an island in southeastern Brazil. **Genética**, v. 141, n. 1-3, p. 65-74, 2013.
- ROUBIK, D. W.; HANSON, P. E. **Abejas de orquídeas de la América tropical: Biología y guía de campo**. Costa Rica, Editorial INBio, p. 203-269, 2004.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas Brasileiras: sistemática e identificação**. Fundação Araucária, Belo Horizonte, v. 253, 2002.
- SOFIA, S. H.; SUZUKI, K. M. Comunidades de machos de abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em fragmentos florestais no sul do Brasil. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 693-702, 2004.
- SOFIA, S. H.; PAULA, F. M. D.; SANTOS, A. M. D.; ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. Genetic structure analysis of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae) populations from southern Brazilian Atlantic rainforest remnants. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, p. 479-484, 2005.

- SORO, A.; QUEZADA-EUAN, J. J. G.; THEODOROU, P.; MORITZ, R. F.; PAXTON, R. J. The population genetics of two orchid bees suggests high dispersal, low diploid male production and only an effect of island isolation in lowering genetic diversity. **Conservation Genetics**, v. 18, n. 3, p. 607-619, 2017.
- SOUZA, R. O.; CERVINI M.; DEL LAMA M. A.; PAXTON, R. J. Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 6, p. 1352-1356, 2007.
- SUNI, S. S. Dispersal of the orchid bee *Euglossa imperialis* over degraded habitat and intact forest. **Conservation Genetics**, v. 18, n. 3, p. 621-630, 2017.
- SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 15, p. 199-203, 2000.
- SUZUKI, K. M.; ARIAS, M. C.; GIANGARELLI, D. C.; FREIRIA, G. A.; SOFIA, S. H. Mitochondrial DNA diversity of orchid bee *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera: Apidae) populations assessed by PCR-RFLP. **Biochemical Genetics**, v. 48, n. 3-4, p. 326-341, 2010.
- TONHASCA, Jr. A. **Ecologia e história natural da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro, Interciência, p. 137-148, 2005.
- WEBSTER, M. S.; REICHART, L. Use of microsatellites for parentage and kinship analyses in animals. **Methods in Enzymology**, v. 395, p. 222-238, 2005.
- WINFREE, R.; AGUILAR, R.; VÁZQUEZ, D. P.; LEBUHN, G.; AIZEN, M. A. A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. **Ecology**, v. 90, n. 8, p. 2068-2076, 2009.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, n. 2, p. 97, 1931.
- ZANELLA, F. C. V. The bees of the Caatinga (Hymenoptera, Apoidea, Apiformes): a species list and comparative notes regarding their distribution. **Apidologie**, v. 31, p. 579-592, 2000.
- ZIMMERMANN, Y.; SCHORKOPF, D. L. P.; MORITZ, R. F. A.; PEMBERTON, R. W.; QUEZADA-EUAN, J. J. G.; ELTZ, T. Population genetic structure of orchid bees (Euglossini) in anthropogenically altered landscapes. **Conservation Genetics**, v. 12, n. 5, p. 1183-1194, 2011.

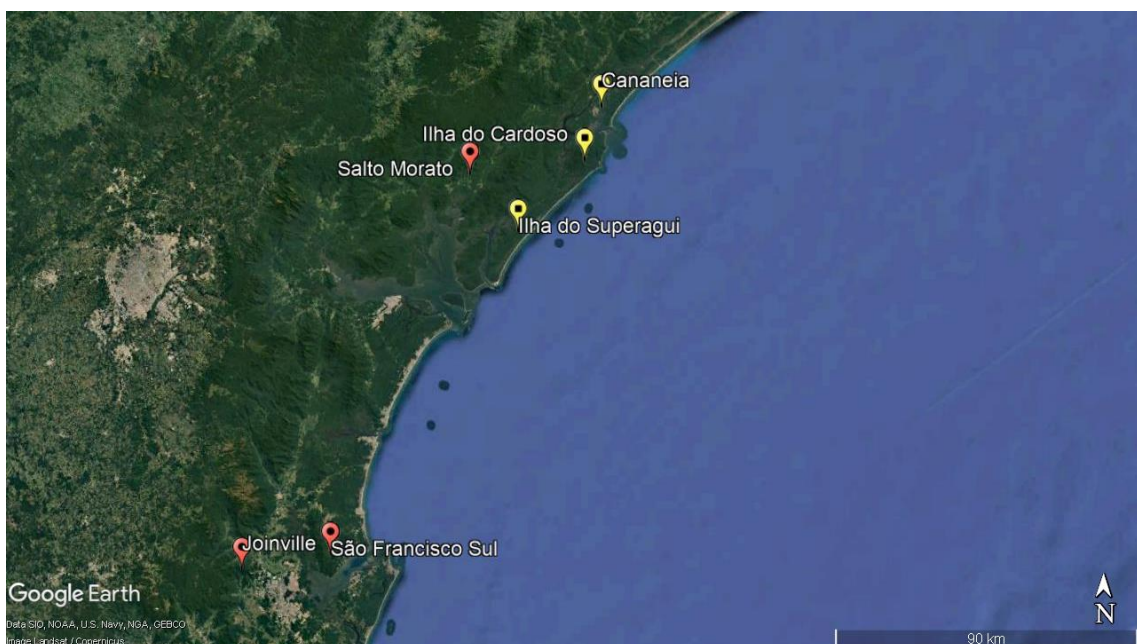
APÊNDICES

APÊNDICE A - MATERIAL SUPLEMENTAR DA SEÇÃO MATERIAL E MÉTODOS

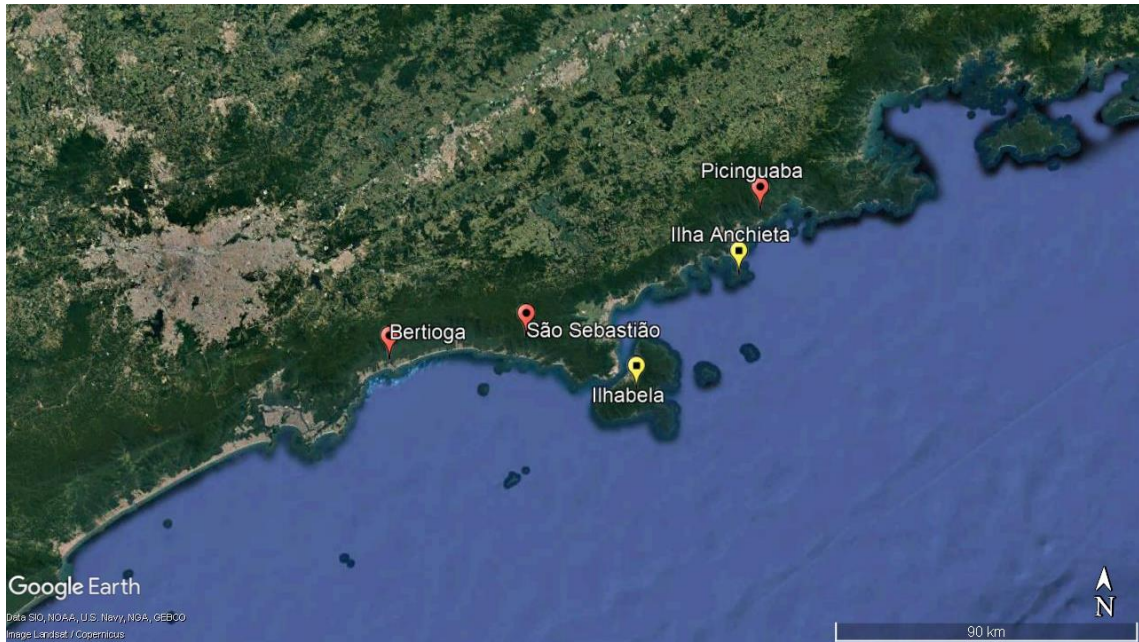
Apêndice A-1. Mapa mostrando a disposição dos pontos de coleta. Símbolos em amarelo representam as ilhas e símbolos em vermelho representam áreas continentais (Software QGIS 2.12).



Apêndice A-2. Imagem de satélite de Joinville, São Francisco do Sul, Ilha do Superagui, Salto Morato, Ilha do Cardoso e Cananeia (Fonte: Google Earth, 2019).



Apêndice A-3. Imagem de satélite de Bertioga, São Sebastião, Ilhabela, Ilha dos Búzios, Ilha Anchieta e Picinguaba (Fonte: Google Earth, 2019).



Apêndice A-4. Lista dos *primers* com suas sequências e a temperatura utilizada na amplificação (Temp.) para todas as amostras analisadas de *E. stelfeldi*.

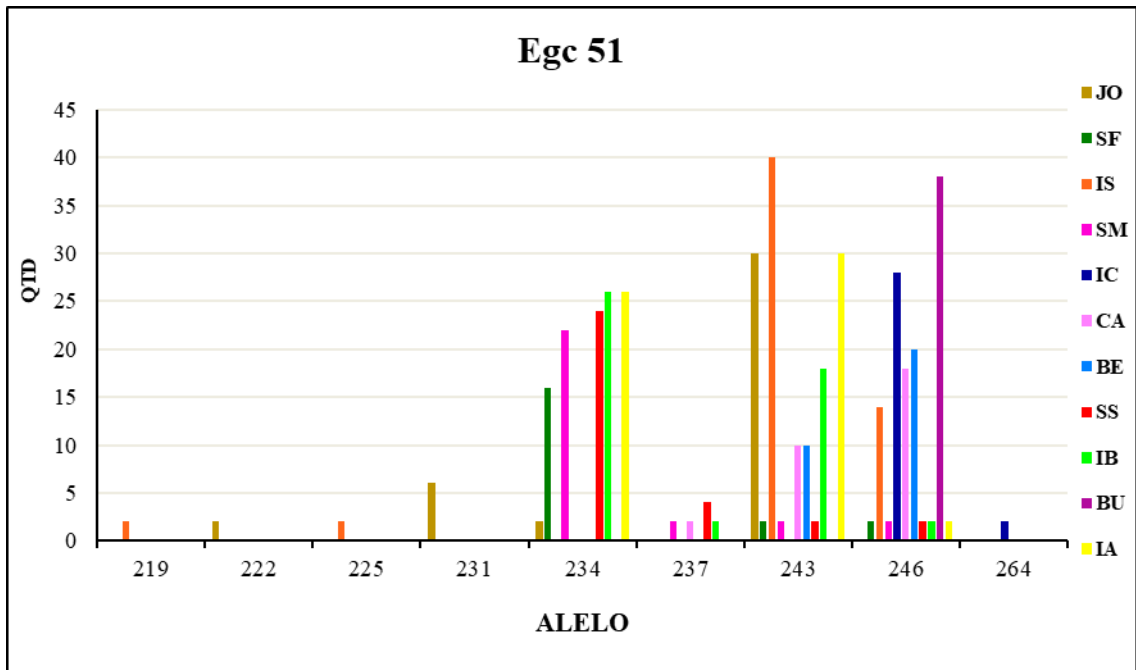
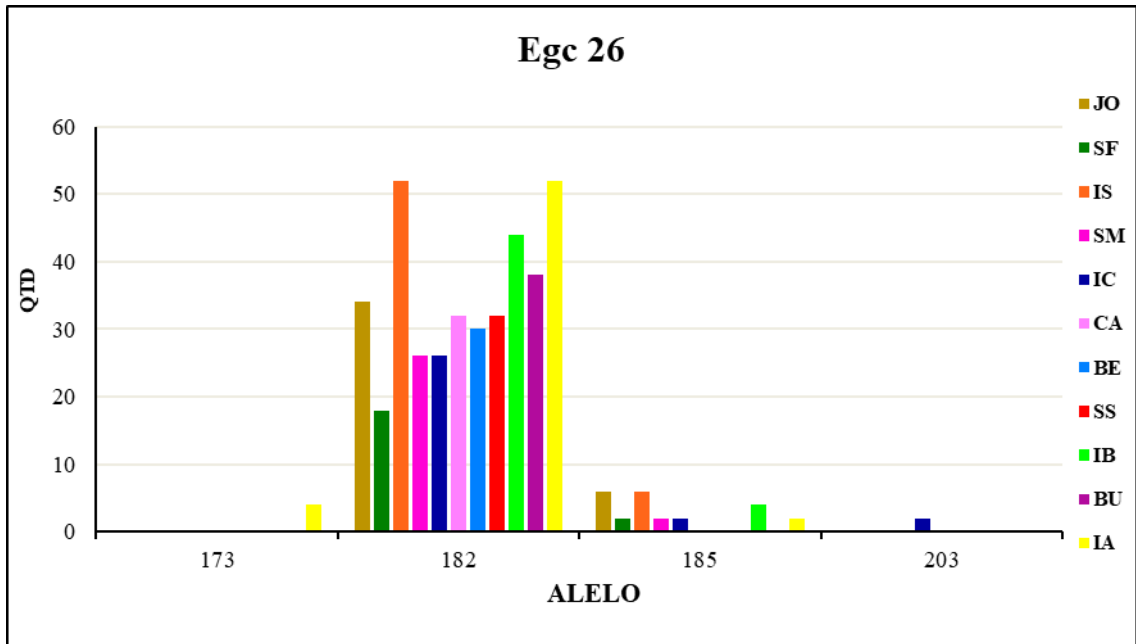
| Loco | Sequência (5'-3') | Temp. |
|---------------|--|-------|
| ann2 | F: ATTGCCTTGAACGTTTCCAC R: GCTAGACGCGCGTAATCTTC | 54°C |
| ann3 | F: GATCAGGAATCCCCAAAACG R: CATAATCGTGCAACGTTTCCTT | 54°C |
| ann6 | F: TCAAGCTCCTGTCTTCTTCCA R: GATTTCCCTCCCGGTTCC | 54°C |
| ann8 | F: TGGAAGATTAGGGCAACAGG R: GATTACGGGAACCGAGGTG | 54°C |
| ann24 | F: GTCGGACATTAGGGTGATGG R: TCCGTTTGAATCTGTGGTCTC | 54°C |
| ann37 | F: CGTTCGAAGGAGAGAACGAC R: CGGGATACAGGAAAGGAGAG | 60°C |
| ann41 | F: GGAGGAAACGAGGTGTATCG R: TCGCGTGATATCCTTTTTGA | 54°C |
| iop1 | F: TCTCCCGTAAAATGCTCTCG R: CCCGGTAGACGTTTGCTCG | 56°C |
| iop3 | F: CGCGAACATTGGAACGAATC R: CGCAGGCTCTTAGGAGGTAA | 48°C |
| Egc 26 | F: GCCGAACAAACATCTCGTCT R: CGGAAC TTTGATATCGTCGAG | 56°C |
| Egc 51 | F: GGAATGGGATTCATTCAGCA R: CGAAAGGTCGACAAACCAAT | 56°C |

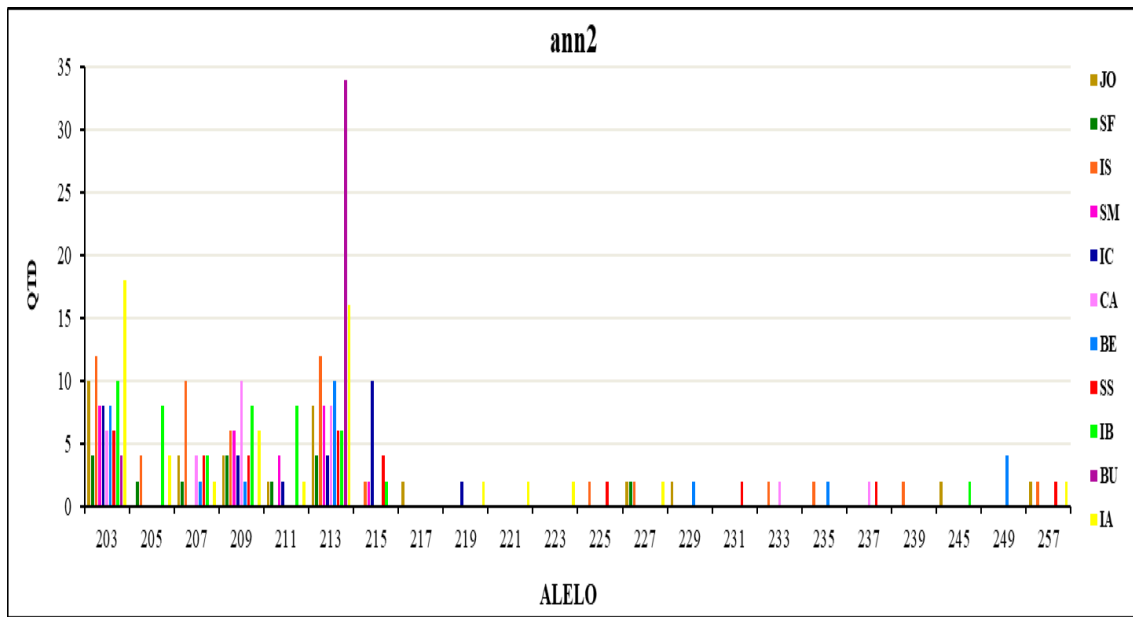
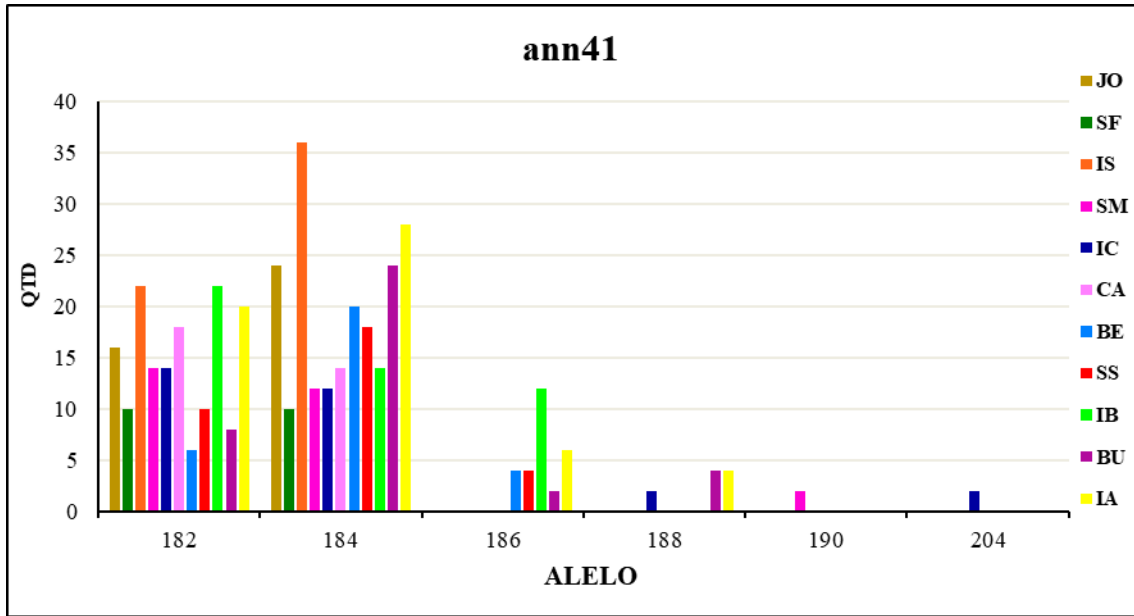
APÊNDICE B - MATERIAL SUPLEMENTAR DA SEÇÃO RESULTADOS

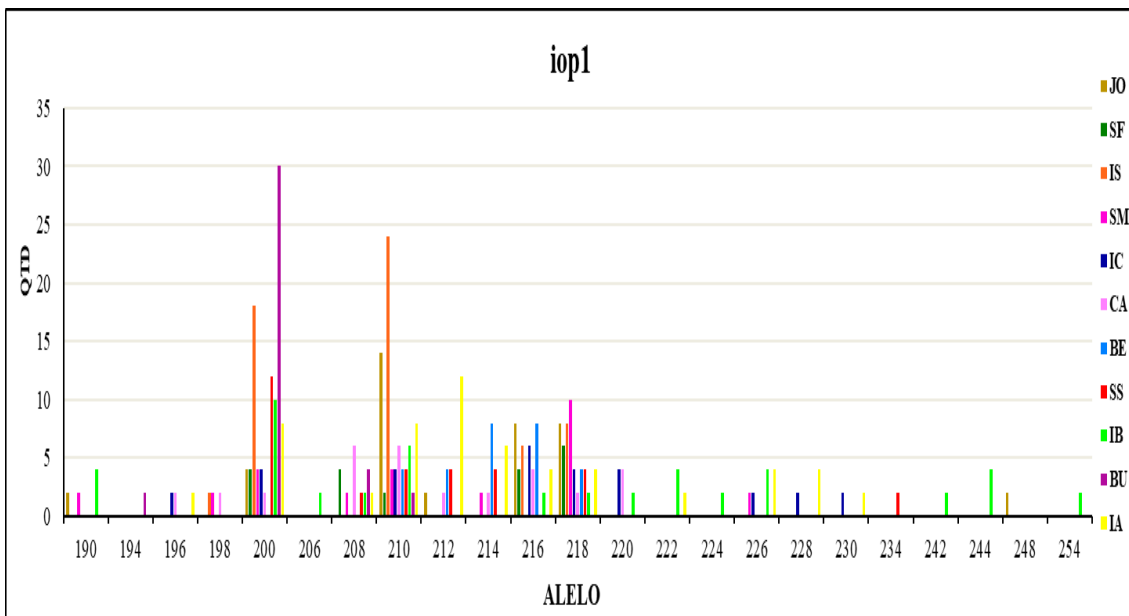
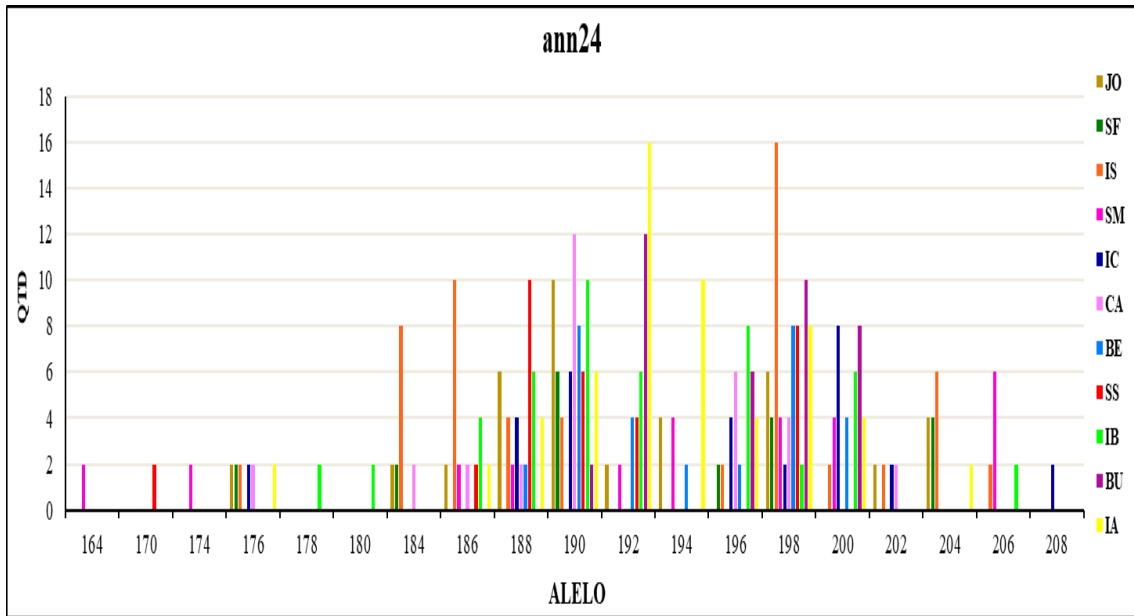
Apêndice B-1. Lista dos locos, número de alelos (N) e o tamanho dos fragmentos em pares de base observados para todas as amostras analisadas de *E. stelfeldi*.

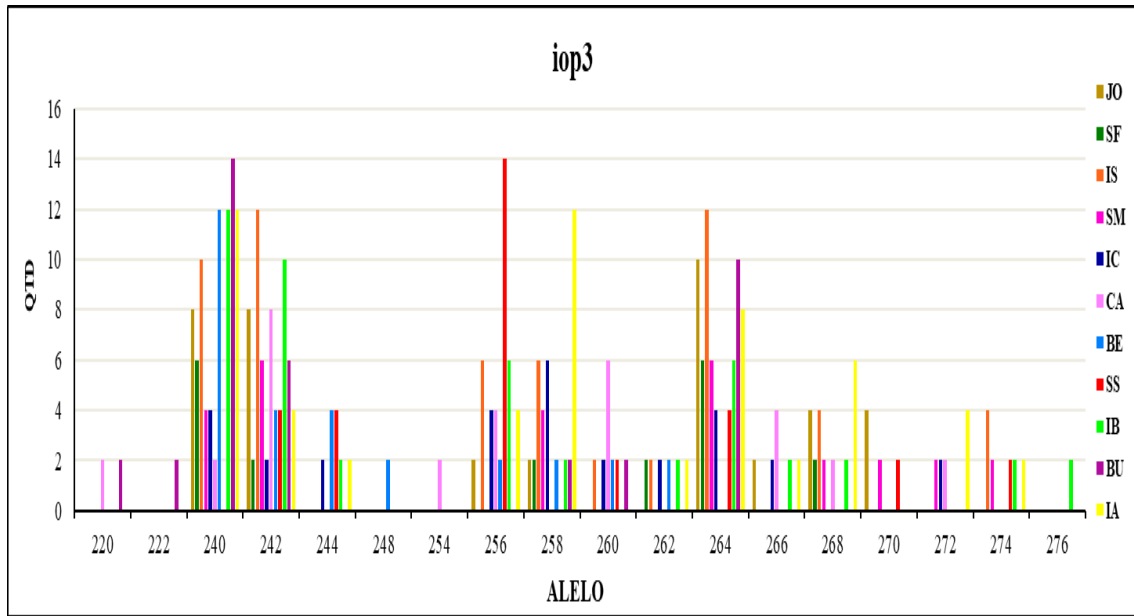
| Loco | N | Tamanho (pb) |
|---------------|----------|---------------------|
| ann2 | 22 | 203 - 257 |
| ann3 | 7 | 165 - 187 |
| ann6 | 11 | 149 - 181 |
| ann8 | 13 | 125 - 171 |
| ann24 | 19 | 164 - 208 |
| ann37 | 7 | 165 - 187 |
| ann41 | 6 | 182 - 204 |
| iop1 | 23 | 190 - 254 |
| iop3 | 18 | 220 - 276 |
| Egc 26 | 4 | 173 - 203 |
| Egc 51 | 9 | 219 - 264 |

Apêndice B-4. Frequências dos alelos de microssatélites de *E. stellfeldi* para os onze pontos estudados.









Apêndice B-3. Número de alelos encontrados por localidades para os locos de microssatélites de *E. stellfeldi* nos onze pontos estudados.

| Loco | JO | SF | IS | SM | IC | CA | BE | SS | IB | BU | IA |
|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| ann2 | 10 | 7 | 12 | 5 | 6 | 6 | 7 | 9 | 8 | 2 | 11 |
| ann3 | 6 | 4 | 6 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 4 | 4 | 5 |
| ann6 | 5 | 3 | 4 | 5 | 6 | 3 | 2 | 4 | 5 | 2 | 5 |
| ann8 | 8 | 2 | 7 | 4 | 5 | 4 | 4 | 5 | 6 | 4 | 5 |
| ann24 | 10 | 6 | 11 | 9 | 8 | 8 | 7 | 6 | 10 | 5 | 10 |
| ann37 | 4 | 4 | 4 | 5 | 5 | 4 | 4 | 5 | 6 | 2 | 5 |
| ann41 | 2 | 2 | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| iop1 | 7 | 5 | 5 | 8 | 9 | 10 | 5 | 7 | 14 | 4 | 12 |
| iop3 | 8 | 6 | 9 | 8 | 10 | 9 | 8 | 7 | 11 | 7 | 11 |
| Egc 26 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 3 |
| Egc 51 | 4 | 3 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 4 | 4 | 1 | 3 |
| TOTAL | 66 | 44 | 66 | 58 | 62 | 55 | 48 | 55 | 73 | 36 | 74 |

JO = Joinville; **SF** = São Francisco do Sul; **IS** = Ilha do Superagui; **SM** = Salto Morato; **IC** = Ilha do Cardoso; **CA** = Cananeia; **BE** = Bertioga; **SS** = São Sebastião; **IB** = Ilhabela; **BU** = Ilha dos Búzios; **IA** = Ilha Anchieta; **UB** = Pinguaba.

Apêndice B-4. Composições nucleotídicas para os genes *citb*, *COI*, matriz de dados concatenados e conteúdo A+T.

| Gene | A | C | G | T | A+T |
|------------------------|----------|----------|----------|----------|------------|
| <i>citb</i> | 35,08 | 10,24 | 8,93 | 45,75 | 80,83 |
| <i>COI</i> | 29,66 | 11,92 | 10,88 | 47,54 | 77,20 |
| <i>citb+COI</i> | 31,80 | 11,31 | 10,07 | 46,82 | 78,62 |