UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Determinação da variabilidade genético-morfológica em
populações de *Euglossa pleosticta* Dressler, 1982 (Apidae,
Euglossini)**

Marina Lopes Grassi Sella

RIBEIRÃO PRETO
2016

Marina Lopes Grassi Sella

**Determinação da variabilidade genético-morfológica em
populações de *Euglossa pleosticta* Dressler, 1982 (Apidae,
Euglossini)**

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Doutora em Ciências, área de
concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Tiago Maurício Franco

RIBEIRÃO PRETO

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

GRASSI-SELLA, MARINA LOPES

Determinação da variabilidade genético-morfológica em populações de *Euglossa pleosticta* Dressler, 1982 (Apidae, Euglossini). Ribeirão Preto, 2016.

136 p., Il, 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

Orientador: Prof. Dr. Tiago Maurício Franco

1. <i>Euglossa pleosticta</i>	2. Euglossini	3. Morfometria Geométrica	4. Assimetria
Flutuante	5. DNA Mitocondrial	6. Microsatélite de DNA	

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARINA LOPES GRASSI SELLA

Determinação da variabilidade genético-morfológica em populações de *Euglossa pleosticta* Dressler, 1982 (Apidae, Euglossini)

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutora em Ciências,
área de concentração: Genética

Aprovado em/...../.....

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Ao meu melhor amigo,
Meu parceiro para todos os momentos,
Meu porto seguro,
Companheiro de todas as horas,
Meu AMOR,
Meu marido,
Emílio,*

*Minha pequena flor,
Melhor de mim,
AMOR sem limites,
Minha filha,
Ana Júlia,*

DEDICO.

Agradeço,

♥ À **Deus** por me conceder vida, saúde e força para aproveitar as oportunidades colocadas em meu caminho;

♥ Ao querido amigo e orientador **Prof. Dr. Tiago Maurício Franco**, pela oportunidade e confiança no desenvolvimento deste trabalho, pelo suporte, pela orientação e por todos os ensinamentos compartilhados ao longo destes anos. Serei sempre muito grata!!!

♥ Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Garófalo**, pelas abelhas cedidas para o desenvolvimento deste trabalho, pela amizade, pelos sábios conselhos e agradáveis conversas. Por compartilhar sua sabedoria com tanta humildade, muito obrigada!

♥ À querida **Profª. Drª. Maria Cristina Arias**, pelos ensinamentos, pelas conversas, pelos conselhos, pela orientação tão gentilmente prestada no período em que me recebeu em seu laboratório para o desenvolvimento de parte dos meus experimentos. Você é uma inspiração!

♥ À **Profª. Drª. Zilá Luz Paulino Simões** e à **Profª. Drª. Márcia Bitondi**, por tão prontamente abrirem as portas do seu laboratório e permitirem o desenvolvimento de parte dos meus experimentos, além das contribuições científicas e agradável convivência. Obrigada!

♥ **Prof. Dr. Robin F. A. Moritz**, thanks for all your support, teachings and specially for accepting me in your team in Halle (Germany).

♥ **Prof. Dr. Robert J. Paxton** and **Drª. Antonella Soro**, thanks for the good time and all your support during the development of my research in Halle (Germany).

♥ Ao **Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares** pela amizade, atenção e pelo excelente trabalho desempenhado durante a coordenação do Departamento de Genética;

♥ Ao **Prof. Dr. David De Jong**, pela colaboração, pela amizade e agradável convivência durante esses anos;

♥ À **Profª. Drª. Ester Silveira Ramos** e ao **Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Junior**, coordenadores do Curso de Pós-Graduação em Genética, pelos auxílios prestados sempre que necessário;

♥ À amiga **Profª Drª Michelle Manfrini Morais** pelos preciosos conselhos e carinho dedicado;

♥ Ao técnico e amigo **Jairo de Souza**, pelo auxílio prestado em todas as ocasiões, parceria nas coletas e principalmente pela amizade durante todos esses anos.

♥ À **Vera Lúcia Figueiredo (Verusca)** pelo carinho e amizade sempre dedicados, e pelos auxílios prestados durante meu trabalho;

♥ Dear **Petra Leibe** and **Rositta Mothes**, thanks for the friendship and all support in everything during my time in Halle! You are the best!!! (Germany).

♥ As secretarias do Programa de pós-graduação em Genética, **Susie** e **Silvia**, por todo auxílio, esclarecimentos, pela paciência despendida e pela amizade. Vocês são muito especiais!

♥ A secretaria do Programa de pós-graduação em Entomologia, **Renata (Renas)** pela amizade, e por toda a eficiência de sempre, mesmo estando em outro departamento;

♥ **Alexis Beaurepaire**, thanks for all support and teachings regarding microsatellites. (Germany).

♥ Dear colleagues: **Silvio Erler**, **Anja Buttstedt**, **Antje Jarosch**, **Denise Kleber**, **Holger Scharpenberg**, **Jonathan Henry Kidner**, **Christoph Kurze**, **Nadege Forfert**, **Sophie Helbing**, **Rebecca Schwarz**, **Thereza**, **Patricia Lavadaverde** and **Myrsini Eirini**, thanks for all support and good time in Halle! (Germany).

♥ Aos amigos **Samuel Boff** e **Anna Friedel**, pela amizade, pela recepção em Halle e todo apoio despendido, vielen danke! (Germany).

♥ As minhas queridas amigas que ganhei durante estes anos de doutorado **Vanis**, **Clau** e **Carol**, muito obrigada por todos os ensinamentos, pela paciência no meu início na bancada (rs), pela divertidíssima convivência, pela sincera amizade e por estarem sempre prontas a ajudar, amparar e aprontar...rs! Vocês são muito especiais!!!

♥ As minhas queridas “velhas” amigas **Daiana (Piri)** e **Cly**, obrigada por tão sincera amizade, pelos conselhos, pelas risadas, por estarem sempre prontas para ajudar e por fazerem do lab um lugar ainda mais especial.

♥ Aos colegas do **Apilab**, **Elisa**, **Jack**, **Joyce**, **Pati**, **Pri**, **Aline**, **Jú** e **Rô**, muito obrigada pela ótima convivência, aprendizado e amizade!

♥ As queridas colegas do **LGEA**, **Pri**, **Elaine**, **Nefer** e **Susi**, pelos ensinamentos, conversas, risadas, temakis. Foi maravilhoso o tempo passado na companhia de vocês!

♥ Ao meu amado marido (**Mi**), pela participação ativa no desenvolvimento deste trabalho, pelo interesse, pela paciência, pelas dicas e auxílios, por encarar as grandes mudanças em prol do meu desenvolvimento. Esta vitória é tão minha quanto sua...te amo!

♥ A minha querida irmã (**Mari**), por todo o carinho, conversas, conselhos, ensinamentos, incentivos, ajuda e por participar tão prontamente na conclusão desta etapa. Muito obrigada, te amo sempre!

♥ Aos meus Pais, **Marilena e Jonas** por me darem todo o respaldo para chegar até aqui. Serei sempre grata, amo vocês!

♥ Aos meus queridos sogros **Valdir e Irani**, por todo o incentivo, conselhos e carinho. Amo vocês!!!

♥ Aos meus queridos cunhadinhos (cuk's) **Lis, Paulinho e Cezar** pelo carinho e incentivo. Obrigada por fazerem parte da minha vida!!!

♥ A **Tia Santana e Vó Isaura**, por todo carinho e dedicação, e também pela torcida no desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Vocês são muito importantes para mim, amo vocês!

♥ Aos meus **Tios e Primos**, por sempre quererem saber um pouquinho sobre as abelhinhas, por estarem sempre torcendo e incentivando o meu trabalho. Amo todos vocês!!!

♥ A todos os meus queridos **amigos**, que de alguma forma participaram deste trabalho, seja com dicas, torcida, interesse, muito obrigada!

♥ À **CAPES e FAPESP**, pelo suporte financeiro;

♥ Ao programa **PDSE** pelo suporte financeiro e pela oportunidade de desenvolver o estágio sanduiche na Martin Luther Universität, Halle –Saale (Alemanha);

♥ Ao **Departamento de Genética** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Meu sincero muito obrigada!

“Eu tentei 99 vezes e falhei. Mas na centésima tentativa eu consegui. Nunca desista de seus objetivos, mesmo que eles pareçam impossíveis. A próxima tentativa pode ser a vitoriosa”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	XII
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	XIII
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 TRIBO EUGLOSSINI	19
1.2 TÉCNICAS MORFOMÉTRICAS.....	25
1.2.1 Morfometria Geométrica	25
1.2.2 Assimetria Flutuante.....	27
1.3 MARCADORES MOLECULARES	29
1.3.1 Microssatélites.....	29
1.3.2 DNA Mitocondrial	31
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS ÁREAS AMOSTRADAS.....	38
3.1.1 Características específicas das áreas amostradas.....	40
3.2 MATERIAL BIOLÓGICO.....	42
3.3 MORFOMETRIA	43
3.3.1 Preparação das asas.....	43
3.3.2 Preparação dos dados	44
3.3.3 Análises estatísticas.....	45
3.3.3.1 Morfometria Geométrica	45
3.3.3.2 Assimetria Flutuante	48
3.4 ANÁLISES MOLECULARES.....	49
3.4.1 Extração do DNA.....	49
3.4.2 DNA Mitocondrial	49
3.4.2.1 Sequenciamento do DNA mitocondrial.....	50
3.4.2.2 Análises estatísticas do DNA mitocondrial	51
3.4.3 Microsatélite	51

3.4.3.1	<i>Análise estatística dos Microssatélites</i>	53
4	RESULTADOS	56
4.1	MORFOMETRIA GEOMÉTRICA	56
4.2	ASSIMETRIA FLUTUANTE	69
4.3	DNA MITOCONDRIAL	72
4.4	MICROSSATÉLITES	78
5	DISCUSSÃO	83
6	CONCLUSÃO	97
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
8	ANEXO	118

LISTA DE ABREVIATURAS

AD: Assimetria Direcional

AF: Assimetria Flutuante

citB: citocromo B

COI: Citocromo oxidase I

CVA: Análise de Variáveis Canônicas

DFA: Análise da Função Discriminante

DNAmt: DNA Mitocondrial

DNA_n: DNA nuclear

E. annectans: *Euglossa annectans*

E. pleosticta: *Euglossa pleosticta*

h: Número de haplótipos

H_d: Diversidade gênica nas análises de microssatélite

H_d: Diversidade haplotípica nas análises de DNA Mitocondrial

H_e: Heterozigosidade esperada

K: Número médio de diferenças nucleotídicas nas análises de DNA Mitocondrial

MAT: Mata da Virgínia (Matão)

MS: Média quadrada

PCA: Análise de Componente Principal

PIC: Conteúdo de informação polimórfica

S: Número de sítios polimórficos

UBA: Ubatuba

VAS: Parque Estadual do Vassununga (Santa Rita do Passa Quatro)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS:

Figura 1. Foto dos representantes dos cinco gêneros das abelhas da tribo Euglossini...	21
Figura 2. Mapa do genoma mitocondrial de <i>A. mellifera</i>	32
Figura 3. Mapa ilustrativo dos locais de coleta das abelhas <i>Euglossa pleosticta</i> , e informações quanto à distância entre as localidades e o bioma.....	43
Figura 4. Asa anterior direita de <i>Euglossa truncata</i> com os 18 marcos anatômicos plotados nas intersecções das veias.....	45
Figura 5. Padronização e alinhamento das asas de <i>Drosophila sp</i> a partir dos marcos anatômicos.....	46
Figura 6. Configuração consenso dos 18 marcos anatômicos marcados nas intersecções das nervuras das asas dos machos de <i>Euglossa pleosticta</i>	57
Figura 7. Grades de deformação (Thin-plate spline) que ilustram as mudanças ocorridas nas asas em relação a sua forma para a espécie <i>Euglossa pleosticta</i> , baseado do Componente Principal 1 (PC1) e 2 (PC2).....	54
Figura 8. Representação gráfica da porcentagem da variância das 32 medidas de deformações relativas dos Componentes Principais.....	59
Figura 9. Representação gráfica da Análise de Componente Principal das populações de abelhas da espécie <i>Euglossa pleosticta</i> , obtida a partir das análises dos 18 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas.	60
Figura 10. Dendograma de proximidade morfológica, construído a partir das distâncias de Mahalanobis (A) e Procrustes (B) pelo método de Neighbor-Joining, para as amostras de <i>Euglossa pleosticta</i>	62
Figura 11. Representação gráfica de Variável Canônica das populações de abelhas da espécie <i>Euglossa pleosticta</i> , obtida a partir das análises dos 18 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas.	63
Figura 12. Discriminação par a par dos grupos estudados pela Análise de Função Discriminante e pela Validação Cruzada dos dados com as taxas de acerto na identificação.....	64
Figura 13. Representação gráfica da Análise de Componente Principal das populações de abelhas das espécies <i>Euglossa pleosticta</i> e <i>Euglossa annectans (anne)</i> , obtida a partir das análises dos 18 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas....	66
Figura 14. Dendograma de proximidade morfológica, construído a partir das distâncias de Mahalanobis (A) e Procrustes (B) pelo método de Neighbor-Joining, para as amostras de <i>Euglossa pleosticta</i> e de <i>Euglossa annectans (anne)</i>	68
Figura 15. Representação gráfica de Variável Canônica das populações de abelhas das espécies <i>Euglossa pleosticta</i> e <i>Euglossa annectans (anne)</i> , obtida a partir das análises dos 18 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas.	69
Figura 16. Rede de haplótipos para o gene citB da espécie <i>E. pleosticta</i>	74

Figura 17. Dendograma de proximidade genética, construído a partir das sequências do gene citB pelo método de Neighbor-Joining, para as amostras de <i>Euglossa pleosticta</i> das localidades de: Matão (MAT), Santa Rita do Passa Quatro (VAS) e Ubatuba (UBA).....	74
Figura 18. Dendograma de proximidade genética, construído a partir dos dados de percentual de divergência nucleotídica pelo método de Neighbor-Joining, para as amostras de <i>Euglossa pleosticta</i>	76
Figura 19. Estimativa do melhor K (número de unidades populacionais) pela estatística DeltaK calculada com auxílio do software STRUCTURE Harvester (Earl, 2012).	81
Figura 20. Número de unidades populacionais (K=2) propostas pelo software STRUCTURE (versão 2.3.4) (Hubisz et al., 2009) para as amostras de <i>E. pleosticta</i> das três localidades estudadas.	81

TABELAS:

Tabela 1. Informações sobre os locais de coleta das amostras de <i>Euglossa pleosticta</i> e tamanho amostral.	42
Tabela 2. Informações sobre os oligos iniciadores (primers) utilizados nas análises de DNA mitocondrial.	50
Tabela 3. Informações sobre os oligos iniciadores (primers) utilizados nas análises de microssatélite.	52
Tabela 4. Variação relativa de cada marco anatômico.	57
Tabela 5. Variação dos dois eixos das Variáveis Canônicas.	61
Tabela 6. Distâncias de Mahalanobis (parte inferior) e Procrustes (parte superior), geradas a partir da Análise de Variável Canônica, para as amostras da espécie de <i>Euglossa pleosticta</i>	61
Tabela 7. Distâncias de Mahalanobis (parte inferior) e Procrustes (parte superior), geradas a partir da Análise de Função Discriminante, para as amostras da espécie de <i>Euglossa pleosticta</i>	65
Tabela 8. Distâncias de Mahalanobis (parte inferior) e Procrustes (parte superior), geradas a partir da Análise de Variável Canônica, para as amostras da espécie de <i>Euglossa pleosticta</i> e de <i>Euglossa annectans (anne)</i>	67
Tabela 9. Procrustes ANOVA das coordenadas de forma e tamanho do centróide das asas anteriores de indivíduos de <i>Euglossa pleosticta</i> coletados nas cidades de Matão (MAT), Ubatuba (UBA) e Santa Rita do Passa Quatro (VAS).	71
Tabela 10. Valores referentes à Variação alométrica encontrada para a variação individual e assimetria flutuante (AF) nas três localidades estudadas. (MAT: Matão; UBA: Ubatuba; VAS: Santa Rita do Passa Quatro).	72
Tabela 11. Diversidade genética das localidades de <i>E. pleosticta</i> para os haplótipos do gene mitocondrial citB.	73

Tabela 12. Haplótipos e seus respectivos sítios variáveis. Números diagonais no topo da tabela correspondem à posição em pb dos sítios polimórficos dentro do fragmento do gene <i>citB</i>	73
Tabela 13. Percentual de divergência nucleotídica baseada no modelo Tamura 3-parametros (T92), calculado entre os pares de haplótipos.	75
Tabela 14. Valores de <i>F_{st}</i> calculados (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre os pares de amostras de <i>E. pleosticta</i> estudadas. (MAT: Matão; UBA: Ubatuba e VAS: Santa Rita do Passa Quatro).	77
Tabela 15. Análise hierárquica de Variância Molecular (AMOVA) baseada nas sequências nucleotídicas de <i>citB</i> em <i>E. pleosticta</i>	78
Tabela 16. Parametros estimados para as diferentes localidades de coleta de <i>E. pleosticta</i> , quanto ao número de alelos (<i>A</i>), diversidade gênica (<i>H_d</i>), heterozigosidade esperada (<i>H_e</i>), e o conteúdo de informação polimórfica (<i>PIC</i>).	79
Tabela 17. Valores de <i>F_{st}</i> (diagonal inferior) e <i>p</i> (diagonal superior) calculados pelo FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001) por par de amostras para as três localidades de coleta de <i>E. pleosticta</i> . (MAT: Matão; UBA: Ubatuba e VAS: Santa Rita do Passa Quatro).	79
Tabela 18: Análise de dados de microssatélite realizada pelo método proposto por Evanno <i>et al.</i> (2005) para amostras de três localidades de <i>E. pleosticta</i>	81

RESUMO

Grassi-Sella, M. L. Determinação da variabilidade genético-morfológica em populações de *Euglossa pleosticta* Dressler, 1982 (Apidae, Euglossini). 2016. Tese – Faculdade de Medicina, Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

As abelhas da tribo Euglossini, possuem elevada representatividade nas florestas tropicais (25% da comunidade apícola existente) distribuindo-se do sul dos EUA ao centro da Argentina, sendo restritas à região Neotropical. A espécie *Euglossa pleosticta*, com ocorrência relatada exclusivamente no território brasileiro, possui hábito de vida solitário e costuma estar presente em levantamentos realizados em remanescentes da Mata Atlântica. Pouco se sabe sobre sua estrutura populacional e os efeitos da fragmentação florestal sobre as mesmas. Sendo assim, a realização de um estudo populacional para esta espécie é algo relevante, uma vez que colabora para a compreensão dos efeitos da fragmentação florestal na variabilidade genética do grupo, sendo objetivo deste trabalho, caracterizar a variabilidade genética e morfológica desta espécie, utilizando ferramentas morfológicas (Morfometria Geométrica de asas e Assimetria Flutuante), e moleculares (DNA microssatélite e DNA mitocondriais). Sendo assim, trabalhamos com 293 amostras de *E. pleosticta* coletadas em três fragmentos de mata no Estado de São Paulo. Para as análises morfológicas, foram marcados 18 marcos anatômicos nas intersecções das nervuras das asas anterior direita de cada abelha. Nas análises de microssatélite, trabalhamos com oito loci heterólogos e para realizarmos as análises de DNA mitocondrial, analisamos 20 abelhas por localidade, amplificando segmentos do Citocromo B. Nas análises de Morfometria Geométrica e Microssatélites de DNA, as localidades estudadas formaram dois grupos, os quais corroboraram quanto às características de fitofisionomia, clima, altitude e distância geográfica compartilhadas entre as localidades. Nossos dados sugerem a presença de ecotipos localmente adaptados, o que pode ser explicado em função da plasticidade fenotípica, a qual é muito comum em insetos que vivem em ambientes variados. Na análise de Assimetria Flutuante, observamos valores significativos de assimetria flutuante e assimetria direcional para as três localidades estudadas. Já na análise de DNA mitocondrial, encontramos nove haplótipos, com diversidade nucleotídica ($\pi = 0,01636$) e diversidade haplotípica ($Hd = 0,777$), sendo apenas um destes haplótipos compartilhado (H2). O teste de F_{st} par a par indicou estruturação genética populacional, e na AMOVA a maior taxa de variação observada foi quando consideramos a estruturação de um único grupo com variação interpopulacional (61,9%). Os testes de Mantel realizados tanto para distância genética quanto para distância morfológica, não apresentaram correlação quando relacionadas com distância geográfica. A falta de concordância entre os marcadores moleculares, é algo que já foi relatado em outros trabalhos e pode ser explicado em função da diferente taxa de evolução dos mesmos, uma vez que o marcador mitocondrial é mais conservado quando comparado com o de microssatélite. Em conjunto, estes marcadores apontam para a formação de subpopulações localmente adaptadas (ecotipos) para a espécie de *E. pleosticta*, provavelmente em decorrência dos processos recentes de fragmentação de habitat.

Palavras-chave: *Euglossa pleosticta*, Euglossini, Morfometria geométrica, Assimetria Flutuante, DNA Mitocondrial, Microssatélite

ABSTRACT

Grassi-Sella, M.L. **Determination of genetic-morphologic variability in population of *Euglossa pleosticta* Dressler, 1982 (Apidae, Euglossini)** 2016. Tese – Faculdade de Medicina, Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

The bees from Euglossini tribe have high representativeness in tropical forests (25% of existing bee community) and are distributed from the south of USA to the center of Argentina, being restricted to Neotropical region. The *Euglossa pleosticta* species, with occurrence reported exclusively in the Brazilian territory, has solitary behaviour and, according to some researches, use to be present in Atlantic forest remnants. Little is known about its population structure and the forest fragments effects over them. Therefore, the realization of a population study of this species is relevant, since it contributes to the comprehension of the forest fragmentation effects in the genetic variability of this group. The ultimate goal of this research was to characterize the genetic and morphological variability of this species, using morphological tools (Geometric Morphometrics of forewings and Fluctuation Asymmetry) and molecular tools (Microsatellite DNA and Mitochondrial DNA). Thus, we have worked with 293 samples of *E. pleosticta*, which were collected from three forest fragments in São Paulo state. For the morphological analyses, 18 landmarks were plotted in the vein intersections of the right forewing of each bee. On the Microsatellite DNA analysis, we have worked with eight heterologous loci and on the Mitochondrial DNA analysis, we amplified the Cytochrome B segments to 20 bees per locality. In the Geometric Morphometry and DNA Microsatellites analyzes, two groups were formed from the studied localities, which corroborated to the characteristics of phytophysiognomy, climate, altitude and geographic distance shared between the localities. Our data suggest the presence of locally adapted ecotypes, which can be explained by phenotypic plasticity, which is very common in insects living in different environments. In the Fluctuation Asymmetry analysis, we observed significant values of Fluctuation and Directional Asymmetry for all studied localities. In the mitochondrial DNA analysis, we found nine haplotypes with nucleotide diversity ($\pi = 0.01636$) and haplotypic diversity ($H_d = 0.777$), where only one was shared (H2). The Fst pairwise test indicated population genetic structuring and, in AMOVA, the highest rate of variation was observed when we considered the structuring of a single group with interpopulation variation (61.9%). The Mantel test performed for both genetic and morphological distances, did not present correlation when related to geographic distance. The disagreement between the molecular markers has already been reported in other studies and can be explained by the different rate of evolution of these markers, since the mitochondrial marker is more conserved when compared to the microsatellite. Together, these markers indicate the formation of locally adapted subpopulations (ecotypes) for the species *E. pleosticta*, probably due to the recent cases of habitat fragmentation.

Key words: *Euglossa pleosticta*, Euglossini, Geometric Morphometry, Fluctuation Asymmetry, Mitochondrial DNA, Microsatellite DNA

Introdução

1 Introdução

1.1 Tribo Euglossini

Dentre as mais de 20.000 espécies de abelha descritas atualmente (Michener, 2000), a tribo Euglossini apresenta elevada representatividade nas florestas tropicais, compondo até 25% da comunidade apícola existente nestes locais (Roubik & Hanson, 2004). Por possuírem tegumento metálico, língua extremamente longa e sociabilidade pouco desenvolvida (uma vez que a maioria das espécies apresenta hábito de nidificação solitário), formam um grupo distinto e homogêneo entre as abelhas corbiculadas (Van der Pijl & Dodson, 1966; Garofálo, 1985; Garofálo, 1994; Garofálo *et al.*, 1998). Com mais de 240 espécies descritas (Moure, *et al.*, 2012), esta tribo é formada por cinco gêneros, de acordo com Kimsey (1987), sendo três de vida livre (*Euglossa* Latreille, 1802; *Eufriesea* Cockerell, 1908; *Eulaema* Lepeletier, 1841) e dois cleptoparasitas (*Aglae* Lepeletier & Serville, 1825 e *Exaerete* Hoffmannsegg, 1817) (Figura 1).

O gênero *Euglossa*, é o gênero mais rico em número de espécies, sendo formado pelas menores e mais coloridas abelhas da tribo. Estas possuem tegumento metálico, que variam entre tons de verdes e azuis brilhantes a violetas e acobreadas. Também possuem a língua de comprimento caracteristicamente maior que o dobro tamanho corporal, em especial no subgênero *Glossura* Cockerell, 1917 ou ainda abelhas com língua menor que metade do corpo, em especial no subgênero *Euglossa s. str.* (Moure, 1944; Dressler, 1982). O segundo maior grupo em número de espécies é o gênero *Eufriesea*, embora seja o menos conhecido (Cameron, 2004). Os machos desse gênero

apresentam coloração verde metálica ou face azulada e em geral tamanho corporal entre 13-27 mm (Kimsey, 1982). O gênero *Eulaema* inclui as maiores espécies dentre as Euglossini (Moure, 2000) e é representado por abelhas conspícuas, em geral peludas e de grande porte, de 18-31 mm, muitas delas comuns e de ampla distribuição geográfica. As abelhas dos gêneros *Aglae* e *Exaerete* abrangem, respectivamente, uma e seis espécies, que são dependentes de *Eulaema nigrita* Lepeletier, 1841, e de *Eufriesea* spp. e *Eulaema* spp., respectivamente (Myers, 1935; Myers & Loveless, 1976; Kimsey, 1982; Garófalo & Rozen, 2001), para construção de células e ovoposição (Michener, 1990). Muito pouco é conhecido sobre a biologia dessas espécies, incluindo a relação parasita-hospedeiro e o comportamento reprodutivo (Garófalo & Rozen, 2001). *Aglae* apresenta distribuição restrita à floresta Amazônica entre Brasil, Bolívia, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Colômbia, Venezuela e Suriname (Dressler, 1982; Kimsey, 1987; Ramírez *et al.*, 2002; Otero & Sandino, 2003; Cameron, 2004). Sua única representante, a espécie *Aglae caerulea* Lepeletier & Serville, 1825, de tamanho corporal entre 20-28 mm (Willians & Dodson, 1972; Dressler, 1982, Kimsey, 1987). O outro gênero, *Exaerete*, cleoptoparasita é representado por abelhas de coloração verde, azul-esverdeada, ou azul cintilante, e tamanho corporal entre 18-28 mm.

Figura 1. Foto dos representantes dos cinco gêneros das abelhas da tribo Euglossini. (A) *Euglossa* sp. Foto: Margarita M. López-Urbe; (B) *Eufriesea* sp. Foto: Margarita M. López-Urbe; (C) *Eulaema* sp. Foto: Barbara Strnadova. (D) *Aglae caerulea*. Foto: S. Ramirez. (E) *Exaerete* sp. Foto: Margarita M. López-Urbe.

Estas abelhas, são responsáveis pela polinização exclusiva de aproximadamente 700 espécies de orquídeas Neotropicais (Ramirez *et al.* 2002; Oliveira & Nemésio, 2003; Roubik & Hanson 2004; Oliveira, 2006) e, devido a essa estreita relação com as plantas da família Orchidaceae, são popularmente conhecidas como “abelhas das orquídeas”. No entanto, não se restringem apenas a polinização de espécies desta única família, respondendo pela polinização de outras famílias vegetais como: Araceae (Williams & Dressler, 1976); Euphorbiaceae (Armbruster & Webster, 1979); Haemodoraceae (Buchmann, 1980); Apocynaceae, Loganiaceae, e Malvaceae (Ackerman, 1983); Solanaceae (Soares *et al.*, 1989); Pentaphylacaceae (Melo, 1995); Lecythidaceae (Knudsen & Mod, 1996); Clusiaceae (Nogueira *et al.*, 1998); Bromeliaceae (Siqueira-Filho, & Machado, 2008), Annonaceae (Teichert, *et al.* 2009), e Plantaginaceae (Cappellari *et al.*, 2009). Este importante trabalho desempenhado pelas abelhas Euglossini nas florestas tropicais, através da polinização, colabora diretamente para a conservação de grande variedade de espécies vegetais, o que confere elevada

importância ecológica (Roubik, *et al.*, 2004) e econômica ao grupo, uma vez que algumas das espécies polinizadas, cuja reprodução é completamente dependente destes insetos, são de interesse econômico (Dressler, 1968, 1982; Kroodsma, 1975; Torezan-Siltngardi & Del Claro, 1998).

A distribuição geográfica da tribo é restrita à região Neotropical (Dressler, 1982), ocorrendo entre os paralelos 29 °N e 32 °S, estendendo-se do Sul dos EUA ao centro da Argentina (Búrquez, 1997). São encontradas, principalmente, em terras baixas e florestas úmidas (Moure, 1967; Dressler, 1982), em regiões com baixas altitudes e latitudes (Roubik & Hanson, 2004; Skov & Wiley, 2005). Baixa variedade de espécies é encontrada em savanas e matas de galeria quando comparado com ambientes de florestas úmidas (Dressler, 1982). De acordo com Augusto e Garófalo (2004), Cerântola e colaboradores (2010) e Rocha-Filho e colaboradores (2013), as fêmeas apresentam comportamento filopátrico, enquanto os machos podem voar grandes distâncias em busca de compostos aromáticos multiflorais e não florais, os quais posteriormente serão usados no comportamento de corte (Dressler, 1982; Eltz *et al.*, 2005). Alguns trabalhos já registraram voos realizados por abelhas desta tribo, onde foram percorridas distâncias de aproximadamente 20 km, possivelmente motivadas pela busca de néctar e fragrâncias florais (Janzen, 1971; Kroodsma, 1975; Ackerman *et al.*, 1982; Eltz *et al.*, 2003). Esta característica permite às abelhas Euglossini uma notável importância na realização da polinização cruzada de diversas espécies vegetais e pode colaborar com a manutenção do fluxo gênico entre as populações deste grupo, mesmo quando distantes geograficamente.

Ademais, pelo fato de não serem manipuladas pelo homem, as abelhas da tribo Euglossini são organismos que podem contribuir grandemente para um melhor

entendimento do fluxo gênico natural entre populações (Dick *et al.*, 2004), especialmente as localizadas em ambientes perturbados por ações antrópicas, tais como: desflorestamento, plantio de monoculturas, áreas urbanizadas, atividades estas que culminam na fragmentação de habitat. Alguns trabalhos apresentam resultados bastante controversos quanto à capacidade destes organismos de se deslocarem em ambientes antropizados, ou mesmo acometido pela fragmentação florestal (Powell & Powell, 1987, Becker *et al.*, 1991; Tonhasca *et al.*, 2003; Millet-Pinheiro *et al.*, 2005; Zimmermann, *et al.* 2011 ; Suni, *et al.* 2014), sendo que para algumas espécies a fragmentação florestal parece agir como barreira, impedindo sua dispersão (Tonhasca *et al.*, 2003; Brosi 2009) e tornando-as susceptíveis ao processo de desflorestamento ou fragmentação de habitat (Roubik & Hanson 2004; Cerântola *et al.* 2010). Já para outras espécies observou-se a ausência de estruturação e presença de fluxo gênico entre as populações de diferentes localidades (Souza *et al.*, 2010; Cerantôla *et al.*, 2010; Zimmermann *et al.*, 2011; Suni & Brosi, 2012), o que indica que a distância geográfica e/ou presença de fragmentação florestal não foi empecilho para a manutenção do contato entre diferentes populações.

A preocupação quanto aos efeitos da fragmentação de habitat nas populações de abelhas se deve porque esta pode afetar a sobrevivência de populações separadas através do isolamento genético e subsequente *inbreeding*, em decorrência da diminuição de fluxo gênico entre elas, o que a longo prazo poderia levar a extinção (Zayed, 2009). Ademais, evidências demonstram que a diversidade de espécies de abelhas da tribo Euglossini também é negativamente afetada pela fragmentação de habitat (Brosi 2009). No entanto, também já foi demonstrado que a mobilidade das abelhas da tribo Euglossini, quando em ambientes fragmentados, pode variar bastante

dependendo da espécie analisada, sendo que para algumas o ambiente fragmentado impede o fluxo gênico, enquanto que para outras espécies da mesma tribo, fragmentado não representa barreira para a manutenção do fluxo gênico (Suni & Brosi 2012).

Objeto principal de estudo deste trabalho, a espécie *Euglossa pleosticta*, pertencente ao subgênero *Euglossa* (*Euglossa*) (Ramirez *et al.*, 2010), possui hábito de vida solitário e costuma estar presente em levantamentos realizados em remanescentes da Mata Atlântica. No entanto, pouco se sabe sobre a estrutura populacional deste grupo assim como sobre os possíveis efeitos causados pela fragmentação florestal sobre ele. Desta forma, é relevante a realização de um estudo populacional para a espécie, o qual colabora para a compreensão dos efeitos da fragmentação ambiental na variabilidade genética do grupo, permitindo um melhor entendimento das necessidades inerentes à conservação da fauna desta abelha e consequentemente, da flora por ela polinizada. Para tanto, nos últimos anos diferentes metodologias têm sido aplicadas na determinação de padrões populacionais de diversas espécies de abelhas, gerando assim inúmeras informações importantes a respeito dos parâmetros necessários para a conservação destas populações (Packer *et al.*, 2008; Sheffield *et al.*, 2009; Francoy *et al.*, 2011). Dentre estas metodologias de análise podemos destacar técnicas morfométricas e moleculares, como Morfometria Geométrica, Assimetria Flutuante, Microsatélites de DNA e DNA Mitocondrial.

1.2 Técnicas Morfométricas

1.2.1 *Morfometria Geométrica*

Desde o final dos anos 80, passou-se a utilizar uma nova técnica morfométrica (Adams *et al.*, 2004), a qual reflete o resultado da busca dos pesquisadores em morfologia quantitativa por métodos que unissem o carácter geométrico das formas biológicas e a possibilidade de um tratamento estatístico da variação (Zelditch *et al.*, 2004). Esta técnica é a chamada Morfometria Geométrica (Bookstein, 1991), que tem sido uma ferramenta muito útil para detectar variações morfológicas, até mesmo quando mínimas e que frequentemente eram indetectáveis por estudos de Morfometria Tradicional (Villemant *et al.*, 2007), além de apresentar um avanço significativo em relação à análise estatística das formas.

A partir da utilização desta ferramenta, iniciou-se uma nova área de pesquisa situada entre a biologia, a estatística e a geometria (Monteiro & Dos Reis, 1999). A análise realizada por técnicas de Morfometria Geométrica está baseada em uma teoria bem estabelecida (Kendall *et al.*, 1999), onde ao invés de distâncias e ângulos, são usadas as coordenadas Cartesianas dos pontos, denominados marcos anatômicos ou *landmarks*. A vantagem do uso de coordenadas em relação a medidas lineares, é que estas incluem informação sobre as posições relativas dos marcos anatômicos, e deste modo permitem a reconstrução da forma estudada (Rohlf & Marcus, 1993), além da identificação das variações da forma nos diferentes exemplares em estudo (Rohlf, 1998). A identificação dessa variação é realizada através do alinhamento ideal das imagens, em que a configuração dos marcos anatômicos de cada espécime é redimensionada para um padrão uniforme de tamanho, sobrepostas com bases em

seus centróides e rotacionadas de modo que a somatória das distâncias entre os marcos anatômicos homólogos seja a menor possível (Rohlf, 1999). Para cada marco é gerado um resíduo de Procrustes, que é a diferença entre a sua posição e a posição do marco anatômico homólogo da configuração consenso (Rodrigues & Santos, 2003), correspondente apenas à variação de forma, independentemente do tamanho das estruturas, diminuindo assim parte da influência ambiental que pode afetar o desenvolvimento dos organismos, como efeitos nutricionais, por exemplo. A matriz dos resíduos de Procrustes é utilizada para realização de procedimentos estatísticos (Rohlf & Slice, 1990), tais como Análise de Componente Principal (PCA), Análise de Variáveis Canônicas (CVA) e Análise de Função Discriminante (DFA).

Esta técnica tem apresentado excelentes resultados em uma grande diversidade de trabalhos relacionados com a identificação de espécies, subespécies e populações, assim como a separação de ecotipos e castas de abelhas. (Silva, 2006; Mendes *et al.*, 2007; Aytekin *et al.*, 2007; Francisco *et al.*, 2008; Grassi, 2009; Francoy *et al.*, 2008; 2009; 2011; 2012, Francoy & Imperatriz Fonseca, 2010; Bonatti *et al.*, 2014; De Souza *et al.*, 2015; Hurtado-Burrillo *et al.*, 2016). A Morfometria Geométrica também se destaca por ser uma técnica que possibilita a apresentação de resultados rápidos, ser de realização relativamente simples e não requerer grandes investimentos financeiros para sua execução, uma vez que os programas para sua utilização se encontram disponíveis na internet gratuitamente e os equipamentos necessários não apresentam custo elevado.

1.2.2 *Assimetria Flutuante*

De acordo com Brusca & Brusca (2007), a simetria é um aspecto básico da forma corporal e se refere ao arranjo regular das estruturas em relação a um eixo do corpo. Na natureza, observamos, mais comumente, três tipos gerais de simetria: simetria esférica, simetria radial e simetria bilateral, sendo esta última a mais frequentemente encontrada. Os organismos que possuem simetria bilateral são orientados em um eixo longitudinal que atravessa o corpo da porção anterior à posterior, fazendo parte de uma linhagem evolutiva com mais de 1,5 milhões de espécies modernas e presente em mais de 99% dos animais modernos (Finnerty *et al.*, 2004).

A simetria bilateral é obtida pela intersecção ortogonal do eixo anterior-posterior e do eixo dorsal-ventral, sendo que genes são responsáveis pela manutenção de padrões simétricos nas diversas características. Genes *Hox* têm um papel conservador em padronizar o eixo antero-posterior, enquanto que genes *Dpp* possuem um papel conservador na organização do eixo dorsal-ventral (Finnerty *et al.*, 2004). Sendo assim, os lados direito e esquerdo começam a ser definidos assim que esses dois eixos de desenvolvimento são estabelecidos. Logo, as características morfológicas de ambos os lados de um organismo bilateralmente simétrico deveriam se desenvolver de forma idêntica, por serem expressões do mesmo genoma (Clarke *et al.*, 1986). A simetria bilateral pode ser alterada em decorrência de desvio na programação genética do organismo, o qual pode ocorrer em função de variações da qualidade ambiental, o que causa estresse durante o desenvolvimento (Leary & Allendorf, 1989).

A Assimetria Flutuante (AF) é um parâmetro amplamente usado para medir a instabilidade de desenvolvimento de indivíduos, baseada em pequenas variações

aleatórias dos lados direito e esquerdo de uma estrutura bilateral (Graham *et al.*, 2010). Esta instabilidade é refletida pela incapacidade de um genótipo em produzir o mesmo fenótipo dos dois lados do corpo quando em um ambiente variado (Moller & Swaddle, 1997), indicando interferência na estabilidade de desenvolvimento da estrutura, em decorrência de estresse ambiental ou genético (Polak 2003; Graham *et al.*, 2010). Sendo assim, a AF pode ser um bom indicativo para avaliar os níveis de estresse ou impacto ambiental (Leary & Allendorf 1989; Parsons, 1990; Clarke, 1995), sendo bastante indicada para estudos realizados em ambientes antropizados. A investigação de AF envolve a mensuração de uma série de características discretas e/ou contínuas, em ambos os lados dos indivíduos de uma espécie, buscando avaliar se um determinado fator estressante externo afeta o desenvolvimento ontogenético dos mesmos (Silva *et al.*, 2007). Estas mensurações podem ser realizadas através de ferramentas de Morfometria Tradicional (Palmer & Strobeck 1986; Palmer 1994; Nunes *et al.*, 2015) ou geométrica (Klingenberg, 2015; Savriama & Klingenberg, 2011; De Anna *et al.*, 2013; Ferreira, 2016). No entanto a morfometria geométrica é mais sensível para esse tipo de análise, uma vez que a assimetria pode também ser estimada pelas análises de múltiplas variáveis da forma. Desta forma, a AF é um parâmetro importante para estudos populacionais por refletir o estado de adaptação e coadaptação das populações (Jones, 1987). Este parâmetro de análise se destaca por ser uma metodologia simples de ser usada, rápida e sem custos (Hódar, 2002), além de possuir inúmeras aplicações tanto teóricas como práticas, podendo ser utilizada na biologia evolutiva, genética quantitativa, biologia da conservação, antropologia, agricultura e medicina (Graham *et al.*, 2010).

1.3 Marcadores moleculares

Ferramentas moleculares também têm sido amplamente aplicadas em análises envolvendo diferentes grupos de abelhas. Para tanto podemos destacar o uso de marcadores de microssatélite e DNA mitocondrial, em ambos os casos apresentando excelentes resultados nos estudos envolvendo abelhas (Clarke *et al.*, 2001; Diniz *et al.*, 2003; Collet *et al.*, 2006; Francisco *et al.*, 2008; Collet *et al.*, 2009; Gibbs, 2009; Cerantôla *et al.*, 2010; May-Itzá *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2010; Francisco *et al.*, 2011; Rocha-Filho, 2013; Zimmermann *et al.*, 2011; Boff *et al.*, 2012; Freiria *et al.*, 2012).

1.3.1 Microssatélites

Também conhecidos por “*simple sequence repeats*” (SSR) ou “*short tandem repeats*” (STR), os microssatélites estão presentes, em geral, em regiões não-codificantes do DNA, sendo formados por sequências de 1-6 nucleotídeos repetidos em tandem bastante comuns nos genomas de organismos eucariontes e procariontes (Field & Wills, 1998; Tóth *et al.*, 2000). Estas moléculas são amplamente utilizadas como marcadores genéticos, tendo um atributo específico por sofrerem maiores taxas de mutação do que o restante do genoma (Jarne & Lagoda, 1996).

Originalmente as análises utilizando DNA de microssatélite foram designadas para pesquisas em humanos, no entanto esta técnica apresentou excelente resultado ao ser testada em diferentes modelos biológicos como animais (Schlötterer *et al.*, 1991) e plantas (Dayanandan *et al.*, 1997; White & Powell, 1997; Steinkellner *et al.*, 1997; Roa *et al.*, 2000; Collevatti *et al.*, 2001). De acordo com Heywood e Iriondo (2003), os marcadores de microssatélite têm apresentado informações relevantes na identificação de unidades conservadas e também na investigação de processos genéticos

encontrados na população, ocorridos seja por padrões de fluxo gênico, deriva genética e outros. Por serem bastante precisos, estes marcadores genéticos apresentam uma medida mais acurada (Sunnucks, 2001; Schlötterer, 2004), sendo bastante indicados para trabalhos de determinação e diferenciação genética realizados também em populações de abelhas (Arias *et al.*, 2006).

Desta forma, diversos microssatélites foram descritos para diferentes grupos de abelhas, buscando assim um melhor entendimento e bom resultado da genotipagem, levando em consideração a necessidade do uso de marcadores espécie-específico (Estoup *et al.*, 1995; Souza *et al.*, 2007; Brito *et al.*, 2009; Paxton *et al.*, 2009; Augusto *et al.* 2011; López-Uribe *et al.*, 2011; Francisco *et al.*, 2011). Em estudos populacionais envolvendo as abelhas Euglossini, fazendo uso de microssatélites especificamente desenvolvidos para a tribo, foram comuns os relatos de uma alta diversidade genética (Cerantôla *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2010; Rocha-Filho, 2013; Zimmermann *et al.*, 2011 Freiria *et al.*, 2012). Os dados da diferenciação genética entre pares de populações estudadas em Euglossini parecem estar associadas ao tamanho das áreas (Zimmermann *et al.*, 2011), bem como a distância entre fragmentos onde estas abelhas foram encontradas (Sofia *et al.*, 2005; Cerantôla *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2010; Zimmermann *et al.*, 2011; Freiria *et al.*, 2012). Diversos trabalhos vêm sendo realizados com diferentes enfoques, envolvendo análise de microssatélites e utilizando como modelo biológico abelha (Diniz *et al.*, 2003; Clarke *et al.*, 2001), seja em estudos populacionais, como pode ser observado em Collet e colaboradores (2009) no estudo de *Apis mellifera* e em pesquisas realizadas com espécies da tribo Euglossini (López – Uribe *et al.*, 2010; Cêrantola *et al.*, 2010) fica evidente a grande eficiência desta ferramenta molecular.

1.3.2 DNA Mitocondrial

A análise de DNA mitocondrial (DNAm_t) é uma ferramenta que tem sido amplamente utilizada (Collet *et al.*, 2006; Gibbs, 2009; May-Itzá *et al.*, 2010), fornecendo excelentes resultados para análise de variabilidade populacional. Esta molécula apresenta um grande potencial para estudo, pois muitas de suas características são extremamente peculiares e únicas. Dentre elas, pode-se destacar: alta taxa de evolução em relação ao genoma nuclear, não sofrer recombinação, ser circular e pequena, possuir uma estrutura genética simples com ausência de sequências repetitivas, pseudogenes e íntrons, além de seu conteúdo gênico se apresentar bastante conservado em animais (Moritz *et al.*, 1987).

O genoma mitocondrial possui de 16 a 20 quilobase (Kb) nos animais (Awise *et al.*, 1987), sendo composto por apenas 37 genes. Destes, dois genes formam as subunidades ribossômicas (12S e 16S); 22 formam os RNA transportadores (RNAt); três formam as subunidades da enzima citocromo oxidase (COI, COII e COIII); uma 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). Nos invertebrados esta molécula também possui uma região de “controle”, não codificadora, rica em adenina e timina, responsável pela origem de replicação e transcrição da molécula do DNAm_t (Moritz *et al.*, 1987).

Figura 2. Mapa do genoma mitocondrial de *A. mellifera*. A posição dos *primers* utilizados para amplificação do gene *Citocromo B* estão representados pelas setas que indicam seu sentido de alongação (Francisco, 2012 modificado).

Uma possível explicação para a evolução mais rápida do DNAm em relação ao DNA nuclear (DNAn) é o fato de o interior da mitocôndria ser um ambiente oxidativo, rico em compostos de oxigênio, que, aliado a falta de um mecanismo de reparo eficiente da DNA polimerase responsável pela sua duplicação, faz com que suas sequências acumulem mais substituições nucleotídicas, já que não codificam proteínas diretamente envolvidas em sua replicação, transcrição e tradução. Além disso, também não possuem histonas para a estocagem de seu material genético, outro fato que pode contribuir para as altas taxas mutacionais (Avisé, 2009). Por possuir uma herança materna e sem recombinação, suas mutações normalmente representam a variedade genética (haplótipos) observadas nas populações, que devido ao acelerado ritmo de evolução do DNAm podem coexistir dentro de uma mesma espécie. Dessa forma, os indivíduos retêm a história matrilinea em suas sequências nucleotídicas, fazendo dessa

molécula um importante marcador para o uso científico (Avice, 2009). Sendo assim, as sequências de DNAm_t são de fácil amplificação e sequenciamento, o que facilita as análises, e com isso vêm sendo amplamente utilizadas em estudos filogenéticos, o que os tornam muito úteis na resolução de questões relativas a dinâmica e estrutura de populações, delimitação de espécies e subespécies (Besansky & Fahey, 1997; Gonçalves, 2010) e também na elucidação da história evolutiva de grupos (Bonatti *et al.*, 2014).

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo principal caracterizar a variabilidade genética e morfológica de abelhas da espécie *Euglossa pleosticta*, coletadas em 3 fragmentos de mata no Estado de São Paulo, através da análise de dados morfométricos e moleculares. Este estudo foi desenvolvido para fins de entendimento da estrutura populacional deste grupo e do efeito da fragmentação florestal no mesmo, com o intuito de gerar dados que possam incrementar o entendimento da dinâmica populacional da espécie.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a variabilidade genética, assim como avaliar a presença de fluxo gênico inerente às amostras de *Euglossa pleosticta* coletadas em diferentes fragmentos florestais, através do uso de microssatélites de DNA;
- Determinar a estrutura populacional dos grupos estudados através do sequenciamento de fragmentos de DNA mitocondrial;
- Investigar a variação morfológica entre as amostras de diferentes localidades através do uso de Morfometria Geométrica;
- Investigar se variações ambientais pertinentes a cada localidade estudada, refletem em alterações morfológicas das amostras analisadas, através de análises de Assimetria Flutuante;

- Avaliar a diversidade de padrões morfométricos, mitocondriais e de microssatélites de DNA das amostras coletadas nos diferentes fragmentos florestais;
- Correlacionar os diferentes padrões de variabilidade encontrados nas populações;

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Características gerais das áreas amostradas

Mundialmente, o Brasil se destaca por possuir uma importante parcela da biodiversidade conhecida, fato este que se deve, principalmente, à sua extensão territorial e posicionamento geográfico. Dentro do país, o Estado de São Paulo se destaca por ser um dos Estados que reúne alguns dos tipos de vegetação exclusivos da região Neotropical (Maury, 2002). No entanto, este também é um dos Estados que apresenta, de maneira mais evidenciada, décadas de deterioração dos ecossistemas, ocasionada em decorrência de práticas agrícolas e crescimento urbano (Kronka, 2005). No Estado de São Paulo, encontram-se diversos biomas, dentre eles, a Mata Atlântica e o Cerrado. Estes biomas, segundo Myers e colaboradores (2000), são dois dos 25 *hotspots* de diversidade do planeta e necessitam de atenção especial quanto à sua conservação, pois caracterizam-se pelo alto grau de endemismos e pela alta diversidade de espécies que abrigam.

A Mata Atlântica pode ser mais bem caracterizada como um complexo de vegetações (Rizzini, 1979), pois este bioma é composto por uma série de fitofisionomias bastante diversificadas, que são determinadas pela proximidade da costa, relevo, tipos de solo e regimes pluviométricos. Dentre as localidades de coleta de amostras estudadas em nosso trabalho, contemplamos duas destas fitofisionomias: a Floresta Estacional Semidecidual, presente na Mata da Virgínia em Matão e no Parque Estadual do Vassununga em Santa Rita do Passa Quatro (Glebas Capetinga Leste e Oeste) e a Floresta Ombrófila Densa, presente na Fazenda APTA, em Ubatuba.

A fitofisionomia Floresta Estacional Semidecidual foi o tipo florestal mais rápida e extensamente devastado do Estado de São Paulo (Ribeiro *et al.*, 2009). Esta devastação ocorreu associada principalmente à expansão das fronteiras agrícolas no início do século XX, em virtude da ocupação dos solos de maior fertilidade em regiões com relevo favorável à agricultura (Durigan *et al.*, 2000). Sendo assim, dos fragmentos remanescentes, poucos têm área representativa, e apenas 6,8% do total da área dos remanescentes encontra-se preservada dentro de unidades de conservação (Ribeiro *et al.*, 2009). Já a Floresta Ombrófila Densa, constitui um prolongamento da faixa florestal que acompanha a costa brasileira desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul (IBGE, 1992). Esta fitofisionomia cobria originalmente 29.309 km² de superfície (Klein & Rodriguez, 1978) e, no entanto, em decorrência da substituição das comunidades vegetais autóctones por sistemas de atividades agropecuários, áreas urbanas e industriais, restaram atualmente apenas 16.821 km² de remanescentes florestais, sendo sua maioria em estágio secundário de regeneração (Lingner *et al.*, 2015).

Atualmente, os remanescentes da floresta atlântica não chegam a 8% da cobertura original, sendo que estes ainda se encontram bastante ameaçados pois estão localizados nos arredores dos grandes centros urbanos do país ou estão cercados por importantes áreas agrícolas, destinadas ao plantio de monocultura (café, *Coffea arabica* L.; laranja, *Citrus x sinensis* Osbeck; cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum* L. e eucalipto, *Eucalyptus* spp.) (Jorge & Garcia, 1997; Ranta *et al.*, 1998; Morellato & Haddad, 2000).

O Cerrado, é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando 21% do território nacional (Borlaug, 2002). Apresenta alta diversidade em espécies vegetais e em fitofisionomias, abrangendo desde fisionomias campestres, como o campo limpo, até

florestais, como o cerradão, e passando por formas intermediárias, como o campo sujo, campo cerrado e cerrado *sensu stricto* (Coutinho, 1978; Castro *et al.*, 1999). Coutinho (1978) considerou as fisionomias campo sujo, campo cerrado e cerrado *stricto sensu* como sendo os verdadeiros ecótonos, enquanto as formas extremas estariam representadas pelo campo limpo e cerradão. Este bioma é um dos mais afetados pelo desflorestamento, principalmente por ter muito de sua área convertida em pastagens, áreas de plantio de monoculturas como soja, cana-de-açúcar e eucalipto. Sendo que uma grande porção também foi tomada por processos de crescimento urbano. No passado, a área de cerrado cobria 2 milhões de Km² (Ab'Saber, 1981), no entanto, atualmente restou apenas metade desta área sendo que apenas 33.000 km² compõem áreas descontinuas de proteção (Mittermeier *et al.*, 1999; Klink & Machado, 2005). Dentre as três localidades de coleta de material para as análises realizadas neste trabalho, o bioma cerrado esta presente em uma delas: Santa Rita do Passa Quatro (Parque estadual do Vassununga – Gleba Pé-de-Gigante).

3.1.1 Características específicas das áreas amostradas

O Parque Estadual Serra do Mar, localizado na cidade de Ubatuba (UBA) é administrada pela Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD) de Ubatuba, ligada ao Polo Regional do Vale do Paraíba/APTA. Neste local, encontramos ecossistemas de mata nativa, remanescentes de Florestas Ombrófila Densa - mata perenifólia (sempre verde), possui densa vegetação arbustiva. O clima, segundo Köppen (1948), é Af, com temperatura mínima no mês de Julho de 18°C e máxima em Fevereiro de 24°C (Instituto Nacional de Meteorologia), com média de 21.9°C (Herrera *et al.*, 1997). As coletas das amostras utilizadas neste trabalho, foram realizadas em área com altitude de 7m.

O Parque Estadual de Vassununga (VAS) localizado no município de Santa Rita do Passa Quatro (SP) foi criado em 1970 a partir da incorporação de terras da falida Usina Açucareira de Vassununga como forma de pagamento ao governo do Estado (Pivello *et al.*, 1998). Este parque engloba uma área de vegetação nativa fragmentada em seis glebas independentes (Capão da Várzea, Capetinga Oeste, Capetinga Leste, Praxedes, Maravilha e Pé de Gigante) imersas em cultivos de cana de açúcar e eucalipto (Pivello *et al.*, 1998). Nesse trabalho, as amostras denominadas VAS foram coletadas nas glebas Capetinga, Capetinga Leste e Pé-de-Gigante. O clima, segundo Köppen (1948), é considerado Cwa, com temperatura mínima no mês de Julho de 17°C e máxima em Fevereiro de 22°C (Instituto Nacional de Meteorologia). Possui altitude de 500m a 100m. As glebas de Capetinga pertencem ao bioma Mata Atlântica e apresentam a fitofisionomia Floresta Estacional Semidecidual, enquanto que a gleba Pé-de-Gigante é um remanescente de Cerrado, onde as fisionomias vão desde campo sujo, passando pelo campo cerrado e cerrado *sensu stricto*, até o cerradão (Pivello *et al.*, 2005).

A Mata da Virgínia (MAT) é uma área de Reserva Legal, pertence à Fazenda Cambuhy Agrícola Ltda, possui área de 2.072, 64 há, localizada entre os municípios de Matão e Tabatinga (Rozza, 1997). Segundo Köppen (1948) o clima é considerado Cwa, com temperatura mínima no mês de Julho de 18°C e máxima em Fevereiro de 24°C (Instituto Nacional de Meteorologia). Possui altitude de 585m, pertence ao bioma Mata Atlântica com a fitofisionomia Floresta Estacional Semidecidual. A área agricultável da fazenda destina-se basicamente à citricultura, cafeicultura e extração de borracha natural (Rozza, 1997).

3.2 Material Biológico

Para a realização deste trabalho utilizamos 293 amostras de *Euglossa pleosticta* já coletadas e identificadas por especialistas, armazenadas na coleção do Depto. de Biologia da FFCLRP-USP e Coleção Paulo Nogueira Neto – IB-USP (Tabela 1). Estas amostras foram coletadas mediante uso de iscas de cheiro em três fragmentos florestais, nas cidades de Matão, Santa Rita do Passa Quatro e Ubatuba, localizadas no estado de São Paulo (Tabela 1, Figura 3).

Tabela 1. Informações sobre os locais de coleta das amostras de *Euglossa pleosticta* e tamanho amostral.

Cidade	Coordenada Geográfica	Local de Coleta	Área do Fragmento	N	Clima	Altitude	Fitofisionomia	Bioma
Matão	21° 38'S 48° 32'O	MV-Mata da Virgínia	2.071ha	117	Cwa	585m	Floresta Sazonal semidecidual	Mata Atlântica
Ubatuba	23° 24'S 45° 07'O	UBA-APTA Ubatuba	47.500ha*	80	Af	7,6m	Floresta Ombrófila Densa	Mata Atlântica
Santa Rita do Passa Quatro	21° 37'S 47° 37'O	VAS-Parque Estadual do Vassununga	2.073ha	96	Cwa	500 a 750m	Floresta sazonal semidecidual, Campo de Várzea e Cerradão	Mata Atlântica e Cerrado

Figura 3. Mapa ilustrativo dos locais de coleta das abelhas *Euglossa pleosticta*, e informações quanto à distância entre as localidades e o bioma. Legenda: MV=Mata da Virgínia (Matão); VAS= Santa Rita do Passa Quatro (Parque Estadual do Vassununga); UBA – APTA (Ubatuba). Mapa feito no speciesMapper (splink.cria.org.br).

3.3 Morfometria

3.3.1 Preparação das asas

Para a realização das análises morfométricas, primeiramente, com auxílio de tesoura entomológica e pinças, retiramos as asas anteriores direita e esquerda de todas as abelhas a serem estudadas. Estas asas foram depositadas em uma lâmina previamente identificada, contendo o nome da espécie, localidade de coleta, identificação da amostra e identificação da asa direita e esquerda. Na sequência colocamos, sobre esta lâmina, uma lamínula e as selamos com base incolor para unha.

Todas as asas tiveram suas imagens digitalizadas com auxílio de uma câmera digital acoplada a um estereomicroscópio e armazenadas, em formato digital, no computador.

3.3.2 *Preparação dos dados*

Para a realização das análises de Morfometria Geométrica e Assimetria Flutuante, primeiramente, utilizamos o *software* tpsUtil versão 1.40 (Rohlf, 2008a) para criar um arquivo com extensão .tps, a partir das imagens das asas fotografadas e salvas no formato .jpg. Este novo arquivo, além de banco de dados para armazenar as coordenadas Cartesianas dos marcos anatômicos, serve de entrada para o *software* tpsDig versão 2.12 (Rohlf, 2008b), o qual utilizamos para marcar manualmente 18 marcos anatômicos (*Landmarks*) nas intersecções das nervuras das células das asas de cada abelha (Figura 4). Todas as amostras de asas (direita e esquerda) tiveram os marcos anatômicos marcados duas vezes, buscando assim uma forma de calcular possíveis variações provocadas por erro de marcação, as quais se não contabilizadas poderiam servir de viés no cálculo da AF (Palmer, 1994, Klingenberg, 2015). Após a marcação das asas, o arquivo gerado (.tps), serviu de entrada para o *software* MorphoJ versão 1.03 (Klingenberg, 2011), no qual foram realizadas as análises estatísticas. É interessante ressaltar que todos os softwares utilizados nesse trabalho são de livre acesso e encontram-se disponíveis na internet (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/> e <http://www.flywings.org.uk/MorphoJ>).

Figura 4. Asa anterior direita de *Euglossa truncata* com os 18 marcos anatômicos plotados nas intersecções das veias.

3.3.3 Análises estatísticas

3.3.3.1 Morfometria Geométrica

Com o *software* MorphoJ versão 1.03 (Klingenberg, 2011), inicialmente foram feitos os ajustes das imagens (Figura 5), onde primeiramente todas as imagens das asas foram redimensionadas para um tamanho uniforme na sequência, estas imagens foram sobrepostas com base em seus centróides e então rotacionadas para produzirem um alinhamento ideal. Este alinhamento ocorreu de forma que a somatória das distancias entre os marcos anatômicos homólogos fosse a menor possível, o que possibilita a eliminação dos efeitos de tamanho das estruturas e permitiu que as análises ficassem baseadas exclusivamente na variação da forma das estruturas. Após a realização do ajuste das imagens, obtivemos os resíduos de Procrustes, estes geraram uma matriz de covariância, que foi utilizada como variável para as análises multivariadas: a Análise de Componente Principal (PCA), a Análise de Variáveis Canônicas (CVA) e a Análise da Função Discriminante (DFA).

Figura 5. Padronização e alinhamento das asas de *Drosophila sp* a partir dos marcos anatômicos. Configuração original das amostras a serem analisadas **(1)**; Redimensionamento das imagens para uma medida única **(2)**; Sobreposição dos centróides (ou centro de gravidade) **(3)**; Rotação das amostras em torno do centróide compartilhado, gerando um alinhamento ideal das amostras, revelando a diferença encontrada entre as formas analisadas **(4)**. Em destaque a real diferença entre as formas analisadas, após eliminar a variação relativa ao tamanho das amostras (Procruste) (Klingenberg, 2002).

A PCA foi utilizada para examinar as características principais de variação na forma de uma amostra, sendo uma análise de ordenação com objetivo de examinar o arranjo das amostras no morfoespaço sem considerar sua origem (Klingenberg, 2011). Esta é uma análise exploratória, calculada sobre a variância/covariância dos caracteres e não a partir da matriz bruta dos dados, não sendo otimizada para encontrar diferença entre os grupos. Por esse motivo não pode ser usada como uma análise classificatória. Já a CVA é uma análise que possui a finalidade de discriminar grupos em conjunto de dados, sendo utilizada para encontrar a estrutura característica que melhor distingue estes grupos. Isto ocorre através de combinações lineares, o que possibilita analisar a similaridade ou a dissimilaridade de grupos em conjuntos de dados, o que a torna um

dos tipos mais comuns de análise em morfometria (Klingenberg, 2011). A DFA é um método para obter regras de decisão ótimas para grupos distintos, usada para se obter a probabilidade de classificação correta e incorreta entre grupos (Klingenberg, 2011), usando apenas a matriz de covariância entre os pares de grupos nas análises. Essa análise realiza a validação cruzada (Lachenbruch, 1967) que seria uma análise realizada “às cegas” para se obter a probabilidade de classificação correta entre os grupos, sendo útil para avaliar a confiabilidade da classificação de seus resultados. O valor resultante desta análise representa a probabilidade de que um indivíduo qualquer retirado ao acaso da amostragem seja corretamente classificado dentro do seu respectivo grupo.

As distâncias de Procrustes entre as formas médias das configurações consenso de cada população também foram calculadas e a partir delas, com auxílio do software Mega versão 5.2 (Tamura *et al.*, 2011) construímos dendogramas de proximidade morfológica pelo método de *Neighbor Joining*. Também realizamos o teste de Mantel com auxílio do *software* TFPGA (Miller, 1997), para verificação de correlações significativas entre as distâncias morfológicas e geográficas das localidades amostradas. A distância geográfica entre as localidades, foram tomadas em linha reta e em Quilômetros (KM) com auxílio do Google Earth versão 7.1.5.1557/2015.

Depois de finalizada as análises de Morfometria Geométrica com as amostras de *Euglossa pleosticta* das 3 localidades mencionadas anteriormente, análises adicionais foram feitas inserindo 125 amostras de *Euglossa annectans* como grupo externo. Tais análises foram realizadas seguindo a metodologia descrita acima e seus dados nos serviram de parâmetro para inferir conclusões a respeito das distâncias entre as populações.

3.3.3.2 Assimetria Flutuante

Primeiramente, para minimizar os fatores de escala, tamanho e posição das configurações direita e esquerda, utilizamos o *software* MorphoJ versão 1.03 (Klingenberg, 2011) para realizar a “*full Procrustes fit*” (Klingenberg, 2011). Na sequência para verificar a diferença de tamanho do centroide e de forma entre as asas direita e esquerda, realizamos a análise de Procrustes ANOVA (Klingenberg & McIntyre, 1998; Savriama & Klingenberg, 2011; Klingenberg, 2015). As análises foram realizadas para cada localidade separadamente.

A análise de Procrustes ANOVA nos possibilitou calcular os efeitos nos níveis: indivíduo (variação individual, uma variação entre as médias de ambos os lados dos indivíduos), lado (AD, diferença entre os lados e indicada como a média de assimetrias entre os indivíduos) e indivíduo X lado (AF, a variação individual da assimetria) (Klingenberg & McIntyre, 1998; Savriama & Klingenberg, 2011; Klingenberg, 2015). Sendo assim a AD foi quantificada como a assimetria média (média da variação da diferença entre os lados direito e esquerdo de todos os indivíduos), enquanto a AF como a variação das assimetrias individuais (Savriama & Klingenberg, 2011).

Para o cálculo dos efeitos alométricos, realizamos uma análise de regressão multivariada (Klingenberg, 2016), onde os componentes simétricos (variação individual) e assimétricos (assimetria flutuante) foram as variáveis dependentes, e o tamanho do centróide, a variável independente (Klingenberg *et al.*, 2002), agrupando por localidade. Concomitante à análise de regressão multivariada, como teste de significância realizamos um teste de permutação (10000 ciclos) (Klingenberg, 2016).

3.4 Análises moleculares

3.4.1 Extração do DNA

Para as análises moleculares, extraímos o DNA total de todas as amostras, utilizando Chelex® 100, de acordo com a metodologia proposta por Walsh e colaboradores (1991). Primeiramente, retiramos a perna anterior direita das abelhas, com auxílio de pinças entomológicas, flambadas em álcool e fogo após a retirada de cada perna e acondicionamos estas em microtubo (0,2ml). Para a extração foi adicionado a cada microtubo (0,2ml) 100µl de solução Chelex 10% (*Sigma-Aldrich nº Cat 11139-85-8*) e 5µl de proteinase K 20ug/ µl (*Sigma-Aldrich nº Cat E.C.3.4.21.64*). A reação de extração ocorreu no termociclador durante uma hora a 55°C, seguido 15 minutos a 99°C e, por fim, um minuto a 37°C. Após extração centrifugamos as amostras a 4.000 rpm por três minutos e o sobrenadante retirado e, então, congelado a -20°C para posterior utilização. Nesta etapa, a retirada do sobrenadante, se faz bastante importante, pois o Chelex® 100 contido na reação de extração pode interferir negativamente na reação de PCR.

3.4.2 DNA Mitocondrial

Para as amplificações por PCR – Reação da Polimerase em Cadeia (*Applied Biosystems, geneAmp®, PCR System 9700*) utilizamos o DNA total extraído das diferentes amostras e os oligos iniciadores (*primers*) mtD26 e mtD28, que são iniciadores que funcionam para diversos grupos de insetos (Simon *et al.*, 1994), para serem acoplados em sequências de DNAm (Tabela 2). As condições utilizadas foram: desnaturação

inicial a 94°C, por cinco minutos, seguida por 37 de ciclos, com três etapas – desnaturação do DNA molde a 94°C por um minuto, anelamento dos *primers* a 42°C por um minuto e 20 segundos e extensão a 72°C por dois minutos – e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A reação foi realizada com 2,5 µl de cada *primer* (10 µM), 7µl de DNA, 25 µl de *Master Mix 2x* (*Promega nº Cat M7502*) totalizando um volume de 50 µl com água milli-Q autoclavada.

Tabela 2. Informações sobre os oligos iniciadores (*primers*) utilizados nas análises de DNA mitocondrial.

Nome	Gene <i>Locus</i>	Nome do <i>primer</i>	Sequência	Nº de Ciclos	Temp. de anelamento
Cit b	<i>Citocromo</i>	mtD 26	TATGTACTACCATGAGGACAAATATC	37	42°C
	<i>B</i>	mtD 28	ATTACACCTCCTAATTATTAGGAAT	37	42°C

Posteriormente, o fragmento amplificado por PCR foi analisado em gel de agarose 1% em tampão 1x TBE (0,45M Tris Base; 0,45M Ácido Bórico; 0,5M EDTA, pH 8,0), corado com GelRed (*nº Cat. B7022S*). Utilizamos marcador de peso molecular com intervalo de 100 pares de base (*Invitrogen nº Cat 15628-050*) em uma das pistas de cada gel, e na sequência, cada gel foi visualizado com o uso de um transiluminador de luz ultravioleta.

3.4.2.1 Sequenciamento do DNA mitocondrial

Após a amplificação dos fragmentos por PCR, estes foram purificados utilizando-se o *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (*Promega nº Cat A9285*). Na sequência, todas as amostras de DNA foram quantificadas em Nanodrop (ND 1000). Posteriormente, enviamos 20 µl de DNA com concentração superior a 10ng/ µl para ser

submetidos ao sequenciamento pelo CREBIO (Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – *Campus* UNESP Jaboticabal).

3.4.2.2 *Análises estatísticas do DNA mitocondrial*

Para as análises, as sequências *forward* e *reverse* de cada amostra foram alinhadas, comparadas, corrigidas e editadas usando o *software* Geneious versão 7.1.3. (Drummond *et al.*, 2011). Para o alinhamento das sequências, utilizamos o algoritmo *Muscle* (Edgar, 2004) com um número máximo de 8 interações. Para separar os haplótipos em seus respectivos grupos, utilizamos o *software* DnaSP versão 5.10 (Librado & Rozas, 2009). Com este mesmo *software* determinamos o número de sítios polimórficos (S); número de haplótipos (h); diversidade haplotípica (Hd); índice de diversidade nucleotídica (π); número médio de diferenças nucleotídicas (k). A rede de haplótipos foi construída através do *software* NETWORK versão 4.6 (Polzin, 2003), utilizando-se o algoritmo *Median Joining* que identifica os haplótipos mais proximamente relacionados. Objetivando estimar a variabilidade entre os grupos estudados, utilizamos o *software* Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010), para realizar o cálculo de F_{st} par a par e análises de Variância molecular (ANOVA) (Excoffier *et al.*, 1992). Com o *software* TFGPA (Miller, 1997), verificamos a existência de correlação entre as distâncias genéticas e geográficas das diferentes localidades estudadas, através do teste de Mantel.

3.4.3 *Microsatélite*

Nas análises envolvendo marcadores de microssatélites, primeiramente testamos oligos iniciadores delineados por Souza e colaboradores (2007) para seis loci

de *Eulaema nigrita* (Eln1, Eln12a, Eln13, Eln7J, Eln12J, Eln19J) e cinco loci de *Euglossa cordata* (Egc17, Egc18, Egc24, Egc26, Egc 35), também testamos cinco loci (ann02, ann03, ann04, ann08, ann28) delineados por Paxton e colaboradores (2009) para *Euglossa annectans*. Após os testes, decidimos trabalhar apenas com os loci que se apresentaram mais polimórficos (Tabela 3). Todos os *primers* de microssatélites *foward* utilizados na *PCR* foram marcados com diferentes fluoróforos, para identificação dos alelos em sequenciador automático.

Para a reação de *PCR*, trabalhamos com 1 µl de *Buffer*, 0,2 µl de *cada primer* (*stock solution* 100 µM/µl), 0,05 µl de Taq polimerase e 1 µl de DNA. Adicionamos 7,35 µl de água milli-Q autoclavada, para totalizar volume final de 10 µl por amostra, para cada *locus* escolhido. As reações de *PCR* foram realizadas separadamente para cada *locus*, em termociclador Gene AmpPCR System 9700 com as condições propostas por Souza e colaboradores (2007) e Paxton e colaboradores (2009), e o produto destas reações foram analisados quanto a sua eficácia na amplificação com auxílio do QIAxcel®, utilizando 1 µl da PCR diluído em 9 µl de água DNase free.

Tabela 3. Informações sobre os oligos iniciadores (*primers*) utilizados nas análises de microssatélite.

Locus	Sequência	Tamanho da Sequência	Fluorófolo	Bibliografia
Egc17	F5'-AGAGGAGGGTCCAGGAAAGA-3'	182-230	FAM	Souza <i>et al.</i> , 2007
Egc24	F5'-AGGAGAACCGAACAGCGATA-3'	167-182	joe	Souza <i>et al.</i> , 2008
Egc26	F5'-GCCGAACAAACATCTCGTCT-3'	134-169	ned/ATTO550	Souza <i>et al.</i> , 2009
Egc35	F5'-GATCACGAAACGGTGTAAAGTC-3'	141-152	FAM	Souza <i>et al.</i> , 2010
ann08	F5'-TGGAAGATTAGGGCAACAGG-3'	113-135	joe	Paxton <i>et al.</i> , 2009
Egc18	F5'-TGATACAGGTCGGCGTAAAA-3'	132-182	FAM	Souza <i>et al.</i> , 2010
Egc19J	F5'-ATAAAGCTACGACGCGAGGA-3'	142-187	joe	Souza <i>et al.</i> , 2010
ann02	F5'-ATTGCCTTGACGTTCCAC-3'	154-242	ned/ATTO550	Paxton <i>et al.</i> , 2009

Após esta etapa, diluímos em água milli-Q autoclavada, na proporção de 1:20 as amostras que foram amplificadas para cada *locus*, e preparamos as placas agrupando os marcadores rotulados com diferentes fluorescências e/ou com marcadores com diferente tamanho (número de pares de base) sendo que microssatélites marcados com mesma fluorescência não foram combinados, caso possuísem a mesma variação de tamanho de alelos. Após a diluição, montamos as placas de sequenciamento, com 1 µl do produto das PCRs diluídas e o mix do marcador de peso molecular (0,4 µl de ROX ((GeneScan™ 500 ROX™ – Applied Biosystems nº Cat. 4310361) e 8,6 µl de água milli-Q autoclavada). O resultado da genotipagem foi obtido através do sequenciador automático ABI3730 DNA Analyzer do laboratório de Genômica da Ludwig-Maximilians Universitat Munich -MLU. A visualização dos fragmentos amplificados e o fenótipo dos alelos foi realizada através do programa GeneMarker® versão 2.6.4.

Todos os fragmentos foram inspecionados a olho nu, buscando checar o tamanho de cada alelo num dado *locus* bem como verificação da ausência de alelos (não amplificados) ou com ruídos. A marcação dos alelos para todos os indivíduos, em um dado *primer*, foi realizada de uma única vez como medida de mitigação de erro da genotipagem (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

3.4.3.1 Análise estatística dos Microssatélites

Após a identificação dos fenótipos para os loci de microssatélites analisados, foi realizada a análise exploratória dos dados e calculada a frequência alélica e diversidade estatística das amostras com o *software* Microsatellite Toolkit II (Shaibi *et al.*, 2008). Posteriormente, para determinar a provável estrutura populacional das amostras coletadas em diferentes localidades realizamos uma análise de agrupamento bayesiana

a fim de se estimar o número de populações mais prováveis (K) a partir dos dados dos genótipos dos oito microsatélites e três localidades de coleta utilizando o *software* STRUCTURE versão 2.3.2 (Pritchard *et al.*, 2000). Este programa detecta facilmente duas a quatro populações altamente diferenciadas utilizando os logaritmos das probabilidades dos dados para inferir o melhor K com uma estatística ad hoc denominada DeltaK, a qual é baseada na taxa de mudança do logaritmo da probabilidade dos dados entre sucessivos valores de K (Evanno *et al.*, 2005). Para tanto, utilizamos os seguintes parâmetros: Duração do período de *Burn-in*: 10.000; Número de repetições de Cadeia de Markov e Simulação Monte Carlo (MCMC) depois do *Burn-in*: 10.000; Número de Interações: 10 (Dez execuções independentes foram realizadas para cada valor de K variando entre um e dez para testar a consistência das estimativas de $P(X/K)$). Também foram testados os valores de K variando de 1 a 7. O *software online* Structure Harvester (Earl *et al.*, 2012), baseada no método proposto por Evanno e colaboradores (2005), foi utilizado para definir o melhor valor de K (sendo este o que possuir o maior valor para o ΔK). A variabilidade genética de cada população foi estimada através da proporção de loci polimórficos, do número médio de alelos e da diversidade gênica, utilizando o *software* FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001), além da heterozigosidade média esperada ($H_e = \sum H_i/n$). O grau de diferenciação interpopulacional (F_{st}), foi estimado através do *software* FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001). Para todos os testes estatísticos foi estabelecido o nível de significância de 5%.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Morfometria Geométrica

Baseado nas variações morfológicas observadas na asa anterior direita de cada exemplar, todas as amostras foram agrupadas conforme a sua localidade de origem, Matão (MAT), Santa Rita do Passa Quatro (VAS) e Ubatuba (UBA): no entanto em todas as análises observou-se a sobreposição de parte das amostras de VAS e MAT, apontando para a tendência a formação de dois grupos (UBA e MAT+VAS). Os resíduos de Procrustes (Figura 6) apresentaram, em sua maioria, variação isotrópica, se distribuindo de forma circular ao redor do ponto médio. Entretanto, nos marcos 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16 e 17, os resíduos de Procrustes se distribuíram na forma alotrópica. Estas variações apresentadas pelos resíduos de Procrustes, indicam, quando na forma isotrópica, ausência na tendência de variação, podendo esta, estar relacionada tanto à variação casual dos marcos anatômicos quanto a pequenas variações durante o processo de marcação dos pontos, e quando na forma alotrópica, demonstram uma tendência na variação que pode indicar a seleção de uma característica ou a associação de uma característica com outra previamente selecionada. A partir da análise de deformações parciais, observamos que os marcos anatômicos que apresentaram maior variação foram em ordem decrescente: 2, 3, 13 e 4 (Tabela 4).

Figura 6. Configuração consenso dos 18 marcos anatômicos marcados nas interseções das nervuras das asas dos machos de *Euglossa pleosticta*. Pontos pretos representam os resíduos de Procrustes e pontos azuis representam a média dos resíduos de cada marco anatômico.

Tabela 4. Variação relativa de cada marco anatômico.

Marco anatômico	Variação %
1	1,651
2	26,366
3	18,269
4	7,695
5	6,609
6	1,894
7	4,549
8	1,343
9	6,987
10	2,452
11	6,071
12	2,401
13	8,085
14	3,715
15	0,412
16	0,599
17	0,881
18	0,021

Fazendo uso de grades de deformação (*Thin-plate spline*) podemos observar os principais marcos anatômicos responsáveis pela mudança da forma para o Componente Principal (PC) 1 e o PC2 (Figura 7). A partir da análise das grades de deformação, é possível visualizar que para a PC1, a maior variação ocorreu nos marcos 1, 4, 5, 12, 15 e 16, e na PC2 nos marcos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 15, 16 e 18. Estas grades de deformação são formadas por linhas, onde os marcos anatômicos, representados pelos pontos, indicam a forma consenso e o comprimento e a direção das retas indicam o movimento da forma inicial para a correspondente modificação encontrada. Esta variação da forma inicial para forma final é o que gera a deformação observada na grade.

Figura 7. Grades de deformação (*Thin-plate spline*) que ilustram as mudanças ocorridas nas asas em relação a sua forma para a espécie *Euglossa pleosticta*, baseado do Componente Principal 1 (PC1) e 2 (PC2).

Nas Análises de Componente Principal (PCA), que se baseia nos resíduos de Procrustes das coordenadas Cartesianas alinhadas dos 18 marcos anatômicos, foram geradas 32 medidas de deformações relativas (sendo $k = 2n-4$, sendo “k” o número total de deformações relativas e “n” igual ao número de marcos anatômicos). Dentre estas medidas, as 15 primeiras atingiram autovalor igual ou superior a 1, explicando 90% da variabilidade de todo o conjunto de dados, sendo o primeiro Componente Principal responsável pela explicação de 23% da variação e o PC2 (12%) os dois principais eixos de maior variação dentro da amostra (Figura 8).

Figura 8. Representação gráfica da porcentagem da variância das 32 medidas de deformações relativas dos Componentes Principais.

Ao observarmos o gráfico de dispersão (Figura 9), construído a partir dos 2 eixos que mais contribuíram para variação dos grupos na PCA, constatamos que no eixo vertical (PC 2) não houve grande variação em nenhum dos grupos analisados. No entanto no eixo horizontal (PC 1), observamos uma tendência a separação dos grupos de acordo com os locais de coleta das amostras, onde MAT e VAS se sobrepõem,

posicionadas mais à esquerda na figura 9 e as amostras de UBA, tendem a separação, se posicionando mais para o lado direito da mesma figura.

Figura 9. Representação gráfica da Análise de Componente Principal das populações de abelhas da espécie *Euglossa pleosticta*, obtida a partir das análises dos 18 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas. Localidade de coleta: Matão (MAT), Ubatuba (UBA) e Santa Rita do Passa Quatro (VAS).

A partir da matriz de covariância gerada a partir dos resíduos de Procrustes, realizamos a CVA onde encontramos apenas dois eixos (Tabela 5) que maximizam a separação significativa desses grupos. O número de eixos encontrados, se deve ao fato de estarmos trabalhando apenas com amostras de 3 localidade.

Tabela 5. Variação dos dois eixos das Variáveis Canônicas.

Eixo	Autovalores	% Variância	% Acumulativa
1.	3,32466516	67,091	67,091
2.	1,63081856	32,909	100

Também foram calculadas as distâncias de Mahalanobis e distâncias de Procrustes entre os grupos (Tabela 6). Sendo que o menor valor observado tanto para a distância de Mahalanobis quanto para a distância de Procrustes foi entre as localidades de MAT e VAS. Estas localidades também apresentam a menor distância geográfica (85Km). No entanto, o maior valor encontrado para a distância de Mahalanobis, foi entre as localidades de UBA e VAS, entretanto o mesmo padrão não foi observado para a distância de Procrustes e a distância geográfica.

Tabela 6. Distâncias de Mahalanobis (parte inferior) e Procrustes (parte superior), geradas a partir da Análise de Variável Canônica, para as amostras da espécie de *Euglossa pleosticta*. Localidade de coleta: Matão (MAT), Ubatuba (UBA) e Santa Rita do Passa Quatro (VAS).

	MAT	UBA	VAS
MAT	0,00	0,0216	0,0115
UBA	3,82	0.00	0,0212
VAS	3,24	4,42	0,00

Utilizando as medidas de distância de Mahalanobis e distância de Procrustes, construímos dendogramas de proximidade morfológica, pelo método de *Neighbor Joining* (Figura 10). Ambos os dendogramas mostraram uma maior proximidade entre as amostras de MAT e VAS, e as amostras de UBA foi posicionada em um braço mais distante.

Figura 10. Dendrograma de proximidade morfológica, construído a partir das distâncias de Mahalanobis (A) e Procrustes (B) pelo método de *Neighbor-Joining*, para as amostras de *Euglossa pleosticta*. Localidade de coleta: Matão (MAT), Ubatuba (UBA) e Santa Rita do Passa Quatro (VAS).

No gráfico de dispersão, gerado a partir da CVA (Figura 11), observamos uma maior separação dos grupos quando comparado à observada no gráfico de PCA. No entanto, embora na PCA a separação dos grupos tenha sido discreta, esta nos informa que o agrupamento apresentado entre as populações pela CVA não é artificial.

Figura 11. Representação gráfica de Variável Canônica das populações de abelhas da espécie *Euglossa pleosticta*, obtida a partir das análises dos 18 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas. Localidade de coleta: Matão (MAT), Ubatuba (UBA) e Santa Rita do Passa Quatro (VAS).

Considerando a distribuição das amostras no gráfico de dispersão, em relação ao eixo horizontal (CV 1) que é o mais informativo (67% da variabilidade dos dados é explicada nesse eixo), visualizamos uma leve sobreposição das amostras de MAT e VAS do lado direito da figura 11 e mais deslocada para o lado esquerdo posiciona-se a população de UBA, isolada. Já em relação ao eixo vertical (CV 2) as amostras de UBA se posicionam na região mais central, enquanto as amostras de VAS ficam levemente deslocadas para a região superior e as amostras de MAT se localizam na região inferior do gráfico.

As Análises de Função Discriminante (DFA), assim como o teste de validação cruzada, apresentaram elevadas taxas de cerca (superiores a 90%) na classificação dos

indivíduos dentro de seus respectivos grupos (Figura 12), evidenciando grande diferença entre as localidades estudadas. Ao compararmos os valores obtidos para as distâncias de Mahalanobis e as distâncias de Procrustes geradas pelas análises de DFA (Tabela 7) e CVA, observamos pequenas variação entre eles, sendo mantida a mesma proporção de variação entre as diferentes localidades estudadas. Esta informação se torna interessante, quando observamos que no cálculo realizado para a DFA, apenas as matrizes de covariância entre os pares são utilizadas.

Figura 12. Discriminação par a par dos grupos estudados pela Análise de Função Discriminante e pela Validação Cruzada dos dados com as taxas de acerto na identificação.

Tabela 7. Distâncias de Mahalanobis (parte inferior) e Procrustes (parte superior), geradas a partir da Análise de Função Discriminante, para as amostras da espécie de *Euglossa pleosticta*. Localidade de coleta: Matão (MAT), Ubatuba (UBA) e Santa Rita do Passa Quatro (VAS).

	MAT	UBA	VAS
MAT	0,00	0,0215	0,0114
UBA	3,94	0,00	0,0212
VAS	3,40	4,39	0,00

O teste de Mantel indicou ausência de correlação ($r = 0,4283$; $p = 0,5150$) entre as distâncias de Mahalanobis entre os centroides das distribuições dos grupos e as distâncias geográficas.

Afim de conseguir um parâmetro de magnitude da variação morfológica encontrada entre as diferentes localidades de coleta para as abelhas da espécie *E. pleosticta*, introduzimos nas análises amostras de *E. annectans*, as quais foram utilizadas como grupo externo. Então, realizamos a PCA, onde foi construído um gráfico de dispersão a partir dos 2 eixos que mais contribuíram para variação dos grupos (Figura 13). Neste gráfico, constatamos que no eixo vertical (PC 2) as amostras apresentaram tendência à separação, sendo que as amostras de MAT e VAS se sobrepuseram, situando-se na região superior da figura 13, enquanto que as amostras de UBA ficaram mais deslocadas para a região inferior da mesma figura. As amostras de *E. annectans* ficaram totalmente separadas das amostras da outra espécie analisada. Já no eixo horizontal (PC 1), observamos uma clara separação entre as amostras de *E. pleosticta* e *E. annectans*. Na porção superior direita da figura 13, observa-se a completa sobreposição das amostras de MAT e VAS, enquanto que apenas uma pequena parte das amostras destes grupos sobrepuseram as amostras de UBA, a qual se localizou na região inferior direita da mesma figura.

Figura 13. Representação gráfica da Análise de Componente Principal das populações de abelhas das espécies *Euglossa pleosticta* e *Euglossa annectans* (anne), obtida a partir das análises dos 18 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas.

A partir da CVA, calculamos as distâncias de Mahalanobis e distâncias de Procrustes entre os grupos (Tabela 8), onde observamos que o valor das distâncias de Mahalanobis entre as diferentes localidades de *E. pleosticta* e *E. annectans* é cerca de três vezes maiores que o valor encontrado entre as diferentes localidades da mesma espécie. Já as distâncias de Procrustes variam menos entre as mesmas amostras mencionadas, sendo o maior valor dentre as amostras das diferentes localidades de *E.*

pleosticta 0,0216 (MAT e UBA) e o maior valor entre as duas espécies em questão, 0,0392 (anne e UBA).

Tabela 8. Distâncias de Mahalanobis (parte inferior) e Procrustes (parte superior), geradas a partir da Análise de Variável Canônica, para as amostras da espécie de *Euglossa pleosticta* e de *Euglossa annectans* (anne).

	MAT	UBA	VAS	anne
MAT	0	0,0216	0,0115	0,0374
UBA	3,67	0	0,0212	0,0392
VAS	3,17	4,35	0	0,0313
anne	9,49	9,45	8,05	0

A partir das medidas de distância de Mahalanobis e distância de Procrustes, calculadas na CVA, construímos dendogramas de proximidade morfológica, pelo método de *Neighbor Joining* (Figura 14). Em ambos os dendogramas, observamos o mesmo padrão já apresentado para as amostras das três localidades de *Eg. Pleosticta*, onde as amostras de MAT e VAS ficaram mais próximas, enquanto que as amostras de UBA foram posicionadas em um braço mais longo, representando maior distância morfológica em relação às outras localidades. Já as amostras do grupo externo (*E. annectans*), conforme esperado, ficaram isoladas em um braço consideravelmente mais longo.

Figura 14. Dendrograma de proximidade morfológica, construído a partir das distâncias de Mahalanobis (A) e Procrustes (B) pelo método de *Neighbor-Joining*, para as amostras de *Euglossa pleosticta* e de *Euglossa annectans* (anne).

A partir da CVA também construímos um gráfico de dispersão, onde considerando o eixo horizontal (CV 1) que é o mais informativo (responsável pela explicação de 71% da variabilidade dos dados), visualizamos uma completa separação entre as amostras das diferentes espécies. Sendo assim, as amostras de *E. annectans* ficaram localizadas na parte esquerda da figura 15 enquanto que as amostras das diferentes localidades de *E. pleosticta* se posicionaram na lateral direita da mesma figura. Entre as amostras de *E. pleosticta* foi possível observar uma completa separação das localidades UBA e VAS, sendo que a primeira se localizou na região superior da figura e a segunda na região inferior. Na posição mediana, ficaram localizadas as amostras de MAT, as quais sobrepuseram uma área maior das amostras de VAS e uma pequena área das amostras de UBA. Ao considerarmos o eixo vertical (CV 2), também observamos uma completa

separação entre as amostras das diferentes espécies. Considerando apenas as amostras de *E. pleosticta* mais uma vez, visualizamos a tendência à separação dos grupos, sendo que as amostras de UBA se posicionam na parte superior da figura com pequena sobreposição com as amostras de MAT e tanto MAT quanto VAS, se posicionam mais voltadas para a parte inferior da figura, apresentando maior sobreposição.

Figura 15. Representação gráfica de Variável Canônica das populações de abelhas das espécies *Euglossa pleosticta* e *Euglossa annectans* (anne), obtida a partir das análises dos 18 pontos anatômicos marcados nas junções de nervuras das asas.

4.2 Assimetria Flutuante

Após executarmos as análises de Procrustes ANOVA para as coordenadas de forma e para o tamanho dos centroides, constatamos que, com exceção das amostras de MAT que na análise de tamanho do centroide apresentaram diferenças

estatisticamente não significantes ($p=0,852$) para a variável lado. Em todas as outras análises foi constatada a presença de AF de forma e tamanho, e estas foram estatisticamente significativas. Também observamos diferenças estatisticamente significantes na presença de AD de forma e tamanho, assim como para a variação individual nas 3 localidades amostradas.

Para as 3 localidades analisadas, observamos que o valor da média quadrada (MS) do erro que foi calculado pela digitalização das asas marcadas 2 vezes, foi bastante inferior ao valor da MS encontrado para o efeito lado (AD) e para o efeito interação indivíduo x lado (AF). Esta informação confere confiabilidade nos resultados quanto a presença de AF e AD nas populações analisadas, demonstrando que a variação observada não ocorre em decorrência de viés na técnica de marcação dos pontos (Tabela 9).

Após realizarmos as análises de regressão multivariada, obtivemos os valores para os efeitos alométricos, sendo que estes foram baixos tanto para a análise de variação individual quanto AF: UBA (variação individual = 3,56%, $P = 0,0048$ e AF = 4,70 %, $P = 0.0007$); VAS (variação individual = 4,13%, $P = 0,0006$ e AF = 4,05 %, $P = 0,0221$); MAT (variação individual = 3,37, $P = 0,0037$ e AF = 8,88%, $P = <.0001$) (Tabela 10).

Tabela 9. Procrustes ANOVA das coordenadas de forma e tamanho do centróide das asas anteriores de indivíduos de *Euglossa pleosticta* coletados nas cidades de Matão (MAT), Ubatuba (UBA) e Santa Rita do Passa Quatro (VAS).

MATÃO (MAT)

Tamanho do centróide				
Efeitos	MS	Gl	F	p
Individuo	0,831914	76	125,09	<.0001
Lado	0,077471	1	11,65	0,001
Individuo x lado	0,00665	76	12,29	<.0001
Erro	0,00054	154		
Forma (Procrustes ANOVA)				
Efeitos	MS	Gl	F	p
Individuo	5,42E-05	2432	5,71	<.0001
Lado	9,85E-05	32	10,38	<.0001
Individuo x lado	9,49E-05	2432	5,4	<.0001
Erro	1,76E-06	4928		

UBATUBA (UBA)

Tamanho do centróide				
Efeitos	MS	Gl	F	p
Individuo	0,558634	73	121,01	<.0001
Lado	0,110553	1	23,95	<.0001
Individuo x lado	0,004616	73	17,87	<.0001
Erro	0,000258	147		
Forma (Procrustes ANOVA)				
Efeitos	MS	Gl	F	p
Individuo	7,58E-05	2336	9,09	<.0001
Lado	9,57E-05	32	11,47	<.0001
Individuo x lado	8,34E-05	2336	6,13	<.0001
Erro	1,36E-06	4704		

SANTA RITA DO PASSA QUATRO (VAS)

Tamanho do centróide				
Efeitos	MS	Gl	F	p
Individuo	0,558079	75	47,05	<.0001
Lado	0,000415	1	0,04	0,852
Individuo x lado	0,011861	75	30,3	<.0001
Erro	0,000391	151		
Forma (Procrustes ANOVA)				
Efeitos	MS	Gl	F	p
Individuo	6,08E-05	2400	6,66	<.0001
Lado	5,15E-05	32	5,64	<.0001
Individuo x lado	9,13E-05	2400	4,43	<.0001
Erro	2,06E-06	4832		

Tabela 10. Valores referentes à Variação alométrica encontrada para a variação individual e assimetria flutuante (AF) nas três localidades estudadas. (MAT: Matão; UBA: Ubatuba; VAS: Santa Rita do Passa Quatro).

Localidade	Variação individual	P	AF	P
MAT	3,37%	0,0037	8,88%	<.0001
UBA	3,56%	0,0048	4,70%	0,0007
VAS	4,13%	0,0006	4,05%	0,221

4.3 DNA Mitocondrial

Para as amostras de *E. pleosticta*, coletadas nas três localidades de estudo (MAT, VAS e UBA), foram alinhadas e editadas 54 sequências de DNA mitocondrial, resultando em fragmentos de 316pb. Estas sequências estão compreendidas entre os oligo iniciadores mtd26/mtd18 do gene *citB*, com a seguinte composição nucleotídica: C = 12,5%, T = 34,04%, A = 45,9%, G = 7,56%. O padrão da composição nucleotídica observado em nossos dados, com predominância das bases T e A, está de acordo com o esperado para o genoma mitocondrial de insetos (Crozier & Crozier, 1993; Simon *et al.*, 1994). A partir da análise de diversidade genética feita para as três localidades de estudo, construímos a tabela 11 onde reunimos as informações quanto ao número de: indivíduos (N), sítios polimórficos (S), haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π) e número médio de diferenças nucleotídicas (K). Nesta análise, o valor de Hd variou de 0,350 a 0,490 com uma média interpopulacional de Hd = 0,777, enquanto seu π variou de 0,00324 a 0,02002 com valor interpopulacional de π = 0,01636. Também foram encontrados 9 haplótipos diferentes, com 25 sítios variáveis (Tabela 12).

Tabela 11. Diversidade genética das localidades de *E. pleosticta* para os haplótipos do gene mitocondrial *citB*. (N) número de indivíduos; (S) número de sítios polimórficos; (h) número de haplótipos; (Hd) diversidade haplotípica; (π) diversidade nucleotídica; (k) número médio de diferenças. (MAT: Matão; UBA: Ubatuba e VAS: Santa Rita do Passa Quatro).

Localidade	N	S	h	Hd	π	K
VAS	17	11	2	0,404	0,0054	1,48529
UBA	16	8	3	0,35	0,00324	1
MAT	21	30	5	0,49	0,02002	5,08571
Total	54	25	9	0,7771	0.01636	3,74703

Excetuando-se o haplótipo (H2), compartilhado entre VAS e UBA, todos os outros foram exclusivos. Sendo assim, UBA possui dois haplótipos exclusivos (H8 e H9), enquanto MAT possui cinco (H3, H4, H5, H6 E H7) e VAS possui penas um (H1).

Tabela 12. Haplótipos e seus respectivos sítios variáveis. Números diagonais no topo da tabela correspondem à posição em pb dos sítios polimórficos dentro do fragmento do gene *citB*. H2, compartilhado entre VAS e UBA; H8 e H9: UBA; H3, H4, H5, H6 E H7: MAT e H1: VAS. (MAT: Matão; UBA: Ubatuba e VAS: Santa Rita do Passa Quatro).

Haplótipos	10	19	21	22	31	33	49	58	79	92	99	107	108	111	116	139	141	169	188	202	242	254	255	285	288
H1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	C	T	.	.	.
H2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H3	A	T	T	T	T	T	C	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
H4	T	A	A	A	A	A	T	T	C	.	C	.	.	C	.	T	T	.	G	.	.	.	C	.	.
H5	.	.	.	.	.	.	.	A	G	.	.	T	.	.	A	A	A	A	G	C	T	.	T	.	.
H6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.
H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
H8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
H9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T

Segundo a rede de haplótipos (Figura 16) construída baseada nas sequências de DNAm, constatamos que em sua maioria, os haplótipos se diferenciaram pela variação de apenas 1pb (H2/H8, H5/H7), 2pb (H5/H8, H1/H6, H8/H9) ou 3pb (H1/H5). Já as maiores variações de pb encontradas ocorreram entre os haplótipos de MAT (H4/H5, 5pb e H3/H4, 10pb), sendo esta também a localidade que apresentou maior diversidade haplotípica (Hd:0,490). O haplótipos H5 foi o que se posicionou mais centralmente na rede, sendo que todos os outros haplótipos se relacionam com ele.

Figura 16. Rede de haplótipos para o gene *citB* da espécie *E. pleosticta*. O tamanho das esferas representa o número de indivíduos e os pontos entre as esferas representam os sítios polimórficos. H2, compartilhado entre VAS e UBA; H8 e H9: UBA; H3, H4, H5, H6 e H7: MAT e H1: VAS. (MAT: Matão; UBA: Ubatuba e VAS: Santa Rita do Passa Quatro).

A partir das sequências de DNA mitocondrial obtidas para o gene *citB*, construímos dendogramas de proximidade genética, pelo método de *Neighbor Joining* (Figura 17). Neste dendograma, foi possível observar um distanciamento ligeiramente maior das amostras da localidade de VAS em relação às outras duas localidades MAT e UBA.

Figura 17. Dendograma de proximidade genética, construído a partir das sequências do gene *citB* pelo método de *Neighbor-Joining*, para as amostras de *Euglossa pleosticta* das localidades de: Matão (MAT), Santa Rita do Passa Quatro (VAS) e Ubatuba (UBA).

Com auxílio do *software* MEGA (V.5.2), testamos o melhor modelo para a análise do percentual de divergência nucleotídica para o nosso gene, de acordo com o observado em nossas amostras. Sendo assim, o modelo mais adequado foi o Tamura 3 parâmetros. O percentual dos valores calculados para divergência nucleotídica entre os nove haplótipos, variou entre 1,2 a 13%, sendo os maiores valores obtidos nas comparações realizadas com o H3 (Tabela 13).

Tabela 13. Percentual de divergência nucleotídica baseada no modelo Tamura 3-parâmetros (T92), calculado entre os pares de haplótipos. H2, compartilhado entre VAS e UBA; H8 e H9: UBA; H3, H4, H5, H6 e H7: MAT e H1: VAS. (MAT: Matão; UBA: Ubatuba e VAS: Santa Rita do Passa Quatro).

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
H1	0								
H2	0,037	0							
H3	0,098	0,098	0						
H4	0,054	0,049	0,049	0					
H5	0,020	0,016	0,080	0,032	0				
H6	0,037	0,071	0,136	0,089	0,054	0			
H7	0,025	0,020	0,075	0,037	0,004	0,058	0		
H8	0,033	0,012	0,093	0,045	0,012	0,067	0,016	0	
H9	0,041	0,012	0,103	0,054	0,020	0,076	0,024	0,016	0

Com base na matriz de percentual de divergência nucleotídica, geramos um dendograma de proximidade genética (Figura 18), onde observamos que o padrão de agrupamento dos haplótipos corrobora com o observado na rede de haplótipos.

Figura 18. Dendograma de proximidade genética, construído a partir dos dados de percentual de divergência nucleotídica pelo método de *Neighbor-Joining*, para as amostras de *Euglossa pleosticta*. Localidades de: H2, compartilhado entre VAS e UBA; H8 e H9: UBA; H3, H4, H5, H6 E H7: MAT e H1: VAS. (MAT: Matão; UBA: Ubatuba e VAS: Santa Rita do Passa Quatro).

Objetivando conhecer a estruturação genética dos grupos estudados, também foram calculados os valores de *Fst* entre as localidades, aos pares (Tabela 14). Os dados mostraram estruturação genética populacional em todos os casos, sendo o menor nível de diferenciação encontrado entre VAS e UBA (0,48115) e o maior entre VAS e MAT (0,88973), sendo que todos os valores foram estatisticamente significantes ($\alpha < 0,05$).

Tabela 14. Valores de *Fst* calculados (metade inferior da tabela) e significâncias estatísticas (metade superior da tabela) entre os pares de amostras de *E. pleosticta* estudadas. (MAT: Matão; UBA: Ubatuba e VAS: Santa Rita do Passa Quatro).

	MAT	UBA	VAS
MAT	0	<0,00001	<0,00001
UBA	0,51296	0	<0,00001
VAS	0,88973	0,48115	0

Os resultados referentes à análise de variância molecular (AMOVA) estão representados na tabela 15. Quando analisamos todas as populações amostradas como pertencentes a um único agrupamento populacional (Tabela 15-A), podemos observar que a maior porcentagem de variação (61,9%) é encontrada entre tais populações. No entanto, uma alta variação também é encontrada dentro das próprias populações (38,1%) com um valor de covariância entre seus indivíduos (Φ_{st}) igual a 0,61898. Também realizamos a AMOVA baseada na estruturação de dois grupos (UBA e VAS+MAT) (Figura 15-B). Esta estruturação foi proposta, baseado nos dados morfológicos e de DNA microssatélite que apontam para uma maior proximidade morfológica e genética entre as amostras das localidades de MAT e VAS. Apesar de a variação interpopulacional ter sido alta (51,3% de variação; Φ_{sc} 0,63577; $p < 0.05$), esta foi menor que a observada para variação Interpopulacional de um único grupo. Sendo esta a estruturação que melhor representou nossos dados.

Tabela 15. Análise hierárquica de Variância Molecular (AMOVA) baseada nas sequências nucleotídicas de *citB* em *E. pleosticta*.

Estruturação	Fonte de Variação	Variância	% de variação	P	Φ
(A) Único grupo	Interpopulacional	1,45228 Va	61,89		
	Intrapopulacional	0,89417 Vb	38,11	0,00000	Φ_{st} 0,618993
(B) Dois grupos	Intergrupos	0,29324 Va	11,95	0,00000	Φ_{ct} 0,58636
	Interpopulacional	1,26751 Vb	51,63	0,00000	Φ_{sc} 0,63577
	Intrapopulacional	0,89417 Vc	36,42	0,66569+-0,01689	Φ_{st} 0,11946

O teste de Mantel realizado para as amostras das três localidades, demonstrou ausência de correlação ($r = -.5801$; $p = 0.8420$) entre as distâncias genética e geográfica.

4.4 Microssatélites

Ao realizarmos a análise de diversidade genética, observamos que dentre os 16 *loci* de microssatélite testados, apenas oito se apresentaram mais polimórficos, sendo estes os utilizados para a execução deste trabalho. A média dos *loci* mais ricos em número de alelos em ordem decrescente foi: ann08, Egc18, ann02, Egc35, Eln19J, Egc26, Egc17 e Egc24 (Tabela 16). Ao observarmos o *locus* Egc17, toda as amostras de MAT, foram representadas apenas por um alelo, sendo que o mesmo representou 94,4% das amostras de VAS e apenas 8,9% das amostras de UBA. Dentre as 3 localidades estudadas, UBA apresentou o maior número de alelos para a maior parte de *locus*, excetuando-se os *locus* ann08 e Egc35. MAT, apresentou o número mínimo e máximo de variação dos alelos por *locus* e por localidade, sendo de um alelo para o *locus* Egc17 e 14 alelos para o *locus* ann08. No entanto a variação do número médio de alelos entre as três localidades de estudo, não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Também calculamos para todos os *locus* de microsatélite analisados, os parâmetros diversidade gênica (Hd), heterozigosidade esperada (He) e o valor do conteúdo de informação polimórfica (PIC), para as amostras das três localidades estudadas, os quais também podem ser visualizados na tabela 16.

Tabela 16. Parâmetros estimados para as diferentes localidades de coleta de *E. pleosticta*, quanto ao número de alelos (A), diversidade gênica (Hd), heterozigosidade esperada (He), e o conteúdo de informação polimórfica (PIC). O número referente ao total de alelos, apresentado abaixo se refere ao número de alelos sem repetição, de modo que a ocorrência de um dado alelo em mais de uma área foi contabilizada uma única vez. Também calculamos a média de alelos presente por localidade. (MAT: Matão; UBA: Ubatuba e VAS: Santa Rita do Passa Quatro).

	A				Hd			He			PIC		
	MAT	UBA	VAS	Total de alelos	MAT	UBA	VAS	MAT	UBA	VAS	MAT	UBA	VAS
ann02	10	16	3	5	0,603	0,836	0,045	0,412	0,540	0,369	0,365	0,431	0,329
ann08	14	11	13	21	0,884	0,807	0,886	0,884	0,807	0,886	0,863	0,772	0,863
Egc17	1	6	4	15	0	0,708	0,109	0,859	0,831	0,879	0,835	0,795	0,856
Egc18	10	12	10	8	0,786	0,84	0,796	0,000	0,708	0,109	0,000	0,663	0,105
Egc24	5	4	4	9	0,412	0,54	0,369	0,402	0,771	0,363	0,361	0,725	0,326
Egc26	5	9	3	19	0,402	0,771	0,363	0,786	0,840	0,796	0,752	0,813	0,761
Egc35	10	10	12	10	0,859	0,831	0,879	0,501	0,775	0,576	0,456	0,729	0,536
Eln19J	7	8	5	17	0,501	0,775	0,576	0,603	0,836	0,045	0,564	0,806	0,044
Média	7,75	8,75	6,25	12,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Para avaliar o grau de diferenciação populacional entre as localidades estudadas, calculamos os valores do parâmetro Fst da estatística F e p (Tabela 17) para as três localidades analisadas.

Tabela 17. Valores de Fst (diagonal inferior) e p (diagonal superior) calculados pelo FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001) por par de amostras para as três localidades de coleta de *E. pleosticta*. (MAT: Matão; UBA: Ubatuba e VAS: Santa Rita do Passa Quatro).

	MAT	UBA	VAS
MAT	0	0,0167	0,0167
UBA	0,2261	0	0,0167
VAS	0,0207	0,2476	0

Com auxílio do *software* STRUCTURE (versão 2.3.4) (Hubisz *et al.*, 2009), realizamos as simulações de estruturação populacional para nossas amostras. Afim de identificamos o melhor valor de K, utilizamos o *software* STRUCTURE Harvester (Earl *et al.*, 2012), que através da estatística DeltaK nos apresentou o valor de K mais adequado (aquele que apresenta maior valor para o ΔK) para nossas amostras, sendo este K=2, considerando assim duas unidades populacionais (UBA e VAS+MAT) (Figura 19 e Tabela 18).

A partir deste resultado, no *software* STRUCTURE, construímos a figura 20, onde os números na horizontal (eixo x) identificam nossas 3 localidades de estudo (1: MAT, 2: UBA e 3: VAS), o número na vertical (eixo y), representam a probabilidade de cada indivíduo pertencer à unidade populacional onde foi alocado, as barras verticais correspondem às amostras de cada localidade, e as duas cores referem-se às duas unidades populacionais estimadas pelo DeltaK. Quando presente, as linhas verticais de uma única cor significam que 100% do genoma dos indivíduos analisados pertencem a esta unidade populacional. O cálculo estruturação populacional para este agrupamento proposto pelo *software* STRUCTURE, foi realizado pelo FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001) e apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos propostos (F_{st} : 0,166; P: 0,00033).

Figura 19. Estimativa do melhor K (número de unidades populacionais) pela estatística DeltaK calculada com auxílio do *software* STRUCTURE Harvester (Earl, 2012).

Tabela 18: Análise de dados de microsatélite realizada pelo método proposto por Evanno *et al.* (2005) para amostras de três localidades de *E. pleosticta*. K representa o número de unidades populacionais testados e o maior valor de Delta K define o valor de K mais apropriado para a amostragem analisada. Neste caso K=2.

K	Repetições	Média LnP(K)	Delta K
1	10	-35.483.000	NA
2	10	-31.021.900	150.875.311
3	10	-30.705.800	4.677.930
4	10	-31.345.400	0.676600
5	10	-31.171.500	2.088.697
6	10	-31.732.400	1.775.738
7	11	-33.710.455	NA

Figura 20. Número de unidades populacionais (K=2) propostas pelo *software* STRUCTURE (versão 2.3.4) (Hubisz *et al.*, 2009) para as amostras de *E. pleosticta* das três localidades estudadas.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Dentre as três localidades analisadas em nosso trabalho, MAT e VAS apresentaram maior semelhança, tanto morfológica (Morfometria Geométrica) quanto molecular (DNA Microssatélite). Esta proximidade genético-morfológica, corrobora com a distância geográfica presente entre estas localidades, e também com as características ambientais presente nos fragmentos florestais (Tabela 1 e Figura 3). Considerando os três pontos de coleta de amostras, a menor distância geográfica (85 Km) é observada entre MAT e VAS além de ambas possuírem o mesmo tipo de clima (Cwa) segundo Köppen (1948), além de compartilharem o mesmo bioma (Mata Atlântica) e fitofisionomia (Floresta estacional Semidecidual) (Rozza, 2007 & Pivello *et al.*, 2005). A tendência ao agrupamento de MAT e VAS, segundo critérios ambientais como semelhança entre bioma e fitofisionomia corrobora com o observado para as espécies de *E. annectans* e *E. truncata* coletadas em seis fragmentos florestais do Estado de São Paulo, que embora tenham apresentado grande sobreposição de amostras na CVA, foi possível visualizar a tendência ao agrupamento das amostras conforme os critérios mencionados acima (Grassi-Sella *et al.*, submetido).

Ambas as técnicas revelaram grande diferenciação entre as amostras e a tendência a separação de dois grupos (UBA e MAT +VAS), o que não é comum em populações de abelhas da tribo Euglossini, uma vez que trabalhos prévios caracterizaram este grupo como sendo formado por grandes populações com baixa ou nenhuma estruturação populacional, alta taxa de diversidade genética e fluxo gênico, além de possuírem baixíssima incidência de machos diploides (Souza, *et al.*, 2010; Rocha-Filho *et al.*, 2013; Boff *et al.*, 2014). Rocha-Filho e colaboradores (2013) ao

analisarem com ferramentas moleculares quatro espécies de Euglossini, coletadas em duas regiões do sudeste do Estado de São Paulo, (Picinguaba (continente) e Ilha Anchieta), relataram a ausência de diferenciação genética significativa entre as amostras coletadas tanto no continente quanto na ilha. Este padrão foi observado para as espécies *Euglossa cordata*, *Eulaema cingulata* e *Eulaema nigrita*. No entanto, para *Euglossa stelfeldi* foi observada uma diferenciação genética significativa. Esta ausência de estruturação populacional observada para três das quatro espécies estudadas, corrobora com estudos prévios realizados para este grupo, já a estruturação populacional observada para *Euglossa stelfeldi*, corrobora com nossos dados obtidos para *E. pleosticta*.

Tal padrão de agrupamento, baseado em proximidade geográfica e semelhanças ambientais, também foi encontrado por Bonatti e colaboradores (2014), para *Melipona subnitida*, coletadas em diferentes locais do Nordeste brasileiro. Estas amostras foram analisadas com auxílio de ferramentas de morfometria geométrica e moleculares, sendo que ambos os resultados apontaram para a presença de pelo menos duas linhagens evolutivas, as quais foram coerentes quanto à distância geográfica e condições ambientais presentes, demonstrando então a existência de ecotipos. Da mesma forma, Francoy e colaboradores (2011), baseado em dados morfológicos e moleculares, de amostras de *Melipona beecheii*, coletadas no México, Guatemala, El Salvador, Nicarágua e Costa Rica, além de encontrarem elevada variabilidade entre as localidades estudadas, também relataram ter encontrado, neste grupo de abelhas, a presença de ecotipos localmente adaptados.

Quando analisamos nossos dados de Morfometria Geométrica e DNA microssatélite, observamos grande concordância entre os marcadores em relação ao agrupamento proposto para nossas amostras. Na Morfometria Geométrica, todas as análises apontaram para o posicionamento de nossas localidades em dois grupos, sendo que mesmo na PCA e na CVA, que demonstraram grande tendência a separação das amostras quanto a localidade de origem, a sobreposição de parte das amostras de MAT e VAS foi mantida. Os dendogramas de proximidade morfológica construídos a partir das distâncias de Mahalanobis e Procrustes, também posicionaram as amostras de MAT e VAS em braços mais curtos, o que significa maior proximidade morfológica, enquanto as amostras de UBA se posiciona em um braço consideravelmente mais longo. Ao incluirmos as amostras de *E. annectans* como grupo externo, observamos a manutenção dos resultados observados anteriormente, sem alteração de padrão ou grandeza de nossos resultados. Nas análises envolvendo microssatélites de DNA, utilizamos o método de agrupamento bayesiana para determinar a provável estruturação populacional das amostras coletadas em diferentes localidades. Desta forma então encontramos o valor de $k=2$, considerando assim a existência de duas unidades populacionais (UBA e VAS+MAT) (Figuras 19 e 20 e Tabela 18). Esta estruturação proposta pelos *softwares* STRUCTURE versão 2.3.2 (Pritchard *et al.*, 2000) e STRUCTURE Harvester (Earl *et al.*, 2012), foi estatisticamente significativa ($P: 0,00033$). O teste de F_{st} realizado par a par, apresentou valores altos segundo Wright (1978) entre as localidades de UBA e VAS (0,25), e UBA e MAT (0,23), ambos com p estatisticamente significativa (0,0167), o que indica forte diferenciação genética entre os grupos. No entanto, o mesmo teste realizado entre as localidades MAT e VAS (0,021; $p= 0,0167$) apresentou ausência de diferenciação genética entre estes grupos.

Sendo assim, o fato de nossos dados corroborarem quanto ao padrão de agrupamento, e as variáveis de distância geográfica e ambientais para as localidades analisadas, nos demonstram um interessante padrão de rastreabilidade ambiental, sendo este semelhante ao observado por Mendes *et al.* (2007), Francisco *et al.* (2008), Bischoff *et al.* (2009), Franco *et al.* (2011) e Bonatti *et al.* (2014) para diferentes espécies de abelhas. Desta forma, nossos dados nos levam a considerar a existência de ecotipos localmente adaptados dentro da espécie *E. pleosticta*. Uma possível hipótese para explicar esta ocorrência é a plasticidade fenotípica, que é a capacidade de um único genótipo expressar uma gama de fenótipos em resposta a variações ambientais (Fordyce, 2006). Sendo esta muito comum em insetos e frequentemente altamente adaptativa (Whitman *et al.*, 2009).

A plasticidade fenotípica pode ser considerada uma importante ferramenta adaptativa para a sobrevivência em ambientes instáveis e heterogêneos (Parsons, 1990), incluindo aqueles que variam devido à interferência humana. Segundo Markow (1995), outra fonte de variação fenotípica é o ruído de desenvolvimento, o qual refere a modificações no programa de desenvolvimento normal, sendo que a AF é o índice mais comumente utilizado para descrever as variações fenotípicas causadas pelo ruído do desenvolvimento. A AF pode ser definida como pequenos desvios aleatórios da perfeita simetria, ocorrido em organismos de simetria bilateral (Parsons, 1990, Graham *et al.*, 2010). Em organismos bilaterais, o mesmo gene é responsável pela expressão de uma característica em ambos os lados do organismo, desta forma, qualquer assimetria observada entre os lados é em consequência da perturbação ambiental. Sendo assim, a AF pode ser um bom indicador de níveis de estresse ou impacto ambiental (Markow, 1995).

Baseado nas análises de morfometria geométrica e DNA de microsatélite, observamos grande semelhança entre as localidades de MAT e VAS. No entanto é relevante destacar que em VAS, realizamos coletas em 3 glebas diferentes do Parque estadual do Vassununga, sendo que duas delas possuem as características ambientais compartilhadas com MAT enquanto que a gleba Pé-de-gigante, difere quanto ao bioma (cerrado) e a fitofisionomia (Campo de Várzea e Cerradão), de MAT e UBA. Segundo Kanegae & Lomônaco (2003) os níveis de AF podem ser influenciados por algumas variáveis como: endogamia, heterozigosidade e recombinação, juntamente com os efeitos ambientais. Sendo que variação de temperatura, déficit de recursos e poluentes químicos podem aumentar o número de erros durante o desenvolvimento e gerar variação individual e assimetrias (Klingenberg & McIntyre, 1998, Klingenberg, 2003 e 2015).

Apesar de nossos locais de estudo variarem quanto bioma, fitofisionomia, clima entre outros, encontramos taxas significativas de AF para as três localidades estudadas, sendo que o maior valor foi apresentado por MAT. Embora cada localidade tenha a sua particularidade ambiental, é relevante destacar que a localidade denominada MAT, representa as amostras coletadas na Mata da Virgínia, a qual está localizada dentro da Fazenda Cambuhy Agrícola Ltda. Este é um detalhe relevante, ao observarmos que nesta fazenda existem grandes plantios comerciais de café, laranja e borracha natural. Sendo assim, apesar de as abelhas desta localidade terem sido coletadas dentro de uma reserva, esta encontra-se dentro de uma área agrícola, onde o uso de agrotóxicos é rotineiro.

Rosa e colaboradores (2016), ao trabalharem com a espécie de abelha nativa *Scaptotrigona* aff. *Depilis*, observaram que administrando o neonicotinóide tiametoxam

durante o estágio larval, obtiveram alterações nos parâmetros biológicos do grupo além da presença de indivíduos menores e assimétricos. Ferreira (2016), também encontrou taxas significativas de AF e AD em abelhas das espécies *Centris analis* e *Centris tarsata* coletadas em pomares de acerola, os quais utilizam agrotóxico na plantação. Nossos dados também corroboram com Silva e colaboradores (2009), que ao estudarem duas espécies da tribo Euglossini (*E. nigrita* e *E. pleosticta*) coletadas na floresta, observaram a presença de AF e AD. Esta variação na simetria foi atribuída pelos autores às variáveis climáticas, e interferência antrópica que atuaram durante o desenvolvimento destas abelhas. Sendo assim, nossos dados levam a crer que diferentes fontes de perturbações (ambientais e antrópica) vem afetando as abelhas das três localidades contempladas pelo nosso estudo.

A partir das análises de DNA mitocondrial, observamos que nossos valores obtidos para diversidade haplotípica (H_d :0,777) foi próximo a observada por Frantini-Silva e colaboradores (2016) (H_d : 0,793) e Penha e colaboradores (2015) (H_d :0,762) para amostras de *E. iopoecila*, sendo estes valores considerados altos (Frantini-Silva *et al.*, 2016). No entanto a variação de H_d dentro das localidades de estudo variou de 0,350 a 0,490, sendo estes valores inferiores aos observados por López-Urbe (2014), para três espécies da tribo Euglossini: *Eulaema bombiformis* (0,708 a 0,989), *Eulaema meridiana* (0,857 a 1) e *Eulaema cingulata* (0,887 a 0,989).

Para diversidade nucleotídica (π), observamos variação intrapopulacional de 0,00324 a 0,02002 com média interpopulacional de $\pi = 0,01636$. Estes valores foram superiores aos observados por Penha *et al.*, 2015 para *E. iopoecila* (0,0013 a 0,0087, média: 0,0033). Em nossas sequências de 316pb amplificada pelos oligos iniciadores

mtd26/mtd28 na região citB do Dna mitocondrial, encontramos 25 sítios variáveis, e 9 haplótipos diferentes. O mesmo número de sítios variáveis foi observado por Penha e colaboradores (2015) para a espécie *E. iopoecila*, após a amplificação de sequência do citB de 651pb, flanqueada pelos primers CB-J-10612 e CB-N-11367 (Simon *et al.*, 1994). No entanto, neste trabalho foram encontrados 30 haplótipos para amostras coletadas em 6 localidades distribuídas entre os estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná. Já no trabalho desenvolvido por Frantini-Silva e colaboradores (2016), realizado também com *E. iopoecila*, coletadas em 5 localidades no Estado de São Paulo, utilizando a mesma sequência mitocondrial e os mesmos marcadores do trabalho anterior, relataram a ocorrência de apenas 11 haplótipos, sendo estas condições e resultados mais condizente com o observado em nossos dados. Possivelmente a grande variação de haplótipos observada por Penha e colaboradores (2015), esteja relacionada com a maior número de locais de coleta, ao comparar com nosso estudo e com o realizado por Frantini-Silva e colaboradores (2016). A variação haplotípica observada entre os dois trabalhos (Penha *et al.*, 2015 e Frantini-Silva *et al.*, 2016) mencionados, chama a atenção, uma vez que o número de haplótipo encontrado dentro da mesma espécie de abelha (*E. iopoecila*), triplica ao variar a quantidade e os locais de coleta. Esta variação reafirma a grande diversidade presente no grupo.

Dos nove haplótipos encontrados em nossas amostras, apenas um não foi exclusivo (H2), compartilhado entre VAS e UBA, sendo que este encontra-se a apenas um passo mutacional dos haplótipos de UBA e sete passos mutacionais dos haplótipos de Vassununga. A menor distância entre haplótipos foi de um passo mutacional (H2 e H8; H7 e H5) e a maior foi de 20 passos mutacionais (H3 e H6). MAT foi a localidade que apresentou maior número de haplótipos e a maior quantidade de passos mutacionais

entre eles. O grande número de haplótipos exclusivos, reflete a grande variabilidade presente entre nossas amostras e pode estar relacionada com uma das principais características das abelhas da tribo Euglossini, a elevada capacidade de dispersão (Janzen, 1971; Tonhasca *et al.*, 2003; Dick *et al.*, 2004, Wikelski *et al.*, 2010) feita via macho, uma vez que a fêmea apresenta comportamento filopátrico (Augusto & Garófalo, 2004; Zimmermann *et al.*, 2009; Cerântola *et al.*, 2010; Rocha-Filho *et al.*, 2013). O H5 foi o que se posicionou mais centralmente na rede. O padrão de posicionamento dos haplótipos na rede, pode revelar informações quanto a ancestralidade, sendo que segundo Templeton e colaboradores (1992), os haplótipos encontrados no interior da rede, correspondem aos ancestrais, e estes ficam rodeados por multifurcações que representam as várias mutações que ocorreram em tempos diferentes e originaram os haplótipos descendentes, os quais devem ser encontrados nas extremidades. Também é esperado que haplótipos ancestrais sejam melhores distribuídos geograficamente em relação aos haplótipos recentes, devido ao seu maior tempo de dispersão. Desta forma, podemos supor que o H5, seja o provável haplótipo ancestral a medida que todos os outros haplótipos estão relacionados a ele.

No cálculo de divergência nucleotídica entre nossas amostras, a divergência intraespecífica variou de 1,2 a 13%, sendo os maiores valores obtidos nas comparações realizadas com o H3, que é o haplótipo posicionado mais distante em relação a todos os outros. Estes valores surpreendem, ao analisarmos segundo o proposto por Hebert e colaboradores (2003a), onde citam que o limiar para variação intraespecífica é entre 2 e 3% de divergência nucleotídica, enquanto que o limiar para o diagnóstico de espécie é 3%, com exceção de espécies proximamente relacionadas devido a uma origem recente, sendo a média de divergência entre indivíduos do mesmo gênero 6,8% (Hebert

et al., 2003b). Trabalhos realizados com diferentes espécies de abelhas, corroboram com este limiar (Brito & Arias 2010; Brito *et al.*, 2013; Bonatti *et al.*, 2014; Teixeira, 2015). No entanto, nossos dados apresentam valores superiores ao estabelecido, acreditamos que isto tenha ocorrido, pelo fato de trabalharmos com a região mitocondrial do *citB*, a qual é muito mais variável que o *COI*, região esta utilizada por Hebert e colaboradores (2003; 2003b) para designar os padrões mencionados acima. Outro ponto a ser considerado é que segundo Cognato (2006), após realizar um trabalho de revisão envolvendo 62 estudos com insetos, observou que em 28 dos casos, os intervalos de variação interespecífico e intraespecífico de genes mitocondriais se sobrepõem e em poucos casos o limiar de 2% proposto por Hebert é atendido.

Ao considerarmos o dendograma de proximidade genética, verificamos que a localidade de VAS está ligeiramente mais distante das outras, se posicionando em um braço pouco mais longo, já a distância entre UBA e MAT é proporcional. Este posicionamento pode estar relacionado ao fato de as amostras de VAS terem sido coletadas em dois biomas diferentes (Mata Atlântica e Cerrado), enquanto que as amostras de MAT e UBA foram coletadas no mesmo bioma (Mata Atlântica). A análise de *F_{st}* feita par a par, apresentou resultados estatisticamente significativos e demonstrou elevada diferenciação genética entre as localidades (tabela 14), em vista que segundo Wright (1978), valores de *F_{st}* entre 0,05 até 0,15 são indicativos de diferenciação genética moderada entre pares de populações. Os elevados valores de *F_{ST}* encontrados para nossas amostras, corroboram com o observado para outras espécies de Euglossini (Penha *et al.*, 2015; Frantini-Silva *et al.*, 2016).

Os resultados referentes à análise de variância molecular (AMOVA) estão representados na tabela 15. Quando analisamos todas as populações amostradas como

pertencentes a um único agrupamento populacional (Tabela 15-A), podemos observar que a maior porcentagem de variação (61,9%) é encontrada entre tais populações. No entanto, uma alta variação também é encontrada dentro das próprias populações (38,1%) com um valor de covariância entre seus indivíduos (Φ_{st}) igual a 0,61898. Também realizamos a AMOVA baseada na estruturação de dois grupos (UBA e VAS+MAT) (Tabela 15-B). Esta estruturação foi construída, baseado na estruturação proposta pelos dados de morfometria geométrica e DNA microssatélite. Apesar de a variação interpopulacional ter sido alta (51,3% de variação; Φ_{sc} 0,63577; $p < 0.05$), esta foi menor que a observada para variação Interpopulacional na amostra global, sendo esta a estrutura que melhor representou nossos dados para este marcador (DNA mitocondrial). O teste de Mantel demonstrou ausência de correlação ($r = -.5801$; $p = 0.8420$) entre as variáveis distâncias genéticas e geográficas, para as três localidades estudadas. Sendo assim, a elevada diferenciação apresentada pelo F_{st} e AMOVA, não está relacionada com a distância geográfica presente entre as amostras estudadas.

Possivelmente o padrão observado por nossos dados, pode estar relacionado com o fato de trabalharmos com fragmentos florestais, uma vez que alguns trabalhos (Tonhasca *et al.*, 2003; Brosi, 2009) vêm demonstrando que o desflorestamento e a fragmentação de habitat podem atuar como barreira para a dispersão de algumas espécies da tribo Euglossini, tornando-as susceptíveis a estes processos (Roubik & Hanson 2004; Cerântola *et al.*, 2010). Milet-Pinheiro & Schlindwein (2005), ao observarem machos de 16 espécies de Euglossini em diferentes pontos que variavam do interior de um fragmento de Mata Atlântica a 500m adentrando uma plantação de cana de açúcar, observaram que apenas duas espécies de Euglossini (*Eulaema nigrata* e *Euglossa cordata*) saíram da mata e sobrevoaram a região de monocultura. Em outro

trabalho realizado na floresta Amazônia, também observou que a conversão de áreas de floresta em pastagem (fragmentação de áreas florestais), estava funcionando como barreira na dispersão de machos de Euglossini (Powell & Powell, 1987). Ademais, evidências demonstram que a diversidade de espécies de abelhas da tribo Euglossini também é negativamente afetada pela fragmentação de habitat (Brosi, 2009). No entanto, também já foi demonstrado que a mobilidade das abelhas da tribo Euglossini, quando em ambientes fragmentados, pode variar bastante dependendo da espécie analisada, sendo que para algumas o ambiente fragmentado impede o fluxo gênico, enquanto que para outras espécies da mesma tribo, o ambiente fragmentado não representa barreira para a manutenção do fluxo gênico (Suní & Brosi 2012).

O agrupamento proposto para nossas amostras, segundo a análise de microsatélite, difere da estruturação apresentada segundo os dados mitocondriais, o qual nos mostrou que trabalhamos com três localidades com alta diferenciação genética, dado este suportado pelos testes de Fst e AMOVA. Esta divergência entre marcadores moleculares, quanto à estruturação populacional e diversidade genotípica, já foi reportada anteriormente por López-Urbe e colaboradores (2014), ao estudarem três espécies de Euglossini (*Eulaema bombiformis*, *Eulaema meriana* e *Eulaema cingulata*). No entanto, de acordo com Wang (2010) o uso combinado de marcadores nucleares e mitocondriais para estudo de genética de população pode colaborar para um melhor entendimento da distribuição da variação genética através das diferentes escalas, temporal e espacial, uma vez que os marcadores de microsatélite são informativos quanto ao processo recente de microevolução ou em andamento, enquanto os marcadores mitocondriais são mais adequados para processos históricos.

As análises de diferenciação morfológica, nos indicaram a tendência a formação de dois grupos, sendo que os valores apresentados para as distâncias de Mahalanobis e Procrustes sempre foram menores entre as localidades de VAS e MAT além do mais, nas análises discriminantes e de validação cruzada, assim como nos dendogramas de proximidade morfológica, estas duas localidades se apresentaram mais próximas em relação à quando comparadas com UBA.

Com relação a variação nos resultados observados entre os marcadores mitocondrial e microsatélite, acreditamos estar atribuída ao fato destes nos relatarem histórias diferentes, em função da natureza evolutiva de cada um. Sendo assim, o DNA mitocondrial possui elevada taxa de evolução quando comparado com o DNA nuclear, devido à baixa eficiência do sistema de reparo na mitocôndria e a alta exposição a radicais livres gerados durante o processo de respiração (Arias *et al.*, 2001). No entanto, essa taxa é inferior quando comparada com os microsatélites, os quais possuem as mais altas taxas de mutação do genoma (Oliveira *et al.*, 2006). Além do mais, o marcador mitocondrial se restringe a herança materna, e em nosso estudo apontou para a diferenciação genética entre as três localidades estudadas. De forma diferente, o marcador de microsatélite demonstrou a presença de fluxo gênico entre as localidades de VAS e MAT (que distam em 85Km), o que pode ser facilmente explicado em função da elevada capacidade de voo apresentada pelas abelhas da tribo Euglossini (Janzen, 1971; Tonhasca *et al.*, 2003; Dick *et al.*, 2004; Wikelski *et al.*, 2010), onde apesar de as fêmeas apresentarem comportamento filopátrico (Augusto & Garófalo, 2004; Zimmermann *et al.*, 2009; Cerântola *et al.*, 2010; Rocha-Filho *et al.*, 2013), a dispersão é feita via macho, os quais percorrem grandes distâncias (Pokorný *et al.*, 2015) em busca

de compostos multiflorais e não florais, os quais posteriormente serão usados no comportamento de corte (Dressler, 1982; Eltz *et al.*, 2005).

O fato de termos encontrado estruturação populacional para nossas amostras de *E. pleosticta*, contraria o observado em diversos trabalhos realizados com diferentes espécies de Euglossini (Zimmermann *et al.*, 2011; Cerântola *et al.*, 2010; Souza *et al.*; 2010; Suni & Brosi, 2011; Boff, 2014; Rocha-Filho, 2013; Suni *et al.*, 2014; Penha *et al.*, 2015). Sendo que de acordo com Souza e colaboradores (2010), baseado em dados de microsatélites, mesmo entre populações que distam 500 km, esta diferenciação pode ser insignificante. Cerântola e colaboradores (2010) também relatam não ter encontrado valores de F_{st} significantes em distâncias superiores a 440 Km. Porém, por outro lado, assim como o observado em nossas análises, Suni e Brosi (2011) relataram uma alta estruturação populacional para a espécie *Eulaema bombiformis*. Valores de F_{st} significantes, também foram encontrados por Zimmermann e colaboradores (2011) e Freiria e colaboradores (2012), estudando populações de *Eufriesia violacea* e *Euglossa dilemma* respectivamente, presentes em fragmentos com distancias de 130 a 850 km.

A variação apontada pelos trabalhos acima quanto à estrutura populacional das abelhas Euglossini, nos mostram que além de estas abelhas variarem quanto ao tamanho do corpo, coloração, comportamento e tipo de recursos utilizados (Roubik & Hanson, 2004), também parecem variar quando ao nível de fluxo gênico presente entre as diferentes espécies (Suni *et al.*, 2014). Sendo assim, segundo Suni e colaboradores (2014), o padrão de dispersão deste grupo pode ser espécie-específico, embora para qualquer tipo de conclusão, são necessários mais estudos envolvendo estas abelhas e buscando determinar até que ponto as diferenças existentes são interespecíficas ou intergênicas (Suni *et al.*, 2014).

Conclusão

6 CONCLUSÃO

- ✓ A técnica de morfometria geométrica foi eficiente na diferenciação das localidades de coleta das amostras de *E. pleosticta*, demonstrando tendência ao agrupamento condizente com os padrões ambientais das localidades estudadas;
- ✓ As distâncias morfológicas entre as localidades e o padrão de agrupamento, se mantiveram mesmo após a introdução de amostras de *E. annectans*, como grupo externo nas análises;
- ✓ A técnica de morfometria geométrica apresentou elevada taxa de acerto (superior a 90%) tanto nas análises discriminantes, quanto na validação cruzada, sendo bastante indicada em trabalhos que busquem a identificação e separação de amostras de população;
- ✓ Para nossas amostras, a presença de AF e AD independeu do tipo de bioma, fitofisionomia ou clima da localidade analisada, apresentando valores de p estatisticamente significante ($p < 0,05$) para todas as localidades estudadas. Sendo assim, estes dados demonstram que diferentes fontes de perturbações (ambientais e antrópica) podem estar afetando as abelhas das três localidades de estudo;
- ✓ Nas análises envolvendo marcadores mitocondriais, baseado na análise de F_{st} observamos elevada diferenciação genética entre as localidades e a partir da análise de variância molecular (AMOVA), observada que a estrutura que melhor representou nossos dados foi a de variação Interpopulacional na amostra global;

- ✓ Baseado nas análises envolvendo marcadores de microssatélites de DNA, a estruturação populacional proposta para nossas amostras baseado na análise de agrupamento bayesiana foi de $K=2$;
- ✓ Os marcadores morfológicos (morfometria geométrica) e molecular (DNA microssatélite), foram congruentes quanto a separação das amostras em dois grupos (UBA e MAT + VAS). Este agrupamento condiz com características de bioma, fitofisionomia, clima e menor distância geográfica entre as localidades agrupadas;
- ✓ Devido a variação observada para as amostras de *E. pleosticta*, em função da localidade de coleta e estas variarem quanto a fatores ambientais, nossos dados nos levam a considerar a existência de ecotipos localmente adaptados dentro desta espécie.
- ✓ A partir da discordância observada em nossas análises entre os marcadores moleculares, sugerimos o uso combinado de marcadores nucleares e mitocondriais para estudo de genética de população, visando um melhor entendimento da distribuição da variação genética através das diferentes escalas, temporal e espacial, uma vez que os marcadores de microssatélite são informativos quanto ao processo recente de microevolução ou em andamento, enquanto os marcadores mitocondriais são mais adequados para processos históricos.

Referências bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ab'Sáber, A. N. (1981). Domínios morfoclimáticos atuais e quaternários na região dos cerrados. *Craton Intracr*, 14, 1-39.

Ackerman, J. D. (1983). Specificity and mutual dependency of the orchid-euglossine bee interaction. *Biological Journal of the Linnean Society*, 20(3), 301-314.

Ackerman, J. D., Mesler, M. R., Lu, K. L., & Montalvo, A. M. (1982). Food-foraging behavior of male Euglossini (Hymenoptera: Apidae): vagabonds or trapliners? *Biotropica*, 241-248.

Adams, D. C., Rohlf, F. J., & Slice, D. E. (2004). Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology*, 71(1), 5-16.

Arias, M. C., & Infante-Malachias, M. R. (2001). O Emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. *MATIOLI, SR Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos Editora*, 143-152.

Arias, M. C., Rinderer, T. E., & Sheppard, W. S. (2006). Further characterization of honey bees from the Iberian Peninsula by allozyme, morphometric and mtDNA haplotype analyses. *Journal of apicultural research*, 45(4), 188-196.

Armbruster, W. S., & Webster, G. L. (1979). Pollination of two species of Dalechampia (Euphorbiaceae) in Mexico by euglossine bees. *Biotropica*, 278-283.

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: 162-173. DOI: 10.1051/apido/2010040.

Avise, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of biogeography*, 36(1), 3-15.

Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 489-522.

Aytekin, M. A., Terzo, M., Rasmont, P., & Çağatay, N. (2007). Landmark based geometric morphometric analysis of wing shape in *Sibiricobombus* Vogt (Hymenoptera:

Apidae: Bombus Latreille). In *Annales de la Société Entomologique de France* (Vol. 43, No. 1, pp. 95-102). Taylor & Francis Group.

Becker, P., Moure, J. S., & Peralta, F. J. (1991). More about euglossine bees in Amazonian forest fragments. *Biotropica*, 586-591.

Besansky, N. J., & Fahey, G. T. (1997). Utility of the white gene in estimating phylogenetic relationships among mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Molecular Biology and Evolution*, 14(4), 442-454.

Bischoff, I., Schröder, S., & Misof, B. (2009). Differentiation and range expansion of North American squash bee, *Peponapis pruinosa* (Apidae: Apiformes) populations assessed by geometric wing morphometry. *Annals of the Entomological Society of America*, 102(1), 60-69.

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.

Bonatti, V., Simões, Z. L. P., Franco, F. F., & Franco, T. M. (2014). Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. *Naturwissenschaften*, 101(1), 17-24.

Bookstein, F. L. (1991). Thin-plate splines and the atlas problem for biomedical images. In *Biennial International Conference on Information Processing in Medical Imaging* (pp. 326-342). Springer Berlin Heidelberg.

Borlaug, N. E. (2002). Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38(2), 221-228.

Brito, R. M., & Arias, M. C. (2010). Genetic structure of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) from Neotropical Atlantic rainforest. *Insectes sociaux*, 57(4), 413-419.

Brito, R. M., Francisco, F. D. O., Franço, E., Santiago, L. R., & Arias, M. C. (2013). Very low mitochondrial variability in a stingless bee endemic to cerrado. *Genetics and molecular biology*, 36(1), 124-128.

Brito, R. M., Francisco, F. O., Domingues-Yamada, A. M. T., Gonçalves, P. H. P., Pioker, F. C., Soares, A. E. E., & Arias, M. C. (2009). Characterization of microsatellite loci of *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Conservation Genetics Resources*, 1(1), 183-187.

Brosi, B. J. (2009). The effects of forest fragmentation on euglossine bee communities (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Biological Conservation*, 142(2), 414-423.

Brusca, R. C., & Brusca, G. J. (2007). Invertebrados. Segunda edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Buchmann, S. L. (1980). Preliminary anthecological observations on *Xiphidium caeruleum* AUBL. (Monocotyledoneae: Haemodoraceae) in Panama. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 685-699.

Búrquez, A. (1997). Distributional limits of euglossinae and meliponine bees (Hymenoptera, Apidae) in Northwestern Mexico. *Pan-Pacific Entomology*, 73: 137- 140.

Cameron, S. A. (2004). Phylogeny and biology of Neotropical orchid bees (Euglossini). *Annual Reviews in Entomology*, 49(1), 377-404.

Cappellari, S. C., Harter-Marques, B., Aumeier, P., & Engels, W. (2009). *Mecardonia tenella* (Plantaginaceae) Attracts Oil-, Perfume-, and Pollen-Gathering Bees in Southern Brazil. *Biotropica*, 41(6), 721-729.

Castro, A. A. J. F., & Martins, F. R. (1999). Cerrados do Brasil e do Nordeste: caracterização, área de ocupação e considerações sobre a sua fitodiversidade. *Pesquisa em foco*, 7(9), 147-178.

Cerântola, N. D. C. M., Oi, C. A., Cervini, M., & Del Lama, M. A. (2010). Genetic differentiation of urban populations of *Euglossa cordata* from the state of São Paulo, Brazil. *Apidologie* 42 (2), 214–222. doi:10.1051/apido/2010055

Clarke, G. M. (1995). Relationships between developmental stability and fitness: application for conservation biology. *Conservation Biology*, 9(1), 18-24.

Clarke, G. M., Brand, G. W., & Whitten, M. J. (1986). Fluctuating asymmetry: a technique for measuring developmental stress caused by inbreeding. *Australian Journal of Biological Sciences*, 39(2), 145-154.

Clarke, K. E., Oldroyd, B. P., Javier, J., Quezada-Euán, G., & Rinderer, T. E. (2001). Origin of honeybees (*Apis mellifera* L.) from the Yucatan peninsula inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular ecology*, 10(6), 1347-1355.

Cognato, A. I. (2006). Standard percent DNA sequence difference for insects does not predict species boundaries. *Journal of Economic Entomology*, 99(4), 1037-1045.

Collet, T., Cristino, A. S., Quiroga, C. F. P., Soares, A. E. E., & Del Lama, M. A. (2009). Genetic structure of drone congregation areas of Africanized honeybees in southern Brazil. *Genetics and molecular biology*, 32(4), 857-863.

Collet, T., Ferreira, K. M., Arias, M. C., Soares, A. E. E., & Del Lama, M. A. (2006). Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI–COII patterns. *Heredity*, 97(5), 329-335.

Collevatti, R. G., Grattapaglia, D., & Hay, J. D. (2001). Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10(2), 349-356.

Coutinho, L. M. (1978). O conceito de Cerrado. (The concept of Cerrado.). *Revista brasileira de botânica*, 1(1), 17-23.

Crozier, R. H., & Crozier, Y. C. (1993). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, 133(1), 97-117.

Dayanandan, S., Bawa, K. S., & Kesseli, R. (1997). Conservation of microsatellites among tropical trees (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 84(12), 1658-1658.

De Anna, E. B., Bonisoli-Alquati, A., & Mousseau, T. A. (2013). The use of fluctuating asymmetry as a measure of environmentally induced developmental instability: A meta-analysis. *Ecological Indicators*, 30, 218-226.

De Oliveira Silva, R. A. (2006). *A morfometria geométrica e a diferenciação de espécies do gênero Plebeia (Apidae, Meliponini)* Monografia apresentada a FFCLRP. 42p.

De Souza, D. A., Wang, Y., Kaftanoglu, O., De Jong, D., Amdam, G. V., Gonçalves, L. S., & Franco, T. M. (2015). Morphometric Identification of Queens, Workers and Intermediates in In Vitro Reared Honey Bees (*Apis mellifera*). *PloS one*, 10(4), e0123663.

Dick, C. W., Roubik, D. W., Gruber, K. F., & Bermingham, E. (2004). Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. *Molecular Ecology*, 13(12), 3775-3785.

Diniz, N. M., Soares, A. E. E., Sheppard, W. S., & Del Lama, M. A. (2003). Genetic structure of honeybee populations from southern Brazil and Uruguay. *Genetics and Molecular Biology*, 26(1), 47-52.

Dressler, R. L. (1968). Pollination by euglossine bees. *Evolution*, 202-210.

Dressler, R. L. (1982). Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13, 373-394.

Drummond, A. J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C. & Moir, R. (2011). Geneious, version 5.4. *Geneious, Auckland, New Zealand*.

Durigan, G., Franco, G. A. D. C., Saito, M., & Baitello, J. B. (2000). Estrutura e diversidade do componente arbóreo da floresta na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália, SP. *Revista brasileira de botânica*, 23(4), 371-383.

Earl, D. A. & vonHoldt, B. M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4(2), 359-361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.

Eltz, T., Roubik, D. W., & Whitten, M. W. (2003). Fragrances, male display and mating behaviour of *Euglossa hemichlora*: a flight cage experiment. *Physiological Entomology*, 28(4), 251-260.

Eltz, T., Sager, A., & Lunau, K. (2005). Juggling with volatiles: exposure of perfumes by displaying male orchid bees. *Journal of Comparative Physiology A*, 191(7), 575-581.

Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M., & Cornuet, J. M. (1995). Microsatellite variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*, 140(2), 679-695.

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., & 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.

Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, 1, 47-50.

Excoffier, L.; Smouse, P. E. & Quattro, J. M. (1992). Analyses of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491p.

Ferreira, V. S. (2016). Análise morfométrica de *Centris (Heterocentris) analis* (Fabricius, 1804) e *Centris (Hemisiella) tarsata* Smith, 1874 sob a ótica da biologia reprodutiva. Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Entomologia. 107p.

Field, D., & Wills, C. (1998). Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(4), 1647-1652.

Filho, J. A. S., & Machado, I. C. (2008). Flowering Phenology and Pollination Ecology of *Cryptanthus Dianae* Leme: A Case of Floral Fragrance-Collecting by Euglossinae Bees in Bromeliaceae. *Selbyana*, 226-232.

Finnerty, J. R., Pang, K., Burton, P., Paulson, D., & Martindale, M. Q. (2004). Origins of bilateral symmetry: Hox and dpp expression in a sea anemone. *Science*, 304(5675), 1335-1337.

Fordyce, J. A. (2006). The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *Journal of Experimental Biology*, 209(12), 2377-2383.

Francisco, F. O. (2002). Diversidade Genética de Populações da Abelha sem Ferrão *Plebeia remota*: Análise do DNA Mitocondrial e Microssatélites. Dissertação de Mestrado, apresentada ao Instituto de Biociências/USP. Área de concentração: Biologia/Genética. 140p.

Francisco, F. O., Brito, R. M., Santiago, L. R., Gonçalves, P. H. P., Pioker, F. C., Domingues-Yamada, A. M. T., & Arias, M. C. (2011). Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in the stingless bee *Plebeia remota* (Apidae: Meliponini). *Conservation Genetics Resources*, 3(3), 417-419.

Francisco, F. O., Nunes-Silva, P., Franco, T. M., Wittmann, D., Imperatriz-Fonseca, V. L., Arias, M. C., & Morgan, E. D. (2008). Morphometrical, biochemical and molecular tools for assessing biodiversity. An example in *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux*, 55(3), 231-237.

Franco, T. M., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2010). A morfometria geométrica de asas e a identificação automática de espécies de abelhas. *Oecologia Australis*, 14(1), 317-321.

Franco, T. M., Faria Franco, F., Roubik, D. (2012). Integrated landmark and outline-based morphometric methods efficiently distinguish species of *Euglossa* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Apidologie*, 43, 609–617. DOI: 10.1007/s13592-012-0132-2

Franco, T. M., Grassi, M. L., Imperatriz-Fonseca, V. L., de Jesus May-Itza, W., & Quezada-Euán, J. J. G. (2011). Geometric morphometrics of the wing as a tool for assigning genetic lineages and geographic origin to *Melipona beecheii* (Hymenoptera: Meliponini). *Apidologie*, 42(4), 499-507.

Franco, T. M., Silva, R. A. O., Nunes-Silva, P., Menezes, C., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2009). Gender identification of five genera of stingless bees (Apidae, Meliponini) based on wing morphology. *Genetics and molecular research*, 8(1), 207-214.

Franco, T. M., Wittmann, D., Drauschke, M., Müller, S., Steinhage, V., Bezerra-Laure, M. A., De Jong, D. & Gonçalves, L. S. (2008). Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. *Apidologie*, 39(5), 488-494.

Frantine-Silva, W., Giangarelli, D. C., Penha, R. E., Suzuki, K. M., Dec, E., Gaglianone, M. C., Santos, I. A. & Sofia, S. H. (2016) Phylogeography and historical demography of the orchid bee *Euglossa iopoecila*: signs of vicariant events associated to Quaternary climatic changes. *Conservation Genetics*, 1-14. DOI: 10.1007/s10592-016-0905-7

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.

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

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

Garófalo, C. A., & ROZEN JR, J. G. (2001). Parasitic behavior of *Exaerete smaragdina* with descriptions of its mature oocyte and larval instars (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *American Museum Novitates*, 1-28.

Garófalo, C. A., Camillo, E., Augusto, S. C., Jesus, B. M. V. D., & Serrano, J. C. (1998). Nest structure and communal nesting in *Euglossa* (Glossura) *annectans* Dressler (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Revista Brasileira de Zoologia*, 15(3), 589-596.

Gibbs, J. (2009). Integrative taxonomy identifies new (and old) species in the *Lasioglossum* (*Dialictus*) *tegulare* (Robertson) species group (Hymenoptera, Halictidae). *Zootaxa*, 2032, 1-38.

Gonçalves, P. H. P. (2010). 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. Dissertação de Mestrado, apresentada ao Instituto de Biociências/USP. Área de concentração: Biologia/Genética. 140p.

Goudet, J. (2001). FSTAT: a program to estimate and test gene diversity and fixation indices (version 2.9.3.2) [updated from Goudet J. 1995. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86, 485-486.

Graham, J. H., Raz, S., Hel-Or, H., & Nevo, E. (2010). Fluctuating asymmetry: methods, theory, and applications. *Symmetry*, 2(2), 466-540.

Grassi, M. L. (2009). Discriminação morfométrica de 26 subespécies de *Apis mellifera* L. e abelhas Africanizadas por técnicas de morfometria tradicional, morfometria geométrica e sistema ABIS de identificação de espécies. Dissertação de Mestrado apresentada à FFCLRP USP, Ribeirão Preto. Área de concentração: Biologia/Entomologia 121p.

Grassi-Sella, M. L., Garófalo, C. A. & Francoy, T. M. Morphological similarity of populations of two Euglossini (Hymenoptera; Apidae) species estimated by geometric morphometrics of wing reveals the same patterns of differentiation. (Submetido para Apidologie)

Hebert, P. D., Cywinska, A., & Ball, S. L. (2003b). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.

Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & de Waard, J. R. (2003a). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(Suppl 1), S96-S99.

Heywood, V. H., & Iriondo, J. M. (2003). Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological conservation*, 113(3), 321-335.

Hódar, J. A. (2002). Leaf fluctuating asymmetry of Holm oak in response to drought under contrasting climatic conditions. *Journal of arid environments*, 52(2), 233-243.

Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular ecology resources*, 9(5), 1322-1332.

Hurtado-Burillo, M., Jara, L., de Jesús May-Itzá, W., Quezada-Euán, J. J. G., Ruiz, C., & De la Rúa, P. (2016). A geometric morphometric and microsatellite analyses of *Scaptotrigona mexicana* and *S. pectoralis* (Apidae: Meliponini) sheds light on the biodiversity of Mesoamerican stingless bees. *Journal of Insect Conservation*, 20(5), 753-763.

Janzen, D. H. (1971). Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. *Science*, 171(3967), 203-205.

Jarne, P., & Lagoda, P. J. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in ecology & evolution*, 11(10), 424-429.

Jones, J. S. (1987). An asymmetrical view of fitness. *Nature*, 325, 298-299.

Jorge, L. A. B., & Garcia, G. J. (1997). A study of habitat fragmentation in Southeastern Brazil using remote sensing and geographic information systems (GIS). *Forest Ecology and Management*, 98(1), 35-47.

Kanegae, A. P., & Lomônaco, C. (2003). Morphological and reproductive plasticity and fluctuating asymmetry of *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) under different temperatures. *Neotropical Entomology*, 32(1), 37-43.

Kendall D.G., Barden D., Carne T.K., Le H. (1999) Shape and shape theory, John Wiley & Sons, Chichester.

Kimsey, L. S. (1982). *Systematics of bees of the genus Eufriesea (Hymenoptera, Apidae)* (Vol. 95). Univ of California Press.

Kimsey, L. S. (1987). Generic relationships within the Euglossini (Hymenoptera: Apidae). *Systematic Entomology*, 12(1), 63-72.

Klein, R. M., & Rodriguez, H. B. (1978). Mapa fitogeográfico do estado de Santa Catarina. In *Mapa fitogeográfico do estado de Santa Catarina*. IOESC.

Klingenberg, C. P. (2002). Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. *Gene*, 287(1), 3-10.

Klingenberg, C. P. (2003). Developmental instability as a research tool: using patterns of fluctuating asymmetry to infer the developmental origins of morphological integration. *Developmental instability: causes and consequences*, 427-442.

Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources*, 11(2), 353-357.

Klingenberg, C. P. (2015). Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics: concepts, methods, and applications. *Symmetry*, 7(2), 843-934.

Klingenberg, C. P. (2016). Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. *Development genes and evolution*, 1-25.

Klingenberg, C. P., & McIntyre, G. S. (1998). Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution*, 1363-1375.

Klingenberg, C. P., Barluenga, M., & Meyer, A. (2002). Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution*, 56(10), 1909-1920.

Klink, C. A., & Machado, R. B. (2005). A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1(1), 147-155.

Knudsen J.T., Mod S.A. (1996) Floral scents and pollination in neotropical Lecythidaceae. *Biotropica*, 28, 42–60.

Knudsen, J. T., & Mori, S. A. (1996). Floral scents and pollination in Neotropical Lecythidaceae. *Biotropica*, 42-60.

Köppen, W. (1948). *Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra*. Fondo de Cultura Econômica. México. 479p.

Kronka, F.J.N. 2005. Inventário Florestal da Vegetação Natural do Estado de São Paulo. São Paulo: Instituto Florestal

Kroodsmas, D. E. (1975). Flight distances of male euglossine bees in orchid pollination. *Biotropica*, 7, 71–72.

Lachenbruch, P. A. (1967). An almost unbiased method of obtaining confidence intervals for the probability of misclassification in discriminant analysis. *Biometrics*, 23(4), 639-645.

Leary, R. F., & Allendorf, F. W. (1989). Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: implications for conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 4(7), 214-217.

Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.

Lingner, D. V., Schorn, L. A., Sevegnani, L., de Gasper, A. L., Meyer, L., & Vibrans, A. C. (2015). Floresta Ombrófila Densa de Santa Catarina - Brasil: agrupamento e ordenação baseados em amostragem sistemática. *Ciência Florestal*, 25(4), 933-946.

López-Urbe, M. M., Green, A. N., Ramírez, S. R., Bogdanowicz, S. M., & Danforth, B. N. (2011). Isolation and cross-species characterization of polymorphic microsatellites for the orchid bee *Eulaema meriana* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Conservation Genetics Resources*, 3(1), 21-23.

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.

Markow, T. A. (1995). Evolutionary ecology and developmental instability. *Annual Review of Entomology*, 40(1), 105-120.

Maury, C. M. (2002). Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade dos biomas brasileiros. MMA/SBF.

May-Itzá, W. J., Quezada-Euán, J. J. G., Medina, L. A. M., Enríquez, E., & De la Rúa, P. (2010). Morphometric and genetic differentiation in isolated populations of the endangered Mesoamerican stingless bee *Melipona yucatanica* (Hymenoptera: Apoidea) suggest the existence of a two species complex. *Conservation Genetics*, 11(5), 2079-2084.

Mendes M.F.M., Franco T.M., Nunes-Silva P., Menezes C., Imperatriz-Fonseca V.L. (2007) Intra-populational variability of *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier 1836 (Hymenoptera, Meliponini) using relative warp analysis. *Bioscience Journal*, 23, 147–152.

Michener C.D. (2000) The bees of the World. The John Hopkins Univ Press, Baltimore, p 913.

Michener, C. D. (1990). Classification of the Apidae (Hymenoptera). *University of Kansas Science Bulletin*, 54(4), 75-164.

Milet-Pinheiro, P., & Schlindwein, C. (2005). Do euglossine males (Apidae, Euglossini) leave tropical rainforest to collect fragrances in sugarcane monocultures? *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(4), 853-858.

Miller, M. P. (1997). Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. *Computer software distributed by author*, 4, 157.

Miller, M. P. (1997). Tools for population genetic analysis (TFPGA), version 1.3. *Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Arizona, USA*.

Mittermeier, R. A., Myers, N., Mittermeier, C. G., & Robles Gil, P. (1999). *Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions*. CEMEX, SA, Agrupación Sierra Madre, SC, México.

Møller, A. P., & Swaddle, J. P. (1997). *Asymmetry, developmental stability and evolution*. Oxford University Press, UK.

Monteiro, L. R., & Reis, S. F. D. (1999). *Princípios de morfometria geométrica*. Holos.

Morellato, L. P. C., & Haddad, C. F. (2000). Introduction: The Brazilian Atlantic Forest1. *Biotropica*, 32(4b), 786-792.

Moritz, C., Dowling, T. E., & Brown, W. M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and systematics*, 269-292.

Moure J, Melo GAR, Faria Jr L (2012) Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region-online version. In: Euglossini Latrelli 1802. <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed 20 Nov 2016

Moure, J. S. (1944). Abelhas de Monte Alegre (Est. S. Paulo) (Hym.-Apoidea). *Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia*, 6(10), 103-126.

Moure, J. S. (1967). A check-list of the known euglossine bees (Hymenoptera, Apidae). In *Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica* (Vol. 5, pp. 395-415).

Moure, J. S. (2000). The species of the genus *Eulaema* Lepeletier, 1841 (Hymenoptera, Apidae, Euglossinae). *Acta Biologica Paranaense*, 29(1/4), 1-70.

Myers, J. G. (1935). Ethological observations on the citrus bee, *Trigona silvestrina* Vachal, and other neotropical bees (HYM., APOIDEA). *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 83(1), 131-142.

Myers, J., & Loveless, M. D. (1976). Nesting aggregations of the euglossine bee *Euplusia surinamensis* (Hymenoptera: Apidae): individual interactions and the advantage of living together. *The Canadian Entomologist*, 108(01), 1-6.

Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.

Nogueira, P. C. D. L., Marsaioli, A. J., Amaral, M. D. C. E., & Bittrich, V. (1998). The fragrant floral oils of *Tovomita* species. *Phytochemistry*, 49(4), 1009-1012.

Nunes, L. A., Araújo, E. D. D., & Marchini, L. C. (2015). Fluctuating asymmetry in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) as bioindicator of anthropogenic environments. *Revista de Biologia Tropical*, 63(3), 673-682.

Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., & Vieira, M. L. C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29(2), 294-307.

Oliveira, M. D., & Nemésio, A. (2003). *Exaerete lepeletieri* (Hymenoptera: Apidae: Apini: Euglossina): a new cleptoparasitic bee from Amazonia. *Lundiana*, 4(2), 117-120.

Oliveira, M. L. (2006). Três novas espécies de abelhas da Amazônia pertencentes ao gênero *Eulaema* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Acta Amazonica*, 36(1), 121-128.

Otero, J. T., & Sandino, J. C. (2003). Capture Rates of Male Euglossine Bees across a Human Intervention Gradient, Chocó Region, Colombia1. *Biotropica*, 35(4), 520-529.

Packer, L., Gibbs, J., Sheffield, C., & Kevan, P. (2008). Barcoding the Bees of the World. *Anais do VIII Encontro sobre Abelhas Ribeirão Preto-SP, Brasil*.

Palmer, A. R. (1994). Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In *Developmental instability: its origins and evolutionary implications* (pp. 335-364). Springer Netherlands.

Palmer, A. R., & Strobeck, C. (1986). Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual review of Ecology and Systematics*, 391-421.

Parsons, P. A. (1990). The metabolic cost of multiple environmental stresses: implications for climatic change and conservation. *Trends in ecology & evolution*, 5(9), 315-317.

Paulo, C. D. L., Marsaioli, A. J., Maria do Carmo, E. A., & Bittrich, V. (1998). The fragrant floral oils of *Tovomita* species. *Phytochemistry*, 49(4), 1009-1012.

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.

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.

Pivello, V. R., Bitencourt, M. D., Mantovani, W., Mesquita Jr, H. D., Batalha, M. A., & Shida, C. (1998). Proposta de zoneamento ecológico para a reserva de cerrado Pé-de-Gigante (Santa Rita do Passa Quatro, SP). *Brazilian Journal of Ecology*, 2(2), 108-118.

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.

Polak, M. (2003). *Developmental instability: causes and consequences*. Oxford University Press on Demand.

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.

Ramírez, S. R., Eltz, T., Fritsch, F., Pemberton, R., Pringle, E. G., & Tsutsui, N. D. (2010). Intraspecific geographic variation of fragrances acquired by orchid bees in native and introduced populations. *Journal of chemical ecology*, 36(8), 873-884.

Ramírez, S., Dressler, R. L., & Ospina, M. (2002). Abejas euglosinas (Hymenoptera: Apidae) de la Región Neotropical: Listado de especies con notas sobre su biología. *Biota colombiana*, 3(1), 7-118.

Ranta, P., Blom, T. O. M., Niemela, J., Joensuu, E., & Siitonen, M. (1998). The fragmented Atlantic rain forest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments. *Biodiversity & Conservation*, 7(3), 385-403.

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.

Rizzini, C. T. (1979). Tratado de Fitogeografia do Brasil. *Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*.

Roa, A. C., Chavarriaga-Aguirre, P., Duque, M. C., Maya, M. M., Bonierbale, M. W., Iglesias, C., & Tohme, J. (2000). Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. *American Journal of Botany*, 87(11), 1647-1655.

Rocha-Filho L.C., Cerântola N.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 Brasil. *Genetica*, 141, 65-74.

Rodrigues, L. A., & Santos, V. F. (2003). Morfometria geométrica—aplicações em paleobiologia de Dinossáurios. *Ciências da Terra (UNL)*, 5, 141-145.

Rodriguez Melo, G. A. (1995). Fragrance gathering by *Euglossa* males in flowers of *Ternstroemia dentata* (Theaceae) (Hymenoptera: Apidae: Euglossinae). *Entomologia generalis*, 19(4), 281-283.

Rohlf, F. J. (1998). On applications of geometric morphometrics to studies of ontogeny and phylogeny. *Systematic Biology*, 47(1), 147-158.

Rohlf, F. J. (1999). Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. *Journal of Classification*, 16(2), 197-223.

Rohlf, F. J. (2008a). Programa tps Util, version 1.40. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.

Rohlf, F. J. (2008b). Program tpsDIG2 for Windows version 2.12. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.

Rohlf, F. J. & D. E. Slice. (1990). Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*, 39: 40–59.

Rohlf, F. J., & Marcus, L. F. (1993). A revolution morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(4), 129-132.

Rosa, A. D. S., Teixeira, J. S. G., Vollet-Neto, A., Queiroz, E. P., Blochtein, B., Pires, C. S. S., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2016). Consumption of the neonicotinoid thiamethoxam during the larval stage affects the survival and development of the stingless bee, *Scaptotrigona aff. depilis*. *Apidologie*, 47(6), 729-738.

Roubik, D. W. (2004). Sibling species of *Glossura* and *Glossuropoda* in the Amazon Region (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 77(3), 235-253.

Roubik, D. W., & Hanson, P. E. (2004). Orchid bees of tropical America: biology and field guide. *Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), Heredia, Costa Rica*.

Rozza, A. D. F. (1997). *Florística, fitossociologia e caracterização sucessional em uma floresta estacional semidecidual: Mata da Virgínia, Matão, SP*. Dissertação de Mestrado apresentada à UNICAMP, Campinas. 176p.

Savriama, Y., & Klingenberg, C. P. (2011). Beyond bilateral symmetry: geometric morphometric methods for any type of symmetry. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 1.

Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5(1), 63-69.

Schlotteröer, C., Amos, B., & Tautz, D. (1991). Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species.

Shaibi, T., Lattorff, H. M. G., & Moritz, R. F. A. (2008). A microsatellite DNA toolkit for studying population structure in *Apis mellifera*. *Molecular ecology resources*, 8(5), 1034-1036.

Sheffield, C. S., Hebert, P. D., Kevan, P. G., & Packer, L. (2009). DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies. *Molecular Ecology Resources*, 9(s1), 196-207.

Silva, D., Vital, M., & De Marco Jr, P. (2007). Assimetria flutuante como ferramenta de bioindicação: os efeitos da cidade de Manaus (AM) sobre *Erythemis peruviana* (rambur, 1842) (Insecta: Odonata) junto à bacia do rio Amazonas. *Environmental Pollution*, 118, 19-28.

Silva, M.C., Lomônaco, C., Augusto, S. C., Kerr, W. E. (2009). Climatic and anthropic influence on size and fluctuating asymmetry of Euglossine bees (Hymenoptera, Apidae) in a semideciduous seasonal forest reserve. *Genetics and Molecular Research*, 8(2), 730-737.

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.

Skov, C., & Wiley, J. (2005). Establishment of the Neotropical orchid bee *Euglossa viridissima* (Hymenoptera: Apidae) in Florida. *Florida Entomologist*, 88(2), 225-227.

Soares, A. A., Campos, L. D. O., Vieira, M. F., & Melo, G. D. (1989). Relações entre *Euglossa* (Euglossella) *mandibularis* Friese, 1899 (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) e *Cyphomandra calycina* (Solanaceae). *Ciência e Cultura*, 41(9), 903-905.

Sofia, S. H., Paula, F. M. D., Santos, A. M. D., Almeida, F. S., & Sodré, L. M. (2005). Genetic structure analysis of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae) populations

from southern Brazilian Atlantic rainforest remnants. *Genetics and Molecular Biology*, 28(3), 479-484.

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.

Souza, R. O., Del Lama, M. A., Cervini, M., Mortari, N., Eltz, T., Zimmermann, Y., ... & Paxton, R. J. (2010). Conservation genetics of Neotropical pollinators revisited: microsatellite analysis suggests that diploid males are rare in orchid bees. *Evolution*, 64(11), 3318-3326.

Steinkellner, H., Lexer, C., Turetschek, E., & Glössl, J. (1997). Conservation of (GA) n microsatellite loci between *Quercus* species. *Molecular Ecology*, 6(12), 1189-1194.

Suni S. S., Bronstein JL, Brosi BJ (2014) Spatio-temporal genetic structure of a tropical bee species suggests high dispersal over a fragmented landscape. *Biotropica* 46:202–209. DOI:10.1111/btp.12084

Suni, S. S., & Brosi, B. J. (2012). Population genetics of orchid bees in a fragmented tropical landscape. *Conservation Genetics*, 13(2), 323-332.

Sunnucks P. 2001. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 199-203.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739.

Teichert, H., Dötterl, S., Zimma, B., Ayasse, M., & Gottsberger, G. (2009). Perfume-collecting male euglossine bees as pollinators of a basal angiosperm: the case of *Unonopsis stipitata* (Annonaceae). *Plant Biology*, 11(1), 29-37.

Teixeira, J. S. G. (2015). “*Caracterização populacional de Mourella caerulea* (Friese, 1900) e *Plebeia nigriceps* (Friese, 1901) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) através de morfometria geométrica da asa, análise de hidrocarbonetos cuticulares e DNA mitocondrial”. Tese de Doutorado apresentada à FFCLRP USP, Ribeirão Preto. Área de concentração: Biologia/Entomologia. 135p

Templeton, A. R.; Crandall, K. A.; Sing, C. F. A. (1992). Cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132(2), 619-33.

Tonhasca Jr, A., Albuquerque, G. S., & Blackmer, J. L. (2003). Dispersal of euglossine bees between fragments of the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Tropical Ecology*, 19(01), 99-102.

Torezan-Silingardi, H. M., & Del-Claro, K. (1998). Behavior of visitors and reproductive biology of *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae) in cerrado vegetation. *Ciência e Cultura*, 50(4), 281-284.

Tóth, G., Gáspári, Z., & Jurka, J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome research*, 10(7), 967-981.

Van der Pijl, L., & Dodson, C. H. (1966). *Orchid flowers: their pollination and evolution*. Fairchild Tropical Garden.

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.

Villemant, C., Simbolotti, G., & Kenis, M. (2007). Discrimination of *Eubazus* (Hymenoptera, Braconidae) sibling species using geometric morphometrics analysis of wing venation. *Systematic Entomology*, 32(4), 625-634.

Wang, I. J. (2010). Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography. *Molecular Ecology*, 19(13), 2605-2608.

White, G., & Powell, W. (1997). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. *Molecular Ecology*, 6(9), 851-860.

Whitman, D. W., & Ananthakrishnan, T. N. (2009). Phenotypic plasticity of insects. *Enfield, NH: Science Publishers*.

Wikelski, M., Moxley, J., Eaton-Mordas, A., López-Urbe, M. M., Holland, R., Moskowitz, D., Roubik, D. W. & Kays, R. (2010). Large-range movements of Neotropical orchid bees observed via radio telemetry. *PLoS One*, 5(5), e10738.

Williams, N. H., & Dodson, C. H. (1972). Selective attraction of male Euglossine bees to orchid floral fragrances and its importance in long distance pollen flow. *Evolution*, 84-95.

Williams, N. H., & Dressler, R. L. (1976). Euglossine pollination of *Spathiphyllum* (Araceae). *Selbyana*, 1(4), 349-356.

Wright, S. (1987). *Evolution and the genetics of population*. Vol. 4. Variation within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago

Zayed, A. (2009). Bee genetics and conservation. *Apidologie*, 40(3), 237-262.

Zelditch, M. L.; Swiderski, D. L.; Sheets, H. D. & Fink, W. L. (2004). *Geometric Morphometrics for Biologists: A primer*. Elsevier Academic Press, Nova York e Londres, 437p.

Zimmermann, Y., Roubik, D. W., Quezada-Euan, J. J. G., Paxton, R. J., & Eltz, T. (2009). Single mating in orchid bees (Euglossa, Apinae): implications for mate choice and social evolution. *Insectes Sociaux*, 56(3), 241-249.

Zimmermann, Y., Schorkopf, D. L. P., Moritz, R. F. A., Pemberton, R. W., Quezada-Euan, J. J. G., & Eltz, T. (2011). Population genetic structure of orchid bees (Euglossini) in anthropogenically altered landscapes. *Conservation Genetics*, 12(5), 1183-1194.

ANEXO

8 ANEXO

Apidologie

Morphological similarity of populations of two Euglossini (Hymenoptera; Apidae) species estimated by geometric morphometrics of wing reveals the same patterns of differentiation

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	APID-D-16-00191
Full Title:	Morphological similarity of populations of two Euglossini (Hymenoptera; Apidae) species estimated by geometric morphometrics of wing reveals the same patterns of differentiation
Article Type:	Original Article
Keywords:	euglossini; orchid bees; geometric morphometrics; forest fragmentation
Corresponding Author:	Tiago Mauricio Franco, Associate Professor Universidade de São Paulo
Corresponding Author's Institution:	Universidade de São Paulo
First Author:	Marina Lopes Grassi-Sella, Master
Order of Authors:	Marina Lopes Grassi-Sella, Master Carlos Alberto Garófalo, Full Professor Tiago Mauricio Franco, Associate Professor
Funding Information:	FAPESP (2011/07857-9) Dr Tiago Mauricio Franco
Abstract:	Euglossini bees are able to fly long distances and it could help to maintain gene flow among different populations. Aiming to investigate if different environmental conditions are related to the morphological variation in <i>Euglossa annectans</i> and <i>Euglossa truncata</i> , we analyzed the patterns of venation of the forewings of 310 individuals, sampled in the same eight locations for the two species. Populations from both species clustered in a very similar way, according to the phytophysiognomy from the sampling site. These populations also presented little or no population structuration. Our results suggested that the forest fragmentation is not a problem for both species and the tendency of samples grouping by phytophysiognomy can be explained by phenotypic plasticity or local adaptations.
Suggested Reviewers:	Thibaut de Meulemeester, PhD. thibaut.demeulemeester@naturalis.nl Works with geometric morphometrics and has large experience with association of morphometrics Chris Klingenberg cpk@manchester.ac.uk Edilson Divino Araújo edaraujo@yahoo.com.br Large experience with Euglossini bees and geometric morphometrics

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Morphological similarity of populations of two Euglossini (Hymenoptera; Apidae) species estimated by geometric morphometrics of wing reveals the same patterns of differentiation

Grassi-Sella, M. L., Garofalo, C. A. & Francoy, T. M.

1 – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

2 – Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

3 – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. tfrancoy@usp.br

* corresponding author

Keywords: euglossini/orchid bees/geometric morphometric/forest fragmentation

Abstract

Euglossini bees are known by their capacity to fly long distances and it could help to maintain gene flow among different populations. Aiming to investigate if different environmental conditions are related to the morphological variation in *Euglossa annectans* and *Euglossa truncata*, we analyzed the patterns of venation of the forewings of 310 individuals, sampled in the same 8 locations for the two species. Populations from both species clustered in a very similar way, according to the phytophysiognomy from the sampling site. These populations also presented little or no population structuration. Our results suggested that the forest fragmentation is not a problem for both species and the tendency of samples grouping by phytophysiognomy could be explained by phenotypic plasticity or local adaptations.

1. Introduction

Among the 20.000 bee species worldwide (Michener, 2000), Euglossini bees are specially relevant due to their representability in the Neotropical region, where they compose up to 25% of the total bee community in some areas (Roubik & Hanson, 2004). They are exclusive pollinators of almost 700 species of Neotropical Orchidaceae (Ramirez et al. 2002; Oliveira and Nemésio, 2003; Roubik & Hanson 2004; Oliveira, 2006) and many others groups, such as Araceae (Williams and Dressler, 1976); Euphorbiaceae (Armbruster and Webster, 1979); Haemodoraceae (Buchmann, 1981); Apocynaceae, Loganiaceae, and Malvaceae (Ackerman, 1983); Solanaceae (Soares *et al.*, 1989); Pentaphylacaceae (Melo, 1995); Lecythidaceae (Knudsen and Mud, 1996); Clusiaceae (Nogueira *et al.*, 1998); Bromeliaceae (Siqueira-Filho, *et al.*, 2008), Annonaceae (Teichert, *et al.* 2009), and Plantaginaceae (Cappellari *et al.*, 2009). These

bees are restricted to the Neotropical region and their geographic distribution ranges between 29°N e 32°S parallel. Euglossini males are known by their great flight capacity, more than 20 Km per day in a search for nectar or floral fragrances (Janzen, 1971; Kroodsmas, 1975; Ackerman *et al.*, 1982 and Eltz *et al.*, 2003). They fly long distances searching for aromatic compounds from multiple floral and non-floral sources subsequently used during courtship display (Dressler, 1982; Eltz *et al.*, 2005). However, in spite the great flight range of the males, some studies indicated that forest fragmentation could be a barrier for these bees (Tonhasca *et al.*, 2003; Brosi 2009), making them particularly susceptible to deforestation (Roubik & Hanson 2004; Cerântola *et al.* 2010). According to Zayed (2009), habitat fragmentation is a direct result of habitat loss and that could affect the survival of populations through genetic isolation and subsequent inbreeding.

Due to the importance of Euglossini bees as pollinators and the concern of forest fragmentation impacts, the ultimate goal of this work was to verify, in two different species, the existence of intraspecific morphological variability in populations from different forest fragments in Southeast Brazil. For that, we used Geometric Morphometrics analysis of forewings, which has been demonstrated efficient in studies with cryptic species (Francisco *et al.*, 2008, Hurtado-Burrillo *et al.*, 2016), geographic ecotypes (Francoy *et al.* 2011, Bonatti *et al.*, 2014) and in identification of species (Francoy *et al.* 2009, 2012) and subspecies (Oleksa and Tofilski 2014; Silva *et al.*, 2015). Also, even though the wing shape being relatively conserved among individuals of same species this technique has shown to be a sensitive tool for the analysis of very fine differentiation among groups, (Debat *et al.* 2003; De Souza *et al.*, 2015). This work also aims to provide additional information that might assist in the development of conservation strategies of Euglossini bees.

2. Materials and methods

Males of Euglossini bees (126 *Euglossa annectans* and 184 *Euglossa truncata*) were collected in six different Forest fragments in São Paulo state, Brazil (Fig. 1; Tab. I), according to the methodology proposed by Rebêlo and Garófalo (1997) and identified in the laboratory. All the bees used in this work are deposited in the Collection of Bees and Solitary Wasps (Coleção de Abelhas e Vespas Solitárias – CAVES) of the Department of Biology of the Faculty of Philosophy, Science and Letters at Ribeirão Preto – USP.

Fig. 1: Collect sites in the state of São Paulo – Brazil. (**APASJ:** Área de Proteção Ambiental Serra do Japi; **EEC:** Estação Ecológica dos Caetetus; **EEJ:** Estação Ecológica do Jataí; **EERP:** Estação Ecológica de Ribeirão Preto; **MV:** Mata da Virgínia; **PFBJ:** Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus).

Tab.I: Sample size, Phytophysionomy and Biome of *Euglossa annectans* and *Euglossa truncata* for each collect site (**APASJ:** Área de Proteção Ambiental Serra do Japi; **EEC:** Estação Ecológica dos Caetetus; **EEJ:** Estação Ecológica do Jataí; **EERP:** Estação Ecológica de Ribeirão Preto; **MV:** Mata da Virgínia; **PFBJ:** Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus). **Specie 1** is *Euglossa annectans* and **Specie 2** is *Euglossa truncata*.

Cities	Geographic coordinates	Sites	Sp 1	Sp 2	Phytophysionomy	Biome
Jundiá	23 10'S 46 53'O	APASJ-Área de Proteção Ambiental Serra do Japi	12	17	Montane Dense Ombrophilous Forest	Atlantic Forest
Alvinlândia	22 26'S 49 45'O	ECC-Estação Ecológica dos Caetetus	36	63	Seasonal Semi-deciduous Forest	Atlantic Forest
Luiz Antônio	21 33'S 47 41'O	EEJ-Estação Ecológica do Jataí	20	40	Seasonal Semi-deciduous Forest and Savanna stricto sensu	Atlantic Forest and Savanna
Ribeirão Preto	21 10'S 47 48'O	EERP-Estação Ecológica de Ribeirão Preto	23	16	Seasonal Semi-deciduous Forest and Savanna	Atlantic Forest
Matão	21 36'S 48 21'O	MV-Mata da Virgínia	27	11	Seasonal Semi-deciduous Forest	Atlantic Forest
Pedregulho	20 15'S 47 28'O	PFBJ-Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus	8	20	Seasonal Semi-deciduous Forest and Savanna	Atlantic Forest and Savanna

For the morphometric analysis, the right forewings were carefully cut from the bodies of the bees with an entomological scissor and placed on microscope slides previously identified and sealed with a cover slip. All the 310 forewings were photographed using a digital camera attached to a stereoscopic microscope and the images were stored as digital files. Eighteen homologous landmarks were plotted in each wing, being one landmark per vein intersection (Fig. 2) using tpsDig2 version 2.12 (Rohlf 2008). The Cartesian coordinates of each landmark were recorded and used as input data into MorphoJ 1.05f (Klingenberg, 2011) to perform the morphometric analysis. The images were Procrustes aligned and the obtained data were used to run the statistical analysis such as canonical variate analysis (CVA) and discriminant function analysis (DFA). All software used in this work is freely available on the following internet websites: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/> and http://www.flywings.org.uk/morphoj_page.htm.

Fig. 2: Right forewing of *Euglossa annectans* with 18 landmarks plotted in the vein intersections.

We have also used MorphoJ (Klingenberg 2011) to calculate the Procrustes distances among the studied groups and to perform the cross-validation test on the Discriminant Analysis; bees were grouped according to their sampling locations. The Mahalanobis square distance and Procrustes distances between mean shapes of the groups were extracted and used in the construction of dendrograms of morphological proximity (based on Neighbor-Joining distances) using MEGA 5.0 (Tamura *et al.* 2011). To perform a Mantel test by TFPGA software (Miller, 1997) we used the Mahalanobis square distances between the centroids of the groups and the geographic distance between the sites (measured by Google Earth 7.1.5.1557/2015). We also perform the Mantel test using the Procrustes distance and the geographic distance between the sites.

3. Results

3.1. *Euglossa annectans*

After the geometric morphometric analysis for *E. annectans* samples, the canonical variation analysis explained 60.04 % of the variance in the first two axis (CVA1 explained 34.25 % and CVA2 explained 25.78 %) (Fig. 3). The plot of the individuals in the first two CVA axis showed some degree of superimposition of the individuals of all samples with a tendency to separate them. Based on the first CVA axis, one can verify the formation of two groups where, one group is positioned on the right-hand quadrant, with EEC, MV and APASJ and the other group on the left-hand quadrant with PFBJ, EEJ and EERP.

Fig. 3: Scatterplot of *Euglossa annectans* individual scores from the canonical variant analysis of landmarks. The dots indicating the individuals and the 95% confidence ellipse was left in order to facilitate groups visualization (**APASJ:** Área de Proteção Ambiental Serra do Japi; **EEC:** Estação Ecológica dos Caetetus; **EEJ:** Estação Ecológica do Jataí; **EERP:** Estação Ecológica de Ribeirão Preto; **MV:** Mata da Virgínia; **PFBJ:** Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus).

The CVA indicated that all groups formed clusters significantly different from each other ($p < 0.05$), except for MV and APASJ ($p = 0.06$). The Mahalanobis square distances between the centroids of the groups and Procrustes distances were calculated (Tab.II). The Mahalanobis distance vary from 2.41 (between APASJ x EEC) to 3.93 (between EERP x PFBJ) and the Procrustes distances vary from 0.009 (between APASJ x EERP and APASJ x MV) to 0.016 (between EERP x PFBJ).

Tab.II: Procrustes distance between populations (upper right triangle) and Mahalanobis distance between the centroids of the groups (lower left triangle). (**APASJ**: Área de Proteção Ambiental Serra do Japi; **EEC**: Estação Ecológica dos Caetetus; **EEJ**: Estação Ecológica do Jataí; **EERP**: Estação Ecológica de Ribeirão Preto; **MV**: Mata da Virgínia; **PFBJ**: Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus).

	APASJ	EEC	EEJ	EERP	MV	PFBJ
APASJ	0	0.010	0.012	0.009	0.009	0.013
EEC	2.41	0	0.013	0.010	0.011	0.016
EEJ	2.81	3.16	0	0.011	0.014	0.011
EERP	2.82	3.10	2.97	0	0.012	0.016
MV	2.22	2.62	3.12	3.02	0	0.015
PFBJ	3.30	3.66	2.97	3.93	3.55	0

Both dendrograms of morphological proximity presented a similar topology (Fig. 4), indicating the same relationships between populations. MV and APASJ are placed together in one branch, close to the populations of EEC and EERP. More distant to these branches, the populations of EEJ and PFBJ are placed in another branch. The only difference regarding the two dendrograms is EEC placed together with EERP on the dendrogram based on the Procrustes distances, while they are separated in the other dendrogram.

Fig. 4 Neighbor-Joining dendrogram of *Euglossa annectans* groups constructed based on the Mahalanobis square distances between the centroids (A) and Procrustes distance (B) (**APASJ**: Área de Proteção Ambiental Serra do Japi; **EEC**: Estação Ecológica dos Caetetus; **EEJ**: Estação Ecológica do Jataí; **EERP**: Estação Ecológica de Ribeirão Preto; **MV**: Mata da Virgínia; **PFBJ**: Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus).

The mean classification of Discriminant Analysis and Cross Validation test were 93.4% and 58.3% respectively, all the individual classification values between groups are in tab. III. The Mantel test for Mahalanobis square distance and Procrustes distance

present an absence of correlation ($r = -.0706$; $p = 0.5740$ and $r = .0688$; $p = 0.5550$) between the groups.

Tab. III: The hit rate percentage of Discriminant analysis (upper right triangle) and Cross-validation test (lower left triangle) between different sites of *Euglossa annectans* (**APASJ**: Área de Proteção Ambiental Serra do Japi; **EEC**: Estação Ecológica dos Caetetus; **EEJ**: Estação Ecológica do Jataí; **EERP**: Estação Ecológica de Ribeirão Preto; **MV**: Mata da Virgínia; **PFBJ**: Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus).

	APASJ	EEC	EEJ	EERP	MV	PFBJ
APASJ	0	35%	100%	100%	100%	90%
EEC	22%	0	100%	98.3%	97%	100%
EEJ	58%	56%	0	81%	100%	100%
EERP	58%	75%	49%	0	100%	100%
MV	46%	70%	72%	73%	0	100%
PFBJ	50%	61%	63%	56%	66%	0

3.2. *Euglossa truncata*

The first two axes of the canonical variation analysis explained 70.64 % of the variance (CVA1 explained 43.22 % and CVA2 explained 27.42 %) (Fig. 5). The CVA indicated that all groups formed clusters significantly different from each other ($p < 0.05$), except for the groups from EERP and PFBJ ($p = 0.06$). The scatterplot shows an overlapping of all samples, however, considering the second CVA axis, is it possible to verify a tendency of separation where on the bottom is APASJ alone and on the top EEC, MV, PFBJ, EEJ and EERP.

Fig. 5: Scatterplot of *Euglossa truncata* individual scores from the canonical variant analysis of landmarks. The dots indicating the individuals and the 95% confidence ellipse was left in order to facilitate groups visualization (**APASJ**: Área de Proteção Ambiental Serra do Japi; **EEC**: Estação Ecológica dos Caetetus; **EEJ**: Estação Ecológica do Jataí; **EERP**: Estação Ecológica de Ribeirão Preto; **MV**: Mata da Virgínia; **PFBJ**: Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus).

The Mahalanobis square distances between the centroids of the groups and Procrustes distances were calculated (Tab.IV). The Mahalanobis distance vary from 1.78 (between APASJ x EEC) to 4.91 (between EERP x PFBJ) and the Procrustes distances among the varying from 0.008 (between EEC x EEJ and EEJ x PFBJ) to 0.024 (between EERP x MV).

Tab.IV: Procrustes distance between *Euglossa truncata* groups (upper right triangle) and Mahalanobis distance between the centroids of the groups (lower left triangle) obtained from Canonical Variation Analysis (**APASJ**: Área de Proteção Ambiental Serra do Japi; **EEC**: Estação Ecológica dos Caetetus; **EEJ**: Estação Ecológica do Jataí; **EERP**: Estação Ecológica de Ribeirão Preto; **MV**: Mata da Virgínia; **PFBJ**: Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus).

	APASJ	EEC	EEJ	EERP	MV	PFBJ
APASJ	0	0.0132	0.0121	0.0173	0.0229	0.0137
EEC	3.3815	0	0.0081	0.0110	0.0203	0.0115
EEJ	3.3033	2.5332	0	0.0133	0.0158	0.0086
EERP	4.0898	2.6951	3.2152	0	0.0247	0.0145
MV	4.9165	3.9484	2.8093	4.3495	0	0.0157
PFBJ	3.1070	2.9179	1.7870	3.4296	3.2093	0

The dendrogram of morphological proximity, built based on the Mahalanobis square distances between the centroids of the groups (Fig. 6A), placed the bees grouped as on the top, in the right-hand, one branch with APASJ alone and in the left-hand, another with EEC and EERP together. On the bottom, in the right-hand there is a branch with PFBJ alone and on the left-hand another branch with EEJ and MV. We either build a dendrogram with the Procrustes distance (Fig. 6B), and the results corroborate with the Mahalanobis distance dendrogram with only one exception: the flipped position of EEJ and PFBJ.

Fig. 6 Neighbor-Joining dendrogram of *Euglossa truncata* groups constructed based on the Mahalanobis square distances between the centroids (A) and Procrustes distance (B) (**APASJ**: Área de Proteção Ambiental Serra do Japi; **EEC**: Estação Ecológica dos Caetetus; **EEJ**: Estação Ecológica do Jataí; **EERP**: Estação Ecológica de Ribeirão Preto; **MV**: Mata da Virgínia; **PFBJ**: Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus).

The mean classification of Discriminant Analysis and Cross Validation test were 98% and 72% respectively, all the individual classification values between groups are in Tab. V. The Mantel test for Mahalanobis square distance and Procrustes distance present an absence of correlation ($r = 0.1976$; $p = 0.2270$ and $r = 0.2638$ $p = 0.7170$) between the groups.

Tab.V: The hit rate percentage of Discriminant analysis (upper right triangle) and Cross-validation test (lower left triangle) between different sites of *Euglossa truncata* (**APASJ**: Área de Proteção Ambiental Serra do Japi; **EEC**: Estação Ecológica dos Caetetus; **EEJ**: Estação Ecológica do Jataí; **EERP**: Estação Ecológica de Ribeirão Preto; **MV**: Mata da Virgínia; **PFBJ**: Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus).

	APASJ	EEC	EEJ	EERP	MV	PFBJ
APASJ	0	97%	100%	100%	100%	100%
EEC	82%	0	92.5%	96%	100%	96%
EEJ	77%	83.3%	0	96%	100%	93.3%
EERP	51.5%	82%	73%	0	100%	100%
MV	71%	96%	84%	70%	0	97%
PFBJ	65%	82%	52%	67%	39%	0

We also did the CVA analysis with all samples from both species together (Fig.7), and based on Mahalanobis and Procrustes distance, we built a dendrogram of morphological similarity. Both dendrograms showed mutually the same pattern of site aggrupation in species, and a complete separation between them.

Fig. 7: Neighbor-Joining dendrogram of samples of *Euglossa annectans* (1) and *Euglossa truncata* (2) from different collect sites, constructed based on the Mahalanobis square distances between the centroids (A) and Procrustes distance (B) (APASJ: Área de Proteção Ambiental Serra do Japi; EEC: Estação Ecológica dos Caetetus; EEJ: Estação Ecológica do Jataí; EERP: Estação Ecológica de Ribeirão Preto; MV: Mata da Virgínia; PFBJ: Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus).

4. Discussion

Many published researches have shown the power of geometric morphometric (GM) technique for recognition of cryptic species (Francisco *et al.* 2008) and geographic ecotypes (Francoy *et al.* 2011; Bonatti *et al.*, 2014) as well as for identification of species (Francoy *et al.* 2009; 2012) and subspecies (Oleksa and Tofilski, 2014; Silva *et al.*, 2015) of bee populations. In spite of the similarity found among the studied populations (showed by CVA analysis), the GM technique was able to demonstrate the same pattern of grouping of our samples in both species, according to each collection site. All of our collection sites are located within Atlantic Forest fragments, some of them in association with Savanah areas. This forest is one of the greatest hotspots of biodiversity in the world (Myers *et al.*, 2000 and Carnaval *et al.*, 2009) and in the last

200 years its coverage reduced from 81.8% (Victor, 1975) to 7% (MMA) as a result of anthropic activities (urbanization process and agribusiness). The habitat fragmentation is one of the main concerns related to the decline of bee population (Zayed, 2009 and Crane, 2001). When populations decrease in size, some genetic factors as inbreeding depression and loss of genetic diversity (that cause reduction in adaptability), could accelerate the extinction process (Brook *et al.* 2002; Frankham, 2003; Spielman *et al.* 2004 O'Grady *et al.* 2008).

Several studies have shown that some bee species have difficulty to cross-fragmented areas. Milet-Pinheiro & Schlindwein (2005), when studying males of 16 Euglossini species in different sites that vary between the inner of an Atlantic Forest fragment and 500m away into a Sugar Cane plantation, observed that only 2 species (*Eulaema nigrita* and *Euglossa cordata*) came out of the forest and flew over the monoculture region. In another research done in the Amazon Forest, it was observed that the converting of some forest areas into pasture has also worked as a barrier for the dispersion of Euglossini males (Powell & Powell, 1987). However, studies involving different types of markers as mitochondrial, microsatellites and allozyme have shown that Euglossini bees are usually capable to fly long distances, exhibiting high genetic diversity and low population structuring (Souza *et al.*, 2010; Cerantola *et al.*, 2010 and Zimmermann *et al.*, 2011; Suni & Brosi, 2012). Souza *et al.* (2010), when studying diploid males of Euglossini populations from the Neotropical region, observed that in a population of *E. cordata* there was high gene flow and effective population size since they found high genetic diversity, low population structuring and rare diploid males. In another study, Rocha-Filho *et al.* (2013), assessed the gene variation and genetic differentiation between populations of four abundant Euglossini species sampled in two areas, Picinguaba (mainland) and Anchieta Island, Ubatuba, SP, southeastern Brazil. According to the authors, there was no significant genetic differentiation between the island and mainland samples of *Euglossa cordata*, *Eulaema cingulata* and *Eulaema nigrita*, but a significant gene differentiation between the samples of *Euglossa stelfeldi* was detected. These results indicated that the water body that separates the island from mainland does not constitute a geographic barrier for these Euglossini bees. The absence of populational structuring of three out the four species studied corroborated previous reports on those bees, characterized by large populations, with high gene diversity and gene flow and very low of diploid males. Suni & Brosi (2012) showed that the mobility of Euglossini bees differs strongly among species when in fragmented habitats and some of these bees may have high levels of gene flow compared to another bee groups. Although we have worked with morphological data, our results for both species demonstrated some degree of similarity between the studied groups, even considering the distances between the collection sites (from 40.12Km to 342.15Km) and the presence of urban areas and large monocultures around them (which could work as barrier). The great capacity to fly long distances (Janzen, 1971; Kroodsmas, 1975; Ackerman *et al.* 1982), which is one of the most known characteristics of Euglossini bees, could explain the absence of population structuring and the similarity of the studied bee populations. This characteristic can contribute to the gene flow.

In both species, the aggrupation can be explained based on phytophysiognomy variation. For *E. annectans*, the populations from EEC and MV that belong to the same phytophysiognomy (Seasonal Semi-deciduous Forest) are together in a group and PFBJ,

EEJ and EERP that belongs to Seasonal Semi-deciduous Forest with different contact level of Savana biome form another group. APASJ, which is the only one that belongs to a different phytophysiognomy (Montane Dense Ombrophilous Forest), was alone. The dendrograms of morphological similarity, built with Mahalanobis distance, corroborate the data showed in scatterplot. For the dendrogram built by Procrustes distance, the grouping pattern was almost the same showed in the dendrogram built with Mahalanobis distance. The only exception was EERP that, instead of being alone in one branch, was in the same group with EEC. The Discriminant analysis showed a high hit rate, but when we perform the Cross-validation test the rate of identification was somewhat lower, probably based on the high similarity of these samples, as we could check in the analysis that had showed before (Mahalanobis and Procrustes distance values).

As for *E. truncata*, the scatterplot built by CVA analysis showed a tendency of sample separation (based on axel 2), where the bees from APASJ were alone and all the other bees were partially superimposed. This aggrupation can be explained based on the same feature used to explain *E. annectans* data. APASJ is the only one that belongs to Montane Dense Ombrophilous Forest, which grouped more distant than all the others that share Seasonal Semi-deciduous Forest phytophysiognomy. The dendrogram showed an aggrupation that had the same pattern observed in *E. annectans*, except for MV that appeared with EEJ, in the dendrogram built by Mahalanobis distance, and with PFBJ, in the dendrogram built by Procrustes distance. In both cases, the location of sampling shares the same phytophysiognomy (Seasonal Semi-deciduous Forest). The Discriminant analysis and Cross-validation test, showed a high hit rate in the sample identification, corroborating with the high difference observed in the Mahalanobis and Procrustes distance between groups, compared to the *E. annectans* results.

When analyzing the dendrograms of morphological similarity, built based on the Mahalanobis and Procrustes distance for all samples of both species, we also had the same pattern of aggrupation and it corroborate with the phytophysiognomy variation observed in the individual analysis. This aggrupation have shown an interesting pattern of environmental traceability as reported by Mendes *et al.* (2007) Francisco *et al.* (2008), Bischoff *et al.* (2009), and Franco *et al.* (2011) for another bee species, which also have used analysis of geometric morphometrics of wings. A hypothesis to explain the grouping based on phytophysiognomy variation pattern is the phenotypic plasticity, which is the capacity of a single genotype to express a range of phenotypes in response to environmental variation (Fordyce 2006). The phenotypic plasticity is common in insects and it is often highly adaptive (Whitman *et al.*, 2009).

According to our data, the forest fragmentation is not a problem for *E. annectans* and *E. truncata* that live in different sites due to the absence of population structure and the similarity between the samples from different sites. The tendency of samples grouping by phytophysiognomy could be explained by phenotypic plasticity, where, according to Via *et al.* (1995), when environments within a range of specie differ, it may be unlikely that any single phenotype will confer high fitness in all situations. In this case, a change in one phenotype that depends on the environment can provide increased environmental tolerance. Therefore, phenotypic plasticity is one solution to the problem of adaptation to heterogeneous environments. However, for the next step, we suggest the use of

molecular analysis with greater control of environmental variables to thereby substantiating our findings.

5. References

- Ackerman J.D. (1983) Specificity and mutual dependency of the orchid-euglossine bee interaction, *Biol J Linnean Soc* **20**, 301–314.
- Ackerman J.D., Mesler M.R., Lu K.L., Montalvo A.M. (1982) Food-foraging behavior of male Euglossini (Hymenoptera: Apidae): vagabonds or trapliners? *Biotropica* **14**, 241–248.
- Armbruster W.S., Webster G. (1979) Pollination of two species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) in Mexico by euglossine bees. *Biotropica* **11**, 278–283.
- Bischoff L., Schroeder S., Misof B. (2009) Differentiation and range expansion of North American squash bees *Peponapis pruinosa* (Apidae: Apiformes) populations assessed by geometric wing morphometry. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **102**, 60–69.
- Bonatti V., Simões Z.L.P., Franco F.F., Franco T.M. (2014) Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. *Naturwissenschaften* 101 17–24 DOI 10.1007/s00114-013-1123-5
- Brook B.W., Tonkyn D.W., O’Grady J.J., Frankham R. (2002) Contribution of inbreeding to extinction risk in threatened species. *Conserv Ecol* **6**, <http://www.consecol.org/vol6/iss1/art16> (accessed on 17 May 2016).
- Brosi B.J. (2009). The effects of forest fragmentation on euglossine bee communities (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Biol Cons* **142**, 414–423.
- Buchmann S.L. (1981) Preliminary anthecological observations on *Xiphidium caeruleum* Aubl. (Monocotyledonae: Haemodoraceae) in Panama. *J Kans Entomol Soc* **53**, 685–699.
- Cane J.H. (2001) Habitat fragmentation and native bees: a premature verdict? *Conserv Ecol* **5** [online] URL: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art3/>. Accessed 17 May 2016
- Cappellari S.C., Harter-Marques B., Aumeier P., Engels W. (2009) *Mecardonia tenella* (Plantaginaceae) Attracts Oil-, Perfume-, and Pollen-Gathering Bees in Southern Brazil. *Biotropica* **41**, 721–729.
- Carnaval A.C., Hickerson M.J., Haddad C.F., Rodrigues M.T., Moritz C. (2009). Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* **323**, 785–789.

- Cerântola N.D.C.M., Oi C.A., Cervini M., Del Lama M.A. (2010). Genetic differentiation of urban populations of *Euglossa cordata* from the state of São Paulo, Brazil. *Apidologie*.doi:10.1051/apido/2010055
- De Souza D.A., Wang Y., Kaftanoglu O., De Jong D., Amdam G.V., Gonçalves L.S., Franco T.F. (2015) Morphometric Identification of Queens, Workers and Intermediates in In Vitro Reared Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLOS ONE* **10**, 1-14. DOI:10.1371/journal.pone.0123663
- Debat V., Bégin M., Legout H., David J.R. (2003) Allometric and nonallometric components of *Drosophila* wing shape respond differently to developmental temperature. *Evolution* **57**, 2773–2784.
- Dressler R.L. (1982) Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **13**, 373–394
- Eltz T., Sager A., Lunau K. (2005) Juggling with volatiles: exposure of perfumes by displaying male orchid bees. *J. Comp. Physiol. [A]* **191**, 575–581.
- Eltz T., Schmid M., Roubik D.W. (2003) Fragrances, male display and mating behavior of *Euglossa hemichlora* — a flight cage experiment. *Physiol Entomol* **28**, 251–260.
- Fordyce J.A. (2006). The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *J. Exp. Biol.* **209**, 2377–2383.
- Francisco F.O., Nunes-Silva P., Franco T.M., Wittmann D., Imperatriz-Fonseca V.L., Arias, M.C., Morgan, E. D. (2008) Morphometrical, biochemical and molecular tools for assessing biodiversity. An example in *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). *Insect. Soc.* **55**, 231–237.
- Franco T.M., Grassi M.L., Imperatriz-Fonseca V.L., de Jesus May-Itza W., & Quezada-Euán J.J.G. (2011). Geometric morphometrics of the wing as a tool for assigning genetic lineages and geographic origin to *Melipona beecheii* (Hymenoptera: Meliponini). *Apidologie* **42**, 499-507.
- Franco T.M., Silva R.A.O., Nunes-Silva P., Menezes C., Imperatriz-Fonseca V.L. (2009) Gender identification of five genera of stingless bees (Apidae, Meliponini) based on wing morphology. *Genet. Mol. Res.* **8**, 207–214.
- Franco, T.M., Franco, F.F., Roubik, D.W. (2012). Integrated landmark and outline-based morphometric methods efficiently distinguish species of *Euglossa* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Apidologie* **43**, 609-617.
- Frankham R. (2003) Genetics and conservation biology. *C. R. Biologies* **326**, 22–29.
- Hurtado-Burillo M., Laura J., May-Itzá W.J., Quezada-Euán J.J., Ruiz C., De la Rúa P. (2016) A geometric morphometric and microsatellite analyses of *Scaptotrigona mexicana* and *S. pectoralis* (Apidae: Meliponini) sheds light on the biodiversity of Mesoamerican stingless bees. *J Insect Conserv* **20**, 753–763 <http://dx.doi.org/10.1007/s10841-016-9899-1DO>
- Janzen D.H. (1971) Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. *Science* **171**, 203–205.

- Klingenberg C.P. (2011) MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resour* **11**, 353-357.
- Knudsen J.T., Mod S.A. (1996) Floral scents and pollination in neotropical Lecythidaceae. *Biotropica* **28**, 42–60.
- Kroodsma D.E. (1975) Flight distances of male euglossine bees in orchid pollination. *Biotropica* **7**, 71–72.
- Melo G.A. (1995) Fragrance gathering by *Euglossa* males in flowers of *Ternstroemia dentata* (Theaceae) (Hymenoptera: Apidae: Euglossinae). *Entomol Gen* **19**, 281–283.
- Mendes M.F.M., Franco T.M., Nunes-Silva P., Menezes C., Imperatriz-Fonseca V.L. (2007) Intra-populational variability of *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier 1836 (Hymenoptera, Meliponini) using relative warp analysis. *Biosci. J.* **23**, 147–152.
- Michener C.D. (2000) The bees of the World. The John Hopkins Univ Press, Baltimore, p 913.
- Milet-Pinheiro P., Schlindwein C. (2005) Do euglossine males (Apidae, Euglossini) leave tropical rainforest to collect fragrances in sugarcane monocultures? *Rev Bras Zool* **22**, 853-858.
- Miller M.P. (1997) Tools for population genetic analyses (TFPGA): A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author, 4, 157.
- Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., Fonseca G.A.B., Kent J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**, 853-858. doi:10.1038/35002501
- Nogueira P.C.D.L., Marsaioli A.J., Amaral M.D.C.E., Bittrich V. (1998) The fragrant floral oils of *Tovomita* species. *Phytochemistry* **49**, 1009–1012.
- O’Grady J.J., Reed D.H., Brook B.W., Frankham R. (2008) Extinction risk scales better to generations than years. *Anim. Conserv* **11**, 442–451.
- Oleksa A., Tofilski A. (2014) Wing geometric morphometrics and microsatellite analysis provide similar discrimination of honey bee subspecies. *Apidologie* **46**, 49-60. doi:10.1007/s13592-014-0300-7
- Oliveira M.L.d. (2006) Três novas espécies de abelhas da Amazônia pertencentes ao gênero *Eulaema* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Acta Amaz* **36**, 121–128.
- Oliveira M.L.D., Nemésio, A. (2003) *Exaerete lepeletieri* (Hymenoptera: Apidae: Apini: Euglossina): a new cleptoparasitic bee from Amazonia. *Lundiana* **4**, 117–120.
- Powell A., Powell N.V. (1987) Population dynamics of male euglossine bees in amazonian forest fragments. *Biotropica* **19**, 176-179.

- Ramírez S., Dressler R.L., Ospina M. (2002) Abejas euglosinas (Hymenoptera: Apidae) de la Región Neotropical: Listado de especies con notas sobre su biología. *Biota Colombiana* **3**, 7-118.
- Rebêlo J.M.M., Garófalo C.A. (1997) Comunidades de machos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em Matas Semidecíduas do Nordeste do Estado de São Paulo. *An. Soc. Entomol. Brasil* **26**, 243-255.
- Rocha-Filho L.C., Cerântola N.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 Brasil. *Genetica* **141**, 65-74.
- Rohlf F.J. (2008) tpsDig version 2.12. Department of Ecology and Evolution State University of New York Stony Brook
- Roubik D., Hanson P. (2004) Orchid bees of tropical America: biology and field guide. Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), Heredia, Costa Rica.
- Silva F.L., Sella M.L. G., Franco T.M., Costa A.H.R. (2015). Evaluating classification and feature selection techniques for honeybee subspecies identification using wing images. *Comput Electron Agric* **114**, 68-77.
- Siqueira-Filho J.A., Machado I.C. (2008) Flowering phenology and pollination ecology of *Cryptanthus diana* Leme: a case of flower fragrance-collecting by Euglossinae bees in Bromeliaceae. *Selbyana* **29**, 226–232.
- Soares A.A., Campos L.A.O., Vieira M.F., Melo G.A.R. (1989) Relações entre *Euglossa* (*Euglossella*) *mandibularis* Friese, 1899 (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) e *Cyphomandra calycina* (Solanaceae). *Cienc Cult* **41**, 903–905.
- Souza R.O., Del Lama M.A., Cervini M., Mortari N., Eltz T., Zimmermann Y., Bach C., Brosi B.J., Suni S., Quezada-Euán J.J.G., Paxton R.J. (2010) Conservation genetics of neotropical pollinators revisited: microsatellite analysis suggests that diploid males are rare in orchid bees. *Evolution* **64**, 3318–3326.
- Spielman D., Brook B.W., Frankham R. (2004) Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *PNAS* **101**, 15261–15264.
- Suni S.S., Brosi B.J. (2012) Population genetics of orchid bees in a fragmented tropical landscape. *Conserv Genet* **13** 323–332.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731–2739.
- Teichert H., Dötterl S., Zimma B., Ayasse M., Gottsberger G. (2009) Perfume-collecting male euglossine bees as pollinators of a basal angiosperm: the case of *Unonopsis stipitata* (Annonaceae). *Plant Biology* **11**, 29–37.
- Tonhasca A., Albuquerque G.S., Blackmer J.L. (2003) Dispersal of euglossine bees between fragments of the Brazilian Atlantic Forest. *J. Trop. Ecol.* **19**, 99-102.

Via S., Gomulkiewicz R., De Jong G., Scheiner S.M., Schlichting C.D., Van Tienderen P.H. (1995) Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. *Trends Ecol Evol* **10**, 212-217.

Victor, M.A.M. 1975. *A devastação florestal*. Sociedade Brasileira de Silvicultura. São Paulo, Brasil, 48p.

Whitman D.W., Agrawal A.A. (2009). What is phenotypic plasticity and why is it important? In 'Phenotypic Plasticity of Insects' (Eds DW Whitman and TN Ananthakrishnan.) pp. 1–63.

Williams N.H., Dressler R.L. (1976) Euglossine pollination of *Spathiphyllum* (Araceae). *Selbyana*. **1**, 349–356.

Zayed A. (2009) Bee genetics and conservation. *Apidologie* **40**, 237–262.

Zimmermann Y., Schorkopf D.L.P., Moritz R.F.A., Pemberton R.W., Quezada-Euan J.J.G., Eltz T. (2011) Population genetic structure of orchid bees (Euglossini) in anthropogenically altered landscapes. *Conserv. Genet.* **12**, 1183–1194.