

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO - UFMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO - PPGBC**

Denilson Costa Martins

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE
Euglossa cordata (Linnaeus, 1758) EM ECOSISTEMAS DE TRANSIÇÃO NO
NORDESTE DO BRASIL**

SÃO LUÍS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO- UFMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO - PPGBC

Denilson Costa Martins

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE
***Euglossa cordata* (Linnaeus, 1758) EM ECOSISTEMAS DE TRANSIÇÃO NO**
NORDESTE DO BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Maia Correia de Albuquerque/ UFMA

Coorientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Sofia/ UEL

SÃO LUÍS

2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

MARTINS, COSTA DENILSON.
DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE *Euglossa cordata*
Linnaeus, 1758 EM ECOSSISTEMAS DE TRANSIÇÃO NO NORDESTE DO BRASIL
/DENILSON COSTA MARTINS,Wilson Frantine-Silva,José Manuel
Macário Rebêlo. - 2017.
58 f.
Coorientador(a): Silvia Helena Sofia.
Orientador(a): Patrícia Maia Correia de Albuquerque.
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Biodiversidade Conservação/CCBS, Universidade Federal do
Maranhão, São Luís, 2017.
1.*Euglossa cordata*. 2. Euglossini. 3. Microsatelites
4. DNA mitocondrial. 5. Fitorregiões do Maranhão.
6. Variabilidade genética.
I. Frantine-Silva, Wilson. II. Da Silva, Carlos. III Sofia, Silvia. IV. Rebêlo, José Manuel.
V. Maia Correia de Albuquerque, Patrícia.

Denilson Costa Martins

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE
Euglossa cordata (Linnaeus, 1758) EM ECOSISTEMAS DE TRANSIÇÃO NO
NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dr^a. Patricia Maia Correia de Albuquerque/UFMA
Orientadora

Prof. Dr. Dhiego Gomes Ferreira/ UENP
Avaliador Externo

Prof^a. Dr^a Ligia Tchaicka/ UEMA
Avaliador Externo

Aprovada em: ___/ 02 / 2017

AGRADECIMENTOS

A minha mamãe Justina Costa, por acreditar em meus sonhos e torná-los, à medida que possível, ao alcance de minhas mãos, seus ensinamentos são meu apoio como homem. À Rejane Martins, pela sua compreensão, seus conselhos e incentivos, durante a fase de pré-vestibular até os dias de hoje. A minhas tias pelo apoio durante o meu desenvolvimento cognitivo, meu pai João Martins (avô) pelos conselhos e seu amor sincero. À minha noiva Mariana Lopes, pelo incentivo, amor e por compreender a minha ausência, devido ao trabalho e ainda por sempre estar me esperando de braços abertos quando retornava de minhas viagens de campo.

Aos meus companheiros do LEA/UFMA (Laboratório de Estudos sobre Abelhas) pela motivação, auxílio e amizade. Em especial a Edilene e Roberth, que foram de extrema importância na realização de coletas em alguns dos municípios em que o estudo foi realizado. Agradeço ainda as amigas Gracy Chrisley, Carolina Malheiros e Joana pelas trocas de conhecimento. Aos vários amigáveis moradores das cidades em que visitamos para fazer a captura das abelhas, pessoas vitais para a realização do trabalho como: Sr. Péo (Alcântara), Sr. Manuel Homem (Coelho Neto), Vavá (Barão de Grajaú), Sr. Domingos (Formosa da Serra Negra), Celso (Carutapera), Dona Rosa (Magalhães de Almeida) entre outras.

Aos meus mais novos amigos do LAGEA/UDEL (Laboratório de Genética e Ecologia Animal): André, Caroline, Camila, Douglas, Dhiego, Karen, Lenice, Natalia e Raul, pela paciência em algumas ocasiões, momentos extrovertidos e ensinamentos. Aos colaboradores Carlos e Wilson pela “alfabetização genética” e apoio prático no laboratório, em especial ao Wilson que foi minha bússola durante as práticas laboratoriais e as análises genéticas posteriores da pesquisa.

Agradeço ao Senhor JESUS, pois durante toda minha vida, Ele sempre colocou pessoas boas em meu caminho, sendo todas vitais em diferentes fases. Dentre elas, a pessoa que me guiou durante a fase de graduação e o mestrado, minha orientadora. Um imenso obrigado, à minha Orientadora Prof.^a Dra. Patrícia Albuquerque, pelas oportunidades e confiança a mim depositada durante a execução do estudo, sou grato pelos puxões de orelha, conselhos e por sempre me guiar em meio aos inúmeros obstáculos do trabalho.

Ao meu Coorientador Prof. Dr. Macário Rêbello por me guiar durante o andamento do projeto, principalmente na escolha das áreas de estudo e metodologia de coletas das

abelhas. A minha Coorientadora Prof^ª. Dra. Silvia Helena Sofia por me ajudar na adaptação as práticas do laboratório de genética, por me aceitar junto a família LAGEA, pelas enormes contribuições durante a pesquisa e por ser meu “porto seguro” durante a realização do estágio no LAGEA/UEL, que teve a finalidade de gerar os resultados do trabalho.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, pelas contribuições durante minha formação, as quais me auxiliaram a me tornar um pesquisador melhor.

Agradecemos a FAPEMA pelo financiamento do projeto e pela concessão da bolsa de estágio de curta duração, que foi vital na realização das análises genéticas do trabalho e ainda á CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
Lista de Figuras	10
Lista de Tabelas	11
INTRODUÇÃO GERAL	12
<i>Ameaças a Biodiversidade</i>	13
<i>Características da Vegetação do Maranhão</i>	14
<i>Os Euglossini no Maranhão</i>	15
<i>Conservação da Diversidade Genética</i>	16
Referências Bibliográficas	17
Diversidade e Estrutura Genética de <i>Euglossa cordata</i> (Linnaeus, 1758) em Ecossistemas de Transição no Nordeste do Brasil	23
Resumo	24
Abstract	25
Introdução	26
Materiais e Métodos	29
<i>Áreas de Estudos</i>	29
<i>Captura das Abelhas</i>	30
<i>Extração de DNA</i>	31
<i>Marcadores Moleculares</i>	31
Análise de Dados	33
<i>Marcadores Microsatélite</i>	33
<i>Marcadores Mitocondriais</i>	34
Resultados	35
<i>Microsatélites</i>	35
<i>DNAmt</i>	40
Discussão/ Conclusão	45
Referências	50
Apêndice	58

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE
Euglossa cordata (Linnaeus, 1758) EM ECOSISTEMAS DE TRANSIÇÃO NO
NORDESTE DO BRASIL**

RESUMO

Os Euglossini constituem um importante grupo de abelhas responsável pela manutenção dos ecossistemas florestais na Região Neotropical, devido a busca por compostos químicos por parte dos seus machos. Em razão da interação dos machos de Euglossini e determinados grupos de plantas como fonte de aromas, substâncias químicas análogas as produzidas por estas plantas tornaram-se importantes ferramentas em estudos ecológicos e genéticos com estes organismos. Por situar-se em zona de transição entre os biomas Amazônia, Cerrado e Caatinga, o Maranhão abriga uma complexa mistura de paisagens naturais, que podem ser divididas em oito fitorregiões. Dessa forma, o presente estudo buscou investigar se existe diferença na estrutura genética de subpopulações de *Euglossa cordata* distribuídas ao longo das diferentes paisagens maranhenses. Para responder esta questão foram capturados 337 machos de *E. cordata* em 12 localidades do estado do Maranhão e uma no estado do Pará. Foram analisados seis *loci* microssatélites (Egc 18, Egc 24, Egc 26, Egc 30b, Egc 37, Ann2) para todas as amostras. Ao mesmo tempo, a análise de um segmento de 601pb do gene mitocondrial *Cit b* foi conduzida para 107 machos. Foram detectados elevados valores de diferenciação genética para a amostra de São Luís, tanto para os marcadores microssatélites quanto para o DNA_{mt} ($mt\phi_{ST}=0,420$, AL x SL; $mt\phi_{ST}=0,392$, HC x S; $mt\phi_{ST}=0,350$ AJ x SL). Ainda, com base nos marcadores nucleares, também a localidade de Alcântara apresentou estruturação significativa em algumas comparações ($\phi_{ST}=0,20$, AL x FN, AL x FN, AL x SL). Dois grandes grupos de subpopulações de *E. cordata* foram encontrados por meio da análise Bayesiana, colocando a subpopulação de São Luís em um extremo e a de Alcântara em outro. Com base nos resultados obtidos, descartou-se a associação da diversidade genética de *E. cordata* a determinadas fitorregiões. Assim, estima-se que fatores históricos aliados a ações antrópicas para cada fitorregião podem ter influenciado nos altos valores de diferenciação genética encontrados. Com base em nossos dados pode-se inferir que as subpopulações de *E. cordata* amostradas no estado do Maranhão apresentam diferenças genéticas importantes que merecem atenção ao se propor medidas para manejo e conservação de tais populações.

Palavras-chave: *Euglossa cordata*, Euglossini, Microssatélites, DNA mitocondrial, Fitorregiões do Maranhão, variabilidade genética

**DIVERSITY AND GENETIC STRUCTURE OF *EUGLOSSA CORDATA*
(LINNAEUS, 1758) IN A TRANSITION ECOSYSTEMS IN THE NORTHEAST
OF BRAZIL**

ABSTRACT

The Euglossini are an important group of bees responsible for the conservation of forest ecosystems in the Neotropical region, due to the search for chemical compounds by their males. Due to the interaction of Euglossini males and certain groups of plants as a source of aromas, analogous chemicals produced by these plants have become important tools in ecological and genetic studies with these organisms. Since Maranhão is located in a transition zone between the Amazon, Cerrado and Caatinga biomes, it houses a complex mixture of natural landscapes, which can be divided into eight phytoregions. Thus, the present study aimed to study if there is a difference in the genetic structure of *Euglossa cordata* subpopulations distributed throughout the different landscapes of Maranhão. To answer this question, 337 males of *E. cordata* were captured in 12 locations in the state of Maranhão and one in the state of Pará. Six microsatellite loci (Egc 18, Egc 24, Egc 26, Egc 30b, Egc 37, Ann2) were analyzed for all samples. At the same time, an analysis of a 601pb segment of the *Cit b* mitochondrial gene was conducted for 107 males. High values of genetic differentiation were detected for the São Luís sample, either for the microsatellite markers and for the *mtDNA* ($mt\phi_{ST}=0,420$, AL x SL; $mt\phi_{ST}= 0,392$, HC x S; $mt\phi_{ST}=0,350$ AJ x SL). Also, based on the nuclear markers, the locality of Alcântara also presented significant structuring in some comparisons ($\phi_{ST}= 0,20$, AL x FN, AL x FN, AL x SL). Two large groups of *E. cordata* subpopulations were found by Bayesian analysis, placing at one extreme the subpopulation of São Luís and the other one, Alcântara. Based on the results obtained, the association of the genetic diversity of *E. cordata* to certain phytoregions was discarded. Thus, it is estimated that historical factors allied to anthropic actions for each phyto-region may have influenced the high values of genetic differentiation found. Based on our data, it can be concluded that the subpopulations of *E. cordata* sampled in the State of Maranhão present important genetic differences that deserve attention when proposing measures for the management and conservation of these populations.

Keywords: *Euglossa cordata*, Euglossini, Microsatellite, mitochondrial DNA, Maranhão's phytoregions, genetic variability.

Lista de Figuras

Fig. 1 Mapa do Maranhão (MA) evidenciando as oito zonas fitogeográficas do estado, assim como os respectivos municípios de coleta dos machos de *Euglossa cordata*: **AL** – Alcântara; **AJ** – Anajatuba; **BC** – Bacabal; **CA** – Carutapera; **CX** – Caxias; **CN** - Coelho Neto; **CP** – Cururupu; **FN** – Formosa de Serra Negra; **HC** – Humberto de Campos; **MG** – Magalhães de Almeida e **VG** – Vargem Grande (Adaptado de Rebêlo e Silva 1999).

Fig. 2 Perfil de eletroferograma ilustrando a diploidia de um macho de *Euglossa cordata*, para quatro locos de microssatélite (EGC 30A, EGC 18, EGC 24 e EGC 26).

Fig. 3 Agrupamentos Bayesianos formados a partir de $K=2$ para amostras de *Euglossa cordata* de diferentes localidades maranhenses e uma do estado do Pará.

Fig.4 Frequência de alelos de microssatélites para subpopulações de *E. cordata* de Alcântara (verde) e São Luís (vermelho) em duas localidades em áreas de transição no nordeste do Brasil. Observar que as escalas dos eixos y variam nos diferentes gráficos.

Fig. 5 Frequência e distribuição dos diferentes haplótipos encontrados nas subpopulações de *E. cordata*. Os padrões coloridos representam os diferentes haplótipos encontrados nas populações de amostradas, enquanto que os haplótipos em branco correspondem à elementos privativos de cada população.

Fig. 6 Rede de haplótipos *Median-Joining* inferida a partir de 601pb do gene mitocondrial *Cit b* de 107 indivíduos distribuídos nos sítios de amostragem, gerado para os 22 haplótipos amostrados (H1-H22). Os tamanhos dos círculos são proporcionais à frequência dos respectivos haplótipos (H). Cada círculo representa um haplótipo, cores denotam localidades, enquanto as barras de linhas ligadas representa um passo mutacional e os círculos pretos representam os vetores medianos.

Lista de Tabelas

Tabela 1 Diversidade genética estimada para as 13 amostras de *Euglossa cordata*, amostradas em 12 localidades do estado do Maranhão (MA) e uma no estado do Pará (PA). N = número de machos analisados; He = heteroziguidade média esperada; A = quantidade de alelos; Na = média de alelos por população; Ra = riqueza alélica; Ap = riqueza de alelos privados; s.e. = erro padrão.

Tabela 2 Análise de Variância Molecular (AMOVA) das amostras (ou subpopulações) de *Euglossa cordata* das 13 localidades de estudo.

Tabela 3 Estimativas de diferenciação genética D_{jost} (diagonal superior) e ϕ_{ST} (diagonal inferior) para os dados de microssatélites obtidos entre as subpopulações de *Euglossa cordata* de oito ecossistemas distintos do Maranhão e uma no estado do Pará. Localidades com colorações similares estão presentes na mesma fitorregião. De cor cinza, os valores significativos de diferenciação mais elevados para os dois estimadores, enquanto os valores em negrito são valores não significativos.

Tabela 4 Índices de diversidade genética baseados em 601 pb do gene mitocondrial *Cit b* proveniente de 107 indivíduos de *Euglossa cordata* amostrados em 12 localidades do estado do Maranhão (MA) e uma no estado do Pará (PA). N = número de machos analisados; S = número de sítios segregantes; Nh = Número de haplótipos; Hd = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica; dp = desvio padrão.

Tabela 5 Distância em quilômetros e valores de $mt\phi_{ST}$ baseados na comparação par a par de 601pb de um segmento do gene mitocondrial *citocromo b* (*Cit b*) de 107 indivíduos de *Euglossa cordata* amostrados em 12 localidades no estado do Maranhão e uma no estado do Pará (BL). Fitorregiões L = código da localidade e N = número de indivíduos. Localidades com colorações similares estão presentes na mesma fitorregião. Valores em negrito correspondem as estimativas mais elevados de diferenciação genética.

INTRODUÇÃO GERAL

Um dos grupos de abelhas mais importantes na manutenção dos ecossistemas naturais é o das abelhas Euglossini, que em razão da interação dos machos desta tribo com membros da família Orchidaceae, buscando fontes de substâncias aromáticas, são frequentemente denominadas como “abelhas das orquídeas”. Embora denominadas desta forma, machos e fêmeas de Euglossini são polinizadoras de várias famílias botânicas (ZUCCHI; SAKAGAMI; CAMARGO, 1969; DRESSLER, 1982; REBÊLO, 2001; ROUBIK; HANSON, 2004), tornando-os organismos vitais nos serviços de polinização de plantas em diferentes ambientes.

Quanto as substâncias coletadas por estas abelhas, o uso ainda permanece incerto, porém acredita-se que esteja relacionado com a atividade de corte dos machos deste grupo (ELTZ et al., 1999). Durante a década de 1960, aconteceram importantes avanços nos estudos dos Euglossini devido a síntese em laboratório de substâncias análogas as produzidas pelas orquídeas, as quais passaram a ser usadas, de forma artificial, para atrair machos desta tribo (DODSON et al., 1969). Assim, estas substâncias, tornaram-se ferramentas importantes na mensuração de aspectos como: diversidade local, preferências por aromas, longevidade dos machos, fragmentação e recentemente estudos sobre perda de diversidade genética (POWELL; POWELL, 1987; RAMÍREZ et al., 2002; FARIA et al., 2008; CERÂNTOLA et al., 2010), o que possibilitou a realização de pesquisas mais aprofundadas em diferentes ambientes.

Apesar de reconhecidas como importantes polinizadores neotropicais, e por vezes exclusivos de muitas espécies de orquídeas, vários estudos realizados nas últimas décadas têm apontado as abelhas das orquídeas como um grupo sensível a processos de interferência antrópica, a exemplo da fragmentação florestal (POWELL; POWELL, 1987; MORATO, 1994; BROSI, 2009). Algumas espécies da tribo têm sido reconhecidas como potencialmente mais sensíveis à perturbação antrópica do que outras, se mostrando mais frequentes ou restritas a ambientes mais preservados (POWELL; POWELL, 1987; TONHASCA; BLACKMER; ALBUQUERQUE, 2002; SOFIA; SUZUKI, 2004; PARRA-H; NATES-PARRA, 2007; GIANGARELLI et al., 2009). Em estudo realizado na Mata Atlântica, Nemésio (2011) relatou a possível extinção local da população de *Euglossa marianae* Nemésio, uma espécie endêmica de Euglossini que aparentemente depende de ambientes florestais, mostrando que mesmo o grupo sendo amplamente

distribuído e diversificado, é insuficiente frente as alterações antrópicas nos ambientes naturais.

Ameaças a Biodiversidade

Nos últimos anos vários estudos têm reportado o declínio de populações de abelhas no mundo todo (BIESMEIJER et al., 2006; POTTS et al., 2010; CAMERON et al., 2011; BARTHOLOMEUS; CALDERS, 2014). Como consequência deste fato, os serviços de polinização nas áreas afetadas acabam sendo comprometidos (IMPERATRIZ-FONSECA; SARAIVA; DE JONG, 2006), com ameaça da biodiversidade global dos ecossistemas afetados, uma vez que as abelhas são consideradas o principal grupo de polinizadores da maioria das comunidades vegetais do planeta (NEFF; SIMPSON, 1997). Dentre as principais causas que têm sido apontadas para o declínio mundial de abelhas estão a perda de cobertura vegetal resultante da ação antrópica, uso de inseticidas e outros agentes agrotóxicos, mudanças climáticas e a perda de diversidade genética das populações destes polinizadores (BROWN; PAXTON, 2009; ZAYED; ROUBIK; PACKER, 2009; MARTINS; MELO, 2010; POTTS et al., 2010a), ficando estas mais susceptíveis a mudanças ambientais, a exemplo das próprias mudanças do clima (MARTINS; MELO, 2010). Diante deste cenário, Brown e Paxton (2009) apontam a necessidade de um maior número de estudos genéticos de populações de abelhas como uma das ações que devem ser priorizadas para sustentar futuras estratégias de conservação deste importante grupo de polinizadores.

Segundo Waldschmidt et al. (2005) a perda de habitat em razão de sua fragmentação pode reduzir o tamanho das populações de abelhas e causar uma consequente redução na variabilidade genética. Sabe-se que populações pequenas e isoladas estão sujeitas a perdas de variabilidade genéticas, comumente causadas pela deriva genética e endocruzamento, e que estas perdas, em última instância, podem culminar no decréscimo da capacidade adaptativa e eventual extinção de tais populações (FERGUSON et al. 1995; FRANKHAM; BALLOD; BRISCOE, 2008). Dessa forma, conhecer a estrutura e diversidade genética das populações de abelhas é fundamental na elaboração de programas de manejo e conservação (FRANKHAM; BALLOD; BRISCOE, 2008).

Além disto, é importante considerar que as paisagens fragmentadas, resultantes de ações antrópicas ou da própria característica da vegetação regional, incluindo as influências do clima, podem afetar o deslocamento de algumas espécies, limitando o fluxo

gênico. Deste modo, torna-se de grande relevância as investigações relativas ao possível efeito da fragmentação de habitats na diversidade e estrutura genética nas populações destas espécies. No caso particular de Euglossini, alguns estudos já demonstram interferências diretas da fragmentação de habitats no deslocamento de algumas espécies (POWELL; POWELL, 1987; MILET-PINHEIRO; SCHLINDWEIN 2005; ROSA et al., 2015), que pode comprometer o fluxo gênico, determinando diferentes estruturas genéticas destas populações (ROSA et al., 2015).

Conceitualmente, a diversidade genética é caracterizada por diferenças em muitos caracteres, incluindo a cor dos olhos, cabelos, pele e as diferenças nas proteínas, enzimas e sequências de DNA dentro das populações das espécies (FRANKHAM; BALLOD; BRISCOE, 2008). Assim a manutenção da diversidade genética nas populações pode garantir a sobrevivência frente a condição adversas no ambiente.

Características da Vegetação do Maranhão

O Maranhão encontra-se em uma área de transição entre os biomas Amazônia, Cerrado e Caatinga, o que lhe atribui elevada diversidade geomorfológica e ambiental. Contudo, a expansão humana nos ambientes maranhenses tem causado intensas alterações em suas paisagens naturais, seja pelo uso em atividades de pastejo, agroindustrial, mineralogia e madeireira (SEMA, 2011). Estes problemas podem ser ainda mais graves próximos aos grandes centros urbanos devido ao aumento demográfico das populações humanas.

Além de formações comuns a Amazônia, Cerrado e Caatinga, existem outras formações bem representativas no estado do Maranhão. Entre estas, as Matas de Cocais que cobrem a região ocidental, se estendendo a leste e distribuindo-se ao longo de um quarto do território, com uma composição predominante de palmeiras de babaçu (*Orbignya martiana* B.R.), tucum (*Bactris setosa* Mart.) e carnaúba (*Copernicia cerifera* Mart) (BRASIL 1984 citado por REBÊLO; RÊGO; ALBUQUERQUE, 2003). Outra formação bastante comum do Maranhão são os Campos Alúviais ou Baixada Maranhense, no qual a vegetação é mista com a ocorrência de inundações periódicas nos campos, havendo espécies vegetais como aguapé (*Eichhornia crassipes* (Sw.) Kunth), tripa de vaca (*Neptunia plena* Benth) e a cebola (*Pontederia parviflora* Alexander) (IBAÑES et al., 2000).

Em razão de tais características, o estado mostra-se como uma das áreas de maior diversidade do nordeste brasileiro (DIAS et al., 2009). Assim, é de se esperar que o

Maranhão tenha elevada importância no aspecto ecológico, pois esta condição de transição garante uma enorme sobreposição e interação de elementos faunísticos dos três grandes biomas presentes (REBÊLO 2001), contribuindo para a grande riqueza de espécies da região. Neste sentido, o Maranhão pode ser dividido em oito zonas fitogeográficas: I - Restingas e dunas; II - Cerrados meridionais; III - Campo aluvial flúvio-marinho (Baixada Maranhense); IV - Zona mista de matas, Cocais e cerrados; V - Zona mista de matas e cocais; VI - Amazônia maranhense; VII - Zona de cerrado e caatinga; e VIII - Ilha de São Luís (REBÊLO et al., 1999; REBÊLO; SILVA 1999). Assim, este conjunto de ambientes oferece elevada diversidade floral a importantes polinizadores como as abelhas, que constituem um grupo relativamente bem conhecido na porção norte do estado, com uma riqueza de 173 espécies (REBÊLO; RÊGO; ALBUQUERQUE, 2003). Contudo, a fauna de abelhas para as demais áreas do território maranhense permanece ainda desconhecida do ponto de vista científico.

Os Euglossini no Maranhão

Em um dos estudos pioneiros e de grande importância para a caracterização da fauna de Euglossini no estado do Maranhão, Rebêlo e Silva (1999) relataram a ocorrência de 44 espécies da tribo, revelando a existência de uma fauna bastante rica. A descoberta posterior, relatando a ocorrência de *Aglae caerulea* Lepeletier & Serville, 1825, uma espécie endêmica da bacia amazônica (MARTINS et al., 2016), torna o Maranhão um dos estados mais ricos quanto a fauna deste grupo de abelhas.

Enquanto a diversidade de espécies de Euglossini encontra-se bem caracterizada para este estado brasileiro (REBÊLO; CABRAL, 1997; NEVES; VIANA, 1999, 2003; BRITO; RÊGO, 2001; SILVA; REBÊLO, 2002; SILVA et al., 2009), nota-se ainda uma carência indiscutível de estudos que permitam caracterizar a diversidade e estrutura genética de populações destas abelhas distribuídas através dos diferentes ecossistemas vegetais que compõem o conjunto diverso de formações vegetais do Maranhão, e que, assim como acontece em outros estados brasileiros, encontram-se sob forte pressão antrópica (MENDES et al., 2008; SEMA, 2011; BARRETO; EUPEN; VAN, 2012).

Finalmente, ao se considerar a localização ímpar do Maranhão, o qual se encontra em uma região intermediária entre a zona de transição dos climas semi-áridos do interior do Nordeste para os úmidos equatoriais da Amazônia, com formações vegetais como Cerrado, Florestas Estacionais e Florestas Ombrófilas (IBGE, 1997), torna-se especialmente interessante investigar se, de alguma forma, esta condição de transição

poderia estar afetando a diversidade e estrutura genética de algumas populações destas abelhas.

Neste contexto, estudar a diversidade genética de uma espécie que faça parte das assembleias de Euglossini presentes nos diferentes ecossistemas, ou tipos de formações vegetais, distribuídos ao longo desta região de transição de climas no território do estado é fundamental para o maior entendimento da estrutura genética das populações da espécie em questão. Neste sentido, *Euglossa cordata* L. se mostra uma espécie que preenche este requisito, tendo sido, portanto, objeto de investigação do presente estudo.

Conservação da Diversidade Genética

Como já destacado, estudos que buscaram avaliar o efeito da paisagem sobre populações de Euglossini mostraram que algumas espécies podem exibir uma maior limitação que outras em transpor áreas desmatadas ou penetrar a matriz circundante no entorno de fragmentos florestais (POWELL; POWELL, 1987; MILET-PINHEIRO; SCHLINDWEIN, 2005), fato este que pode alterar o fluxo gênico, e como consequência, a diversidade e estrutura genética das populações afetadas.

A análise da estrutura genética em estudos de conservação é também de grande relevância. Se a população de uma espécie ameaçada, que ocupa uma determinada área, se apresenta estruturada, então a estratégia de conservação deve procurar preservar a diversidade genética da espécie naquela área, pois já podem existir adaptações locais que se perderiam no caso da população ser misturada com outras. Por outro lado, se a população da espécie é homogênea ao longo de toda área de ocorrência, é viável concentrar a proteção da espécie em apenas uma área, usando indivíduos desta área para re-colonização das outras, quando necessário (SOLÉ-CAVA; CUNHA 2012).

Além disto, conhecer a estrutura genética de populações a partir da análise do genoma mitocondrial, ou seja, via marcadores mitocondriais, os quais, por suas características, são altamente informativos para inferências evolutivas em populações isoladas há longos períodos de tempo (AVISE, 2004), torna-se altamente interessante no que se refere aos diversos ecossistemas vegetais maranhenses e suas faunas de abelhas.

Nos últimos anos, tais técnicas têm sido aplicadas com interesse no estudo e em abordagens voltadas à conservação de espécies de Euglossini (CERÂNTOLA et al., 2011; FREIRIA et al., 2012; NEMÉSIO et al., 2012; ROCHA-FILHO et al., 2013; BOFF et al. 2014; PENHA et al., 2015). Embora todos estes estudos tenham sido realizados no Brasil, o foco deles incluiu populações de Euglossini presentes em remanescentes de Mata

Atlântica das regiões sul e sudeste, o que destaca uma carência de estudos genéticos para populações de Euglossini distribuídas na região mais ao norte do país, onde as ameaças à biodiversidade decorrentes de ações antrópicas, a exemplo do desmatamento, são frequentes e de grande relevância.

Referências Bibliográficas

AVISE, J. C. **Molecular Markers: Natural History and Evolution**. Springer Science & Business Media, p.507, 2004.

BARRETO, L.; EUPEN, M.; VAN; KOK, K. et al. The impact of soybean expansion on mammal and bird, in the Balsas region , north Brazilian Cerrado. **Journal for Nature Conservation**, v. 20, n. 6, p. 374–383, 2012.

BARTHOLOMEUS, H.; CALDERS, K. Monitoring the ‘lungs of the earth. In 2013 **Yearbook of the Environmental Sciences Group: examples of research and education**, p. 19-19, WUR ESG, 84p., 2014.

BIESMEIJER, J.C., ROBERTS, S. P. M., REEMER, M., OHLEMÜLLER, R., EDWARDS, M., PEETERS, T; SETTELE, J. Parallel Declines in Pollinators and Insect-Pollinated Plants in Britain and the Netherlands. **Science**, v. 313, n. July, p. 351–354, 2006.

BOFF, S. B.; EMARCO, D. D.; ARCHI, P. M.; LVES, I. A.; ANTOS, O. S. Perfume production in flowers of *Angelonia salicariifolia* attracts males of *Euglossa annectans* which do not promote pollination. **Apidologie**, v. 46, p. 84–91, 2015.

BRITO, C.M.S.; REGO, M.M.C. Community of Male Euglossini Bees (Hymenoptera: Apidae) in a Secondary Forest, Alcântara, MA, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, n. 4, p. 631–638, 2001.

BROSI, B. J. The effects of forest fragmentation on euglossine bee communities (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Biological Conservation**, v. 142, n. 2, p. 414–423, 2009.

BROWN, M. J. F.; PAXTON, R. J.; BROWN, M. J. F.; PAXTON, R. J. The conservation of bees : a global perspective. **Apidologie**, v. 40, n. 3, p. 410–416, 2009.

CAMERON, S. A. Phylogeny and biology of neotropical orchid bees (Euglossini). **Annual review of entomology**, v. 49, n. 107, p. 377–404, 2004.

CERÂNTOLA, N. C. M; OI, C.A, CERVINI, M; DEL LAMA, M. A. Genetic differentiation of urban populations of *Euglossa cordata* from the state of São Paulo, Brazil. **Apidologie**, v. 42, p. 214–222, 2011.

DIAS, P. A.; DOS SANTOS, C. L. C.; RODRIGUES, F. S.; ROSA, L. C.; SILVA, K.; REBÊLO, J.M.M. Espécies de moscas ectoparasitas (Diptera , Hippoboscoidea) de

morcegos (Mammalia, Chiroptera) no estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 1, p. 128–133, 2009.

DODSON, C. H.; DRESSLER, R. L.; HILLS, H. G.; ADAMS, R. M.; WILLIAMS, N. H. Biologically active compounds in orchid fragrances. **Science**, v. 164, p. 1243–1249, 1969.

ELTZ, T.; WHITTEN, W. M.; ROUBIK, D. W.; LINSENMAIR, K. E. Fragrance Collection, Storage and Accumulation by Individual Male Orchid Bees. **Journal Of Chemical Ecology**, v. 25, n. 1, p. 157–176, 1999.

FERGUSON, A. J. B. T.; PRODÖHL, P. A.; MCMEEL, O.; THOMPSON, C.; STONE, C.; MCGINNITY, P.; HYNES, R. A. Population and conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 47, p. 103–126, 1995.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, p.280, 2008.

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

IBAÑES, M. S. R.; CAVALCANTE, P. R. S.; COSTA NETO, J. P.; BARBIERI, R.; PONTES, J. P.; SANTANA, S. C. C.; SERRA, C. L. M.; NAKAMOTO, N.; MITAMURA, O. Limnological characteristics of three aquatic systems of the preamazonian floodplain, Baixada Maranhense (Maranhão, Brazil). **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v. 3, n. 4, p. 521-531, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Zoneamento Geoambiental do Estado do Maranhão**. Disponível em, ftp://geoftp.ibge.gov.br/documentos/recursos_naturais/diagnosticos/maranhao.pdf. Acessado, 20 maio 2015, 1997.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M.; DE JONG, D. **Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices**. Ribeirão Preto, p. 112, 2006.

MARTINS, A. C.; MELO, G. A. R. Has the bumblebee *Bombus bellicosus* gone extinct in the northern portion of its distribution range in Brazil portion of its distribution range in Brazil? **Jornal of Insect Conservation**, v. 14, n. October, p. 207–210, 2010.

MARTINS, D. C.; ALBUQUERQUE, P.M.C.; SILVA, F.S.; J. M. M. REBÊLO. First record of *Aglae caerulea* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) in Brazilian Cerrado east of the Amazon Region, Maranhão State, **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, p. 554-556, 2016.

MENDES, F. N.; RÊGO, M. M. C.; CARVALHO, C. C. DE. Abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) coletadas em uma monocultura de eucalipto circundada por

Cerrado em Urbano Santos, Maranhão, Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 98, n. 3, p. 285–290, 2008.

MILET-PINHEIRO, P.; SCHLINDWEIN, C. Do euglossine males (Apidae, Euglossini) leave tropical rainforest to collect fragrances in sugarcane monocultures? **Revista Brasileira de Zoologia** **22**, v. 22, n. 4, p. 853–858, 2005.

MORATO, E.F. Abundância e riqueza de machos de Euglossini (Hymenoptera, Apidae) em mata de terra firme e áreas de derrubada, nas vizinhanças de Manaus (Brasil). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, serie Zoologia**, v. 10, p. 95-105, 1994.

NEFF, J. L.; SIMPSON, B. B. Nesting and Foraging Behavior of *Andrena* {*Callandrena*} *rudbeckiae* Robertson (Hymenoptera: Apoidea: Andrenidae) in Texas. **Journal Of The Kansas Entomological Society**, v.70, n. 2, p. 100–113, 1997.

NEMÉSIO, A. *Euglossa marianae* sp. n. (Hymenoptera: Apidae): a new orchid bee from the Brazilian Atlantic Forest and the possible first documented local extinction of a forest-dependent orchid bee. **Zootaxa**, v. 68, n. May, p. 59–68, 2011.

NEMÉSIO, A.; CERÂNTOLA, N.C. M.; VASCONCELOS, H. L.; NABOUT, J. C.; SILVEIRA, F. A.; DEL LAMA, M. A. Searching for *Euglossa cyanochlora* Moure, 1996 (Hymenoptera, Apidae), one of the rarest bees in the world. **Journal of Insect Conservation**, v.16, p. 745–755, 2012.

NEVES, E. L.; VIANA, B. F. Comunidade de Machos de Euglossinae (Hymenoptera : Apidae) das Matas Ciliares da Margem Esquerda do Médio Rio São Francisco , Bahia. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 2, p. 201–210, 1999.

NEVES, E. L.; VIANA, B. F. A Fauna de Abelhas da subtribo Euglossina(Hymenoptera, Apidae) do Estado da Bahia, Brasil. **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure**, v.90, p. 223–229, 2003.

PENHA, R. E. S.; GAGLIANONE, M. C.; ALMEIDA, F. S.; BOFF, S. V.; SOFIA, S. H. Mitochondrial DNA of *Euglossa iopoecila* (Apidae, Euglossini) reveals two distinct lineages for this orchid bee species endemic to the Atlantic Forest. **Apidologie**, doi, 10.1007/s13592-014-0329-7, 2015.

POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 2, n. February, p. 345–353, 2010.

POTTS, S. G.; ROBERTS, S. P. M.; DEAN, R.; et al. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe Pérdidas de abejas manejadas y apicultores en Europa. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 15–22, 2010.

POWELL, A. H.; POWELL, G. V. N. Population Dynamics of Male Euglossine Bees in Amazonian Forest Fragments. **Biotropica**, v. 19, n. 2, p. 176–179, 2007.

RAMÍREZ, S.; DRESSLER, R. L. Abejas euglosinas (Hymenoptera: Apidae) de la Región Neotropical: Listado de especies con notas sobre su biología. **Biota Colombiana**, v. 3, n. 1, p. 7–118, 2002.

REBÊLO, J. M. M.; CABRAL A. J. M. Abelhas Euglossinae de Barreirinhas, Zona do Litoral da Baixada Oriental Maranhense. **Acta Amazonica**, v. 27, n. 2, p. 145–152, 1997.

REBÊLO, J. M.M.; SILVA, F.; PEREIRA, Y.N.; COSTA, J.L; SILVA, J. Distribuição de *Aedes aegypti* e do dengue no Estado do Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.15, n.3, p. 477-486, 1999.

REBÊLO, J. M. M.; SILVA, F. S. Distribuição das Abelhas Euglossini (Hymenoptera: Apidae) no estado do Maranhão, Brasil. **Anais da Sociedade de Entomologia do Brasil**, v. 28, n.3, p. 389–401, 1999.

REBÊLO, J.M.M. **História natural das Euglossíneas, As abelhas das Orquídeas**. São Luís, Lithograf Editora, p.221, 2001.

REBÊLO, J. M. M.; RÊGO, M. M. C.; ALBUQUERQUE, P. M. C. Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) da região setentrional do Estado do Maranhão, Brasil. **Apoidea Neotropical, Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure**. Editora UNESC, Criciúma, p. 265–278, 2003.

ROCHA-FILHO, L. C.; CERÂNTOLA, N. C. M.; GARÓFALO, C. A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; DEL LAMA, M. A. Genetic differentiation of the Euglossini (Hymenoptera, Apidae) populations on a mainland coastal plain and an island in southeastern Brazil. **Genetica**, v. 141, p. 65–74, 2013.

ROSA, J. F. R.; AMALHO, M. R.; ONTEIRO, D. M. Permeability of matrices of agricultural crops to Euglossina bees (Hymenoptera, Apidae) in the Atlantic Rain Forest. **Apidologie**, v. 46, p. 691–702, 2015.

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

SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE DO ESTADO DO MARANHÃO. **Plano de Ação para Prevenção e Controle do Desmatamento e das Queimadas no Estado do Maranhão**, São Luís, Maranhão, p.110, 2011.

SILVA, F.S.; REBÊLO, J.M.M. Population Dynamics of Euglossinae Bees (Hymenoptera, Apidae) in an early Second-Growth Forest of Cajual Island, in the state of Maranhão, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 29, n. 4, p. 587-599, 2002.

SILVA, O.; RÊGO, M. M. C.; ALBUQUERQUE, P. M. C.; RAMOS, M. C. Abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em Área de Restinga do Nordeste do Maranhão. **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 186-196, 2009.

SOLÈ-CAVA, A. M. S.; CUNHA, H. Genética e a Conservação da Natureza. Pp. 217–238. In: Matioli, S. R., Fernandes, F. M. C. (eds.). **Biologia Molecular e Evolução (2.ed.)** Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, Holos, 2012.

TONHASCA, J. A, BLACKMER, J. L, ALBUQUERQUE, G. S. Abundance and Diversity of Euglossine Bees in the Fragmented Landscape of the Brazilian Atlantic Forest'. **Biotropica**, v. 34, n. 3, p. 416–422, 2002.

WALDSCHMIDT, A. M.; LOPES, L. A.; MARCO JR. P.; CAMPOS, L. A. O. Genetics of Euglossini bees (Hymenoptera) in fragments of the Atlantic Forest in the region of Viçosa, MG. **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 65, n. 3, p. 541–9, 2005.

ZAYED, A.; ROUBIK, D. W.; PACKER, L. Use of diploid male frequency data as an indicator of pollinator decline. **Proceedings. Biological sciences The Royal Society**, v. 271 Suppl, n. Goudet 1995, p. S9-12, 2004.

ZUCCHI, R.; SAKAGAMI, S.F; CAMARGO, J.M. DE. Biological Observations on a Neotropical Parasocial Bee, *Eulaema nigrita*, with a Review on the Biology of Euglossinae (Hymenoptera, Apidae). **Journal Of The Faculty Of Science Hokkaido University Series VI Zoology**, v.17, p. 271-273, 1969.

MANUSCRITO A SER ENVIADO À REVISTA
CONSERVATION GENETICS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

**Diversidade e Estrutura Genética de *Euglossa cordata* (Linnaeus, 1758) em
Ecossistemas de Transição no Nordeste do Brasil**

Denilson Costa Martins¹, Wilson Frantine da Silva², Carlos Roberto Maximiano da Silva², Patrícia Maia
Correia de Albuquerque³, José Manuel Macário Rebêlo³, Silvia Helena Sofia²

1 – Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Universidade Federal do Maranhão,
Campus Bacanga, Av. dos Portugueses 1966, Bacanga, CEP 65080-805, São Luís, Maranhão, Brasil

2 – Laboratório de Genética e Ecologia Animal, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual
de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid. Km 380, s/n - Campus Universitário, CEP 86057-970, Londrina,
Paraná, Brasil.

3 – Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, Campus Bacanga, Av. dos Portugueses
1966, Bacanga, CEP 65080-805, São Luís, Maranhão, Brasil.

Título curto: *Euglossa cordata* em ecossistema de transição no nordeste do Brasil

37 **Diversidade e Estrutura Genética de *Euglossa cordata* (Linnaeus, 1758)**
38 **em Ecossistemas de Transição no Nordeste do Brasil**
39

40 **Resumo**

41 Neste estudo foram analisadas a diversidade e estrutura genética de *Euglossa cordata*
42 com base em marcadores microssatélites e mitocondriais, na tentativa de responder às
43 seguintes questões: (I) Como se encontra distribuída hoje a diversidade de populações de
44 *Euglossa cordata* que habitam as diferentes fitofisionomias do estado do Maranhão, e que
45 sofrem também um processo acentuado de fragmentação por ação antrópica? (II) Há
46 diferenças na estrutura genética revelada por marcadores nucleares e mitocondriais para
47 as populações de *E. cordata* distribuídas ao longo da paisagem maranhense? Para as
48 análises genéticas foram amostrados machos da espécie estudada em 12 localidades do
49 estado do Maranhão e em uma área no estado do Pará. O DNA foi extraído da musculatura
50 torácica de 337 amostras e seis *loci* microssatélites (Egc 18, Egc 24, Egc 26, Egc 30b,
51 Egc 37, Ann2), enquanto que um segmento de 601pb do gene mitocondrial *Cit b* foi
52 sequenciado para 107 indivíduos. Elevados valores de diferenciação genética foram
53 detectados para a amostra de São Luís, tanto para *loci* microssatélites quanto para o
54 DNAm (mt ϕ_{ST} =0,420, AL x SL; mt ϕ_{ST} = 0,392, HC x SL; mt ϕ_{ST} =0,350 AJ x SL).
55 Alcântara também mostrou estruturação significativa em relação a algumas amostras
56 (ϕ_{ST} = 0,20, AL x FN, AL x FN, AL x SL). A análise Bayesiana apontou a existência de
57 dois grandes grupos para as populações de *E. cordata*, organizados a partir de Alcântara
58 e São Luís. Embora não se tenha constado correlação entre diferenciação genética e
59 distância geográfica, padrões incomuns de estruturação genética e sem associação as
60 fitorregiões foram revelados, com áreas a 23km de distância mostrando alta diferenciação
61 (Alcântara e São Luís) e áreas mais distantes, 690km (Belém e Caxias) apresentando
62 baixa diferenciação. Dessa maneira, com base nos dados levantados pode-se inferir que
63 as subpopulações *E. cordata* apresentam diferenças genéticas importantes que merecem
64 atenção ao se propor medidas para manejo e conservação de tais populações.
65

66 **Palavras-chaves:** *Euglossa cordata*/ Euglossini/ Microssatélites/ DNA mitocondrial/
67 Fitorregiões do Maranhão/variabilidade genética

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78 **Diversity and Genetic Structure of *Euglossa cordata* (Linnaeus, 1758) in a**
79 **Transition Ecosystems in the Northeast of Brazil**
80

81 **Abstract**
82

83 In this study it was analyzed the genetic diversity and structure of *Euglossa cordata* with
84 base in markers microsatélites and mitocondriais, in the attempt to answer to the
85 following subjects: (I) How are distributed the diversity of populations of *Euglossa*
86 *cordata* that inhabit the different fitofisionomias of the State of Maranhão today, and what
87 do also suffer an accentuated process of fragmentation for action antrópica? (II) Are there
88 differences in the genetic structure revealed by markers nuclear and mitocondriais of the
89 populations of *E. cordata* distribute through the landscape from Maranhão? For the
90 genetic analyzes were sampled males of the species studied in 12 locations in the State of
91 Maranhão and in an area in the State of Pará. DNA was extracted of the thoracic
92 musculature, six loci microsatélites (Egc 18, Egc 24, Egc 26, Egc 30b, Egc 37, Ann2)
93 for 337 males of *E. cordata*, while a passage of 601pb of the gene mitochondrial *Cit b* was
94 sequence for 107 individuals. High values of genetic differentiation were detected for the
95 São Luís sample, for both microsatellite loci and mtDNA ($mt\phi_{ST}=0,420$, AL x SL; $mt\phi_{ST}=\$
96 $0,392$, HC x SL; $mt\phi_{ST}=0,350$ AJ x SL). Alcântara also showed significant structure in
97 relation to some samples ($\phi_{ST}= 0,20$, AL x FN, AL x FN, AL x SL). The analysis
98 Bayesiana pointed the existence of two great groups for the populations of *E. cordata*,
99 organized starting from Alcântara and São Luís. Although it is not had consisted
100 correlation between genetic differentiation and geographical distance, uncommon
101 patterns of genetic structuring and without association the fitofisionomias were revealed,
102 with areas to 23km of distance showing high differentiation (Alcântara and São Luís) and
103 more distant areas, 690km (Belém and Caxias) presenting low differentiation. Thus,
104 based on the data collected, it can be inferred that the *E. cordata* subpopulations present
105 important genetic differences that deserve attention when proposing measures for the
106 management and conservation of these populations.
107

108 **Keywords:** *Euglossa cordata*/ Euglossini/ Microsatellite / mitochondrial DNA/
109 Maranhão's phyto-regions/ genetic variability/
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120

121 **Introdução**

122

123 Frente às constantes ameaças das atividades humanas sobre os habitats terrestres e o
124 recente relato do declínio de populações de abelhas, um número cada vez mais expressivo
125 de estudos tem buscado entender a biologia destes organismos, principalmente devido sua
126 importante função ecológica na polinização de dezenas de famílias de plantas nativas e
127 cultivadas (Zayed et al. 2009; Lozier e Zayed 2016). As abelhas da tribo Euglossini
128 realizam importantes serviços ecológicos na manutenção de florestas úmidas da região
129 Neotropical e, devido à alta afinidade de algumas espécies por ambientes florestais, o
130 grupo é considerado bioindicador de qualidade ambiental (Parra-H e Nates-Parra 2007).

131 O grupo Euglossini é considerado peculiar dentro das abelhas do neotropicais,
132 possuindo um longo comprimento de língua, porte médio a grande, e coloração metálica
133 brilhante, não passando despercebidas quando encontradas em campo (Dressler 1982;
134 Ackerman 1983; Hinojosa-Diaz e Engel 2009). As cerca de 250 espécies desta tribo estão
135 divididas em cinco gêneros, *Euglossa* Latreille 1802, *Eufriesea* Cockerell 1908, *Eulaema*
136 Lepeletier 1841, *Exaerete* Hoffmannsegg 1817e *Aglae* Lepeletier & Serville 1825,
137 respectivamente em ordem de riqueza (Cameron 2004; Nemésio e Silveira 2007;
138 Nemésio e Rasmussen 2011; Moure et al. 2012).

139 Embora as abelhas da tribo Euglossini sejam reconhecidas como insetos dotados
140 de uma grande capacidade de voo e dispersão, podendo voar distâncias de dezenas de
141 quilômetros (Janzen 1971; Pokorny et al. 2015), e serem capazes inclusive de transpor
142 corpos d'água (Dressler 1982; Wikelski et al. 2010), a perda de diversidade genética em
143 populações de algumas espécies vivendo em ambientes sujeitos a um maior isolamento
144 geográfico já foi relatada na literatura. Este é o caso de populações de *Euglossa cordata*
145 (Linnaeus 1758) de ambientes insulares (Boff et al. 2014). No caso particular desta
146 espécie, a perda de diversidade genética, evidenciada por tais autores, chega a ser algo
147 surpreendente. Esta surpresa, em parte, se deve ao fato de *E. cordata* ser uma espécie
148 frequente em ambientes perturbados, tais como fragmentos florestais de pequeno
149 tamanho (Aguiar e Gaglianone 2011; Peruquetti et al. 1999) e áreas urbanas (López-Uribe
150 et al. 2008), exibindo a habilidade de transpor áreas desmatadas (Raw 1989; Tonhasca et
151 al. 2003) e adentrar a matriz ao redor de fragmentos florestais na exploração de recursos
152 (Milet-Pinheiro e Schlindwein 2005). Além disto, de modo distinto aos ambientes
153 insulares, populações de *E. cordata* de 11 áreas urbanas mostraram altos níveis de
154 diversidade genética, baixa estruturação e baixa frequência de machos diploides

155 (Cerântola et al. 2011). Sabe-se que em abelhas e outros himenópteros haplodiplóides,
156 nos quais a determinação do sexo envolve um único loco com diferentes alelos (sl-CSD,
157 *single locus complementary sex determination*), o número de machos diploides ($2n$) pode
158 aumentar nas populações, como resultado da perda da diversidade genética neste loco
159 (Zayed 2009),

160 Nos últimos anos, a comunidade científica tem dado maior ênfase ao estudo da
161 biodiversidade molecular para avaliar as condições das populações de algumas espécies
162 de abelhas (Thummajitsakul et al. 2008; Duart et al. 2014; Lozier e Zayed 2016). Dentre
163 as principais técnicas moleculares utilizadas atualmente estão os marcadores
164 microssatélites, conhecidos como sequências simples repetidas (SSR, do inglês *Single*
165 *Sequence Repeats*), que tem por característica a presença de repetições de sequências
166 simples nos números de nucleotídeos da cadeia de DNA, que podem variar de 1 a 6 pares
167 de bases. Estes marcadores moleculares constituem locos genéticos muito variáveis,
168 frequentemente multialélicos e com fenótipo molecular codominante (Oliveira 2006). Os
169 microssatélites estão entre os marcadores que apresentam maior facilidade na detecção
170 de polimorfismo na molécula de DNA (Ferreira e Grattapaglia 1998), o que torna a análise
171 de tais *loci* bastante útil e informativa em estudos de genética de populações naturais
172 (Avisé 2004).

173 Outra técnica amplamente usada é a de marcadores mitocondriais, a qual também
174 tem grande relevância em abordagens filogeográficas (Avisé 2004). Nos Euglossini,
175 machos e fêmeas apresentam distinção no comportamento de dispersão. Enquanto os
176 machos desta tribo tendem a transpor grandes áreas de floresta em busca de compostos
177 aromáticos, as fêmeas têm sua dispersão limitada ao raio do local de fundação do ninho
178 (Janzen 1975). Em estudos da comunidade de Euglossini, a principal metodologia
179 aplicada é a atração de machos com uso de iscas odores (Justino e Augusto 2010; Nemésio
180 2012), a qual tem maior eficácia quando comparada ao uso de ninhos armadilhas no
181 estudo da biologia das espécies de fêmeas desta tribo. Dessa maneira, em análises de
182 marcadores mitocondriais, realizadas a partir de machos amostrados em iscas odoríferas,
183 é possível se obter alguma informação, mesmo que indireta, sobre o efeito de tal
184 comportamento das fêmeas na diversidade e estrutura genética em populações destas
185 abelhas (Penha et al. 2015).

186 Nos últimos anos, tais técnicas têm sido aplicadas em conjunto em abordagens
187 voltadas à conservação de espécies de Euglossini em remanescentes de Mata Atlântica
188 das regiões sul e sudeste do país (Cerântola et al. 2011; Freiria et al. 2012; Rocha-Filho

189 et al. 2013; Boff et al. 2014; Penha et al.2015; Rosa et al. 2015). Contudo, ainda é pouco
190 conhecida a estrutura genética das populações de Euglossini nas áreas mais próximas a
191 Floresta Amazônica, região que é o centro de origem do grupo (Roubik e Hanson 2004)
192 e considerada uma das regiões de maior riqueza de espécies desta tribo de abelhas
193 (Dressler 1982).

194 Dentro do estado do Maranhão, região nordeste do Brasil, a Floresta Amazonica
195 possui 24,46% do território, o que corresponde a pouco mais de 81 mil km² (Martins e
196 Oliveira 2011). Além deste ecossistema, o Maranhão abriga uma heterogeneidade de
197 ambientes que incluem áreas de contatos, a oeste, da Amazônia com o Cerrado, campos
198 alagados na região da Baixada Maranhense, ao norte, o encontro do Cerrado com a
199 Restinga, e a leste, do Cerrado com a Caatinga (Cordeiro et al. 2006). No que se refere a
200 estudos genéticos envolvendo a diversidade e estrutura genética em populações de
201 Euglossini, este cenário heterogêneo torna-se particularmente interessante, uma vez que
202 permite análises de populações que, além de estarem sujeitas às condições de ameaças
203 antrópicas que resultaram na fragmentação da paisagem natural, estão ainda sujeitas ao
204 ambiente de transição que ocupa as várias regiões deste estado brasileiro. Contudo, para
205 tal finalidade, é necessário analisar populações de uma espécie que esteja presente nas
206 diferentes fitofisionomias que ocorrem no Maranhão. Assim, *Euglossa cordata* L. foi
207 escolhida como uma espécie modelo de estudo, por ser encontrada em praticamente todos
208 os ecossistemas do estado (Rebêlo e Silva 1999), apresentando também ampla
209 distribuição no território brasileiro (Moure et al. 2012).

210 Portanto, o presente estudo consiste em um primeiro esforço de tentar responder
211 às seguintes questões: I) Como se encontra hoje distribuída a diversidade de populações
212 de *E. cordata* que habitam as diferentes fitofisionomias do estado do Maranhão, e que
213 sofrem também um processo acentuado de fragmentação por ação antrópica? II) Há
214 diferenças na estrutura genética revelada por marcadores nucleares e mitocondriais para
215 as populações de *E. cordata* distribuídas ao longo da paisagem maranhense?

216

217

218

219

220

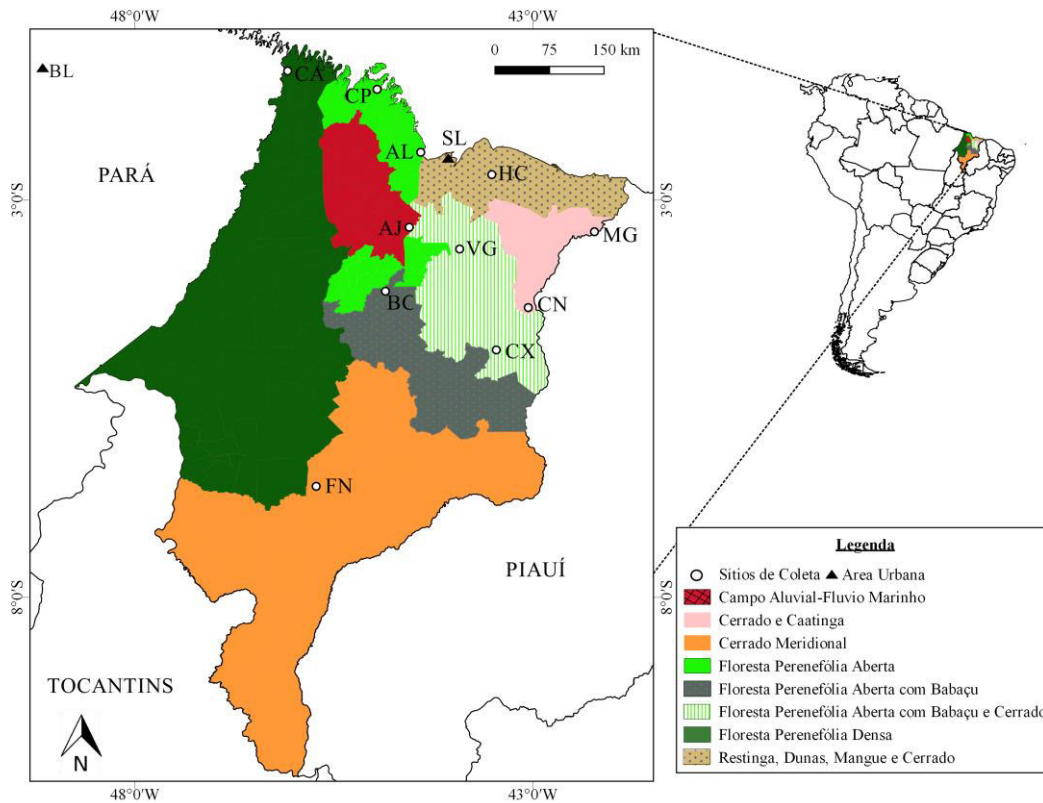
221

222

223 **Materiais e Métodos**

224 *Áreas de Estudo*

225 Os exemplares de *E. cordata* foram capturados em oito fitorregiões distintas do
226 Maranhão (Fig. 1): **(1)** Campo Aluvial Flúvio-Marinho (Baixada Maranhense) (CA),
227 cidade de Anajatuba (3°16'32.46"S, 44°37'9.75"W), região conhecida como pantanal
228 maranhense, pois na época das chuvas, ocorrem o extravasamento dos grandes rios
229 inundando os campos, que permanecem alagados em parte do ano, estando inserida em
230 uma Área de Proteção Ambiental (APA) do Estado do Maranhão; **(2)** Cerrado e Caatinga
231 (CC), cidades de Coelho Neto (4°29'03.35"S, 43°09'04.09W) e Magalhães de Almeida
232 (3°38'26.78"S, 42°21'68.54"W), zona de contato da Savana com a Caatinga nordestina;
233 **(3)** Cerrado Meridional (CM), na cidade de Formosa da Serra Negra (6°37'56,29"S, 45°53'
234 4,25"W), dentro do domínio que constitui o maior bioma do Maranhão, ocupando a
235 porção leste e sul do estado; **(4)** Florestas Perenifólias Abertas (FA), cidades de Alcântara
236 (2°40'29.61"S, 44°40'79.16"W) e Cururupu (1°56'27"S, 44°54'42"W), que correspondem
237 a áreas de transição de mata e campo aluvial flúvio-marinho; **(5)** Floresta Aberta com
238 Babaçu (FB), cidade Bacabal (4°09'00.74"S, 44°80'84.91"W), localizada na região
239 centro-oriental dominada por babaçuais (*Orbignya martiana* B.R.), circundada por outras
240 palmeiras, como o tucum (*Bactris setosa* Mart.); **(6)** Floresta Aberta com Babaçu e
241 Cerrado (FBC), cidades de Caxias (4°93'25.36"S, 43°34'14.14W) e Vargem Grande
242 (3°54'56.48"S, 43°87'09.94W), parte da zona de contato entre áreas de três ecossistemas:
243 Cerrado, Mata de Cocais e Floresta Secundária; **(7)** Floresta Perenifólia Densa (FD),
244 cidade de Carutapera (1°14'52.69"S, 46°0'36.07"W), com a formação mais exuberante do
245 estado, onde ocorrem espécies arbóreas que podem atingir até 50m, destacando a
246 seringueira (*Hevea brasiliensis*) e a andiroba (*Carapa guianensis*; **(8)** Restinga (R), na
247 cidade de Humberto de Campos (2°35'19.98"S, 43°26'6.04"W), porção norte do estado
248 (Cordeiro 2006; IBGE, 1997). **(9)** Foram incluídos ainda dois pontos em áreas urbanas
249 (UR), no município de São Luís (2°54'14.36"S, 44°25'28.88"W) capital do Maranhão e
250 também Bélem (1°44'96.04"S, 48°43'74.05"W), capital do estado do Pará,
251 especificamente na sede da Universidade Federal do Pará (UFPA), este sitio em área
252 urbana foi utilizado para verificar a distância genética entre os grupos do Maranhão e do
253 Pará.



254
 255 **Fig. 1** Mapa do Maranhão (MA) evidenciando as oito zonas fitogeográficas do estado,
 256 assim como os respectivos municípios de coleta dos machos de *Euglossa cordata*: **AL** –
 257 Alcântara; **AJ** – Anajatuba; **BC** – Bacabal; **CA** – Carutapera; **CX** – Caxias; **CN** - Coelho
 258 Neto; **CP** – Cururupu; **FN** – Formosa de Serra Negra; **HC** – Humberto de Campos; **MG**
 259 – Magalhães de Almeida e **VG** – Vargem Grande (Adaptado de Rebêlo e Silva 1999).
 260

261 Em cada fitorregião foram consideradas uma a duas áreas geográficas, em
 262 distâncias que variaram de 23,5 km a 728 km entre si, totalizando 13 áreas onde foram
 263 estabelecidos os pontos de coletas. Em cada área foram obtidos pelo menos 20 exemplares
 264 de *E. cordata*, necessários para o estudo comparativo.

265

266 *Captura das Abelhas*

267 A captura das abelhas ocorreu durante três dias consecutivos em cada localidade,
 268 segundo metodologia proposta por Nemésio (2010), a qual defende que a realização de
 269 intensas amostragens com duração total de até 30h de atividade por sítio de estudo, podem
 270 garantir o reconhecimento de parte significativa da comunidade de Euglossini em uma
 271 área. Desta maneira, foram dispendidos aproximadamente 30h de amostragem para cada
 272 uma das 13 localidades amostradas no estudo.

273 Para a captura dos exemplares foram usadas as substâncias aromáticas: acetato de
 274 benzila, benzoato de benzila, eucaliptol, eugenol, salicilato de metila e vanilina, já
 275 utilizadas em outros estudos (Rebêlo e Cabral 1997; Rebêlo e Silva 1999; Silva e Rebêlo

276 2002; Carvalho et al. 2006; Mendes et al. 2008; Silva et al. 2009), com o acréscimo ainda
277 de cinamato de metila e beta-iononna, que nunca tinham sido utilizadas no estado.

278 As amostragens ocorreram no período de 7h às 17h, sendo as substâncias
279 aromáticas colocadas em chumaços de papel absorventes amarrados nas ramagens das
280 árvores em local sombreado, dispostas a aproximadamente 1,5 m do solo e distantes cerca
281 de 3m uma das outras (Sofia e Suzuki 2004). As abelhas eram capturadas com rede
282 entomológica, armazenadas em tubos plásticos individuais e acondicionadas em freezer -
283 20°C. Foram também disponibilizados três conjuntos de armadilhas de garrafas PET
284 contendo chumaço de algodão embebido com essência com cada uma das substâncias
285 aromáticas. As armadilhas continham três orifícios equidistantes onde eram colocados
286 três gargalos invertidos para facilitar a entrada dos machos de Euglossini, de acordo com
287 as modificações propostas por Campos et al. (1989).

288

289 *Extração de DNA*

290 A extração do DNA seguiu o protocolo de Freiria et al. (2012), com modificações.
291 Para a extração de DNA, foi retirado a musculatura torácica dos indivíduos capturados
292 com auxílio de uma pinça. Foi utilizado 400 µl de tampão de extração (Tris-HCl 500 mM,
293 EDTA 20 mM, NaCl 10 mM pH 8,0 e 1% de SDS) por amostra, sendo o material
294 dilacerado com o uso de uma tesoura pequena; ao final deste processo, foi adicionado 5
295 µl de proteinase K (100µg /ml) a cada amostra e em seguida o material foi incubado a
296 64°C durante cerca de 4h. Em seguida, as amostras foram submetidas a três etapas de
297 lavagens: fenol (1:1;v:v), fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1;v:v:v) e
298 clorofórmio/álcool isoamílico (24:1;v:v) e centrifugadas a 12.074,4g a 10 min a cada
299 etapa. Após a centrifugação, o sobrenadante foi precipitado duas vezes, usando álcool
300 absoluto, a uma temperatura de -20°C, e NaCl 3M, seguido de centrifugação a 12.074,4g
301 por 15min. Posteriormente, o DNA (*pellet*) foi ressuscitado em 40 µl de tampão TE
302 (Tris 10mM, EDTA 1mM pH 8.0), de acordo com Sofia et al. (2005). A concentração das
303 amostras de DNA foi obtida emespectrofotômetro NanoDrop 1000 (Life Technologies,
304 Wilmington, DE) e o material foi diluído para uma concentração padrão de 20ng/µL,
305 utilizada para as reações de microssatélites.

306

307 *Marcadores Moleculares*

308 Para a análise de microssatélites foram utilizados seis pares de *primers*, dos quais,
309 cinco foram desenvolvidos para *E. cordata* (Egc 18, Egc 24, Egc 26, Egc 30b, Egc 37),

310 de acordo com designação de Souza et al. (2007), e um sexto par de *primers* (Ann2)
311 descrito para *Euglossa annectans* Dressler, por Paxton et al. (2009). As reações de PCR
312 (Reação em Cadeia da Polimerase) foram conduzidas em um volume final de 10 μ L,
313 contendo 1x GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 2,3 μ L
314 água ultrapura, 5 μ L do Mastar Mix, 0,2 μ L glicerol, 0,125 μ L de *primer Reverse*, 0,125
315 μ M de *primer Forward*, 0,25 μ L de *primers* M13, os quais foram marcados com as
316 fluorescência FAM, HEX, NED e PET, e 2 μ L da amostras de DNA.

317 As amplificações foram conduzidas em termociclador PCT-100 Peltier Thermal
318 Cycler MJ, utilizando as seguinte programação para as reações de PCR: 94 °C/ 5 min, 94
319 °C/30 s, 54°C (Egc 30b/FAM e Egc 37/NED), 57°C (Egc 18/HEX e Egc 24/NED) e 58°C
320 (Egc 26/PET) /1min e 72 °C/ 1 min (10 ciclos) e ainda 89 °C/30 s, 54°C e 58°C/ 1 min e
321 72 °C/ 1 min (25 ciclos), seguidos de uma extensão final de 72 °C/ 30 min. As
322 genotipagens dos fragmentos foram realizadas em sequenciador automático, modelo
323 Applied Biosystems® 3500 xL Genetic Analyzer, na Universidade Estadual de Londrina.

324 As análises mitocondriais seguiram o protocolo de Penha et al. (2015). Os *primers*
325 EIOP F1 e AMB16 (Arias et al. 2008) foram utilizados para amplificar um segmento de
326 cerca de 800 pb do gene mitocondrial *Cit b*. As reações de PCR foram conduzidas em um
327 volume final de 20 μ L, incluindo 10 ng de DNA, tampão 1x, 3 mM de MgCl₂, 0,5 μ M de
328 cada *primer*, 200 μ M de dNTP e 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As
329 amplificações foram feitas em termocicladores (modelo MultiGene OptiMax Thermal
330 Cycler), de acordo com o seguinte protocolo: uma desnaturação inicial a 94°C por 4
331 minutos, seguida por 40 ciclos, incluindo uma etapa de desnaturação a 94°C por 30
332 segundos, uma etapa de hibridação dos *primers* a 48°C por 30 segundos e uma etapa de
333 extensão a 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Para
334 checagem da amplificação dos produtos da PCR, estes foram submetidos à eletroforese
335 em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizados em transiluminador
336 de luz ultravioleta.

337 Após a verificação da eficiência das PCRs, as amostras foram purificadas com a
338 enzima Illustra ExoStar PCR (GE® Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante, e
339 submetidas à reação de sequenciamento utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1
340 (Applied Biosystems®). Posteriormente, os produtos da reação de sequenciamento foram
341 purificados e precipitados com álcool e EDTA, sendo ressuspensos em 10 μ L de
342 Formamida Hi-Di (Applied Biosystems®) antes de serem conduzidos ao sequenciador
343 automático, modelo Applied Biosystems® 3500 xL Genetic Analyzer.

344 *Análise dos dados*

345 *Marcadores Microsatélite*

346 Por uma questão de padronização e levando-se em consideração que outros
347 estudos genéticos com *E. cordata* revelaram ausência ou baixa diferenciação genética
348 entre diferentes amostras desta espécie (Cerântola et al. 2011; Boff et al. 2014|), no
349 presente estudo optou-se por utilizar, ao longo do texto, o termo subpopulações (ou
350 amostras) ao invés de “populações”, tanto para a análise de microsatélites quanto para o
351 estudo de haplótipos mitocondriais.

352 Os dados gerados no sequenciador automático foram visualizados e analisados no
353 *software* GeneMarker v.2.2.0 (Softgenetics, State College, PA). A partir dos dados de
354 marcadores microsatélites, o *software* computacional GenAIEX 6.5 (Peakall e Smouse
355 2012) foi utilizado para calcular a frequência dos alelos nas diferentes subpopulações e
356 obter várias estimativas de diversidade, incluindo a quantidade de alelos (A), a média de
357 alelos por população (N_a), a heterozigosidade média esperada (H_e). No caso da riqueza
358 alélica (R_A) e de alelos privados (A_p), estes foram obtidos a partir de um método de
359 rarefação, aplicado para a correção de diferenças nos tamanhos amostrais por meio do
360 *software* HP-RARE (Kalinowski 2005).

361 Para a comparação entre a diversidade genética entre as 13 amostras de *E. cordata*,
362 as estimativas de heterozigozidade média esperada (H_e), gerada pelo GenAIEX 6.5
363 (Peakall e Smouse 2012), foram submetidas a uma ANOVA-*one-way* com uso do
364 *software* R (R Development Core Team, 2015), segundo metodologia proposta por Penha
365 et al. (2015).

366 O *software* Arlequin foi utilizado na Análise de Variância Molecular (AMOVA),
367 que estima a divisão ou partição da variação genética entre as subpopulações. Este
368 programa também foi usado na obtenção dos valores global e para a par de ϕ_{ST} , que
369 fornece uma estimativa da diferenciação genética entre as amostras avaliadas.

370 Também, para a determinação da estrutura genética dos grupos amostrados, a
371 análise de agrupamentos Bayesianos foi conduzida para dados de microsatélites
372 empregando o *software* Structure Harvester v.0.6.7 (Earl e Von Holdt 2012). Os valores
373 de *log-likelihood* para os dados condicionais em K , $\ln Pr(X/K)$ (Pritchard et al. 2000) e
374 os valores da estatística ΔK ad hoc (Evanno et al. 2005) foram usados para inferir o
375 número mais provável de agrupamentos (K) empregando o Structure. O programa
376 determina se os grupos estão ou não estruturados em K populações. Seguindo orientações
377 de Evanno et al. (2005), cada valor de K foi replicado 20 vezes, com 10.000 interações

378 no *burn-in* e 100.000 para a Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) (Evanno et al.
379 2005). Estimativas da distribuição posterior das amostragens foram conduzidas utilizando
380 o modelo *admixture* e frequências alélicas correlacionadas entre ‘populações’. O modelo
381 *admixture* assume que indivíduos podem ter ancestralidade mista com contribuições
382 genotípicas de diferentes populações (Pritchard et al. 2000).

383 Para verificar a existência de possíveis correlações entre log da distância
384 geográficas em quilômetros e os valores de distância genética ϕ_{ST} , utilizou-se o teste de
385 Mantel com 1000 permutações por meio do *software* R (R Development Core Team,
386 2015).

387

388 *Marcadores Mitocondriais*

389 As sequências obtidas foram alinhadas e editadas com auxílio do *software* MEGA
390 6.0 (Tamura et al. 2013). Posteriormente, o programa DnaSP v.5 (Librado et al. 2009) foi
391 utilizado para fornecer o número e frequência relativa de haplótipos, diversidade
392 haplotípica (*hd*) e nucleotídica (π). O programa SPADS (Dellicour e Mardulyn 2014) foi
393 utilizado para testar o melhor esquema de partição dos pontos amostrais em grupos
394 através da análise espacial de variância molecular (SAMOVA, Dupalop 2002), a qual
395 considera a distribuição geográfica dos pontos juntamente aos dados moleculares. Em
396 seguida o melhor esquema de partição foi utilizado para a execução da AMOVA realizado
397 pelo programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier et al. 2005), do mesmo modo como foi
398 realizado para os dados de microssatélite. Ainda com o programa Arlequin, foram geradas
399 estimativas de estruturação genéticas entre pares de populações, as quais podem ser
400 usadas como estimativa da distância genética entre as mesmas (Excoffier et al. 2005).
401 Para medir o nível de significância desta estimativa, foi assumido um valor de $\alpha = 5\%$
402 ($p < 0,05$).

403 Nas análises com ambos marcadores, nucleares e mitocondriais, o nível de
404 estruturação populacional atribuído ao estimador $mt\phi_{ST}$ (ou ϕ_{ST} para microssatélites)
405 baseou-se na escala proposta por Wright (1951), com as seguintes classes: $<0,05$; 0,051-
406 0,15; 0,151-0,25; e $>0,25$; indicando, respectivamente, estruturação baixa, moderada,
407 alta, e muito alta. Além disto, a estrutura genética para microssatélites também foi
408 estimada a partir do índice D_{jost} (Jost 2008), calculado no *software* SMOGD 1.2.5
409 (Crawford 2010).

410 Por fim, para avaliar a relação evolutiva entre os haplótipos mitocondriais, o
411 programa PopArt v 1.2 (Cori et al. 2014) foi utilizado para a construção de uma rede de
412 relacionamento de haplótipos por meio do algoritmo Median-Joining.

413

414 **Resultados**

415 *Microssatélites*

416 A análise dos seis *loci* microssatélites utilizados revelou uma alta diversidade
417 alélica, totalizando 100 alelos distintos, para o conjunto amostrado de subpopulações de
418 *E. cordata*. O número de alelo por loco variou de 12 (Egc 24) a 35 (Egc 30b) (Apêndice
419 – Tabela 1S). Considerando-se as estimativas de heterozigosidade média esperada os
420 valores variaram de 0,620 (Alcântara) a 0,816 (Vargem Grande) (Tabela 1).

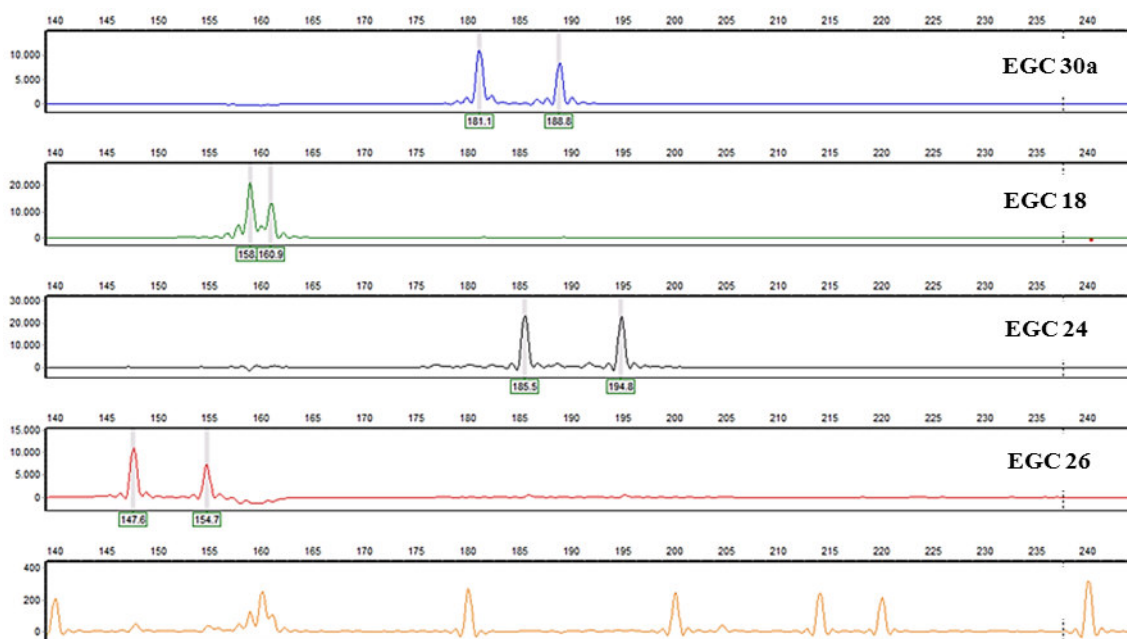
421 De forma geral, não foram constatadas diferenças significativas quanto a
422 diversidade genética entre as fitorregiões analisadas (ANOVA, $F=0,653$, $df=12$, $p>0,05$),
423 com os valores de heterozigosidade média mostrando-se muito próximos e variando entre
424 0,620 a 0,816, para as fitorregiões Floresta Perenifólia Aberta e zona de transição Floresta
425 Aberta com Babaçu e Cerrado, respectivamente.

426 A riqueza alélica e número médio de alelos para todos os locos analisados foram
427 maiores para as amostras de *E. cordata* de São Luís (Ra= 9,35; Na=9), Bacabal (Ra=
428 8,53; Na= 11), Anajatuba (Ra=8,53; Na= 10,66) e Vargem Grande (Ra= 8,28;
429 Na=10,83). Já as maiores estimativas de alelos privados foram encontradas para as
430 localidade de Vargem Grande ($Ap= 1,38$) e Carutapera ($Ap= 1,22$) (Tabela 1).

431 **Tabela 1** Diversidade genética estimada para as 13 amostras de *Euglossa cordata*, amostradas em 12 localidades do estado do Maranhão (MA) e
 432 uma no estado do Pará (PA). N = número de machos analisados; *He* = heterozigiosidade média esperada; *A*= quantidade de alelos; *Na* = média de
 433 alelos por população; *Ra* = riqueza alélica; *Ap* = riqueza de alelos privados; s.e. = erro padrão.
 434

Fitorregião	Populações	N	<i>He</i> (s.e.)	<i>A</i>	<i>Na</i> (s.e.)	<i>Ra</i> (s.e.)	<i>Ap</i> (s.e.)
Campo Aluvial Flúvio-Marinho	Anajatuba (AJ)	26	0,792 (0,04)	62	10,66 (1,82)	8,53 (1,62)	1,05 (0,8)
Floresta Perenifólia Aberta	Alcântara (AL)	23	0,620 (0,1)	35	6,16 (1,22)	5,64 (1,39)	0,07 (0,29)
	Cururupu (CP)	31	0,810 (0,05)	59	10,16 (1,92)	8,08 (1,58)	0,42 (0,51)
Floresta Aberta com Babaçu	Bacabal (BC)	30	0,754 (0,1)	61	11 (2,06)	8,53 (1,68)	0,68 (0,55)
Floresta Perenifólia Densa	Carutapera (CA)	25	0,804 (0,05)	59	10,33 (1,85)	8,28 (1,56)	1,22 (0,94)
Cerrado e Caatinga	Coelho Neto (CN)	20	0,790 (0,05)	55	9,16 (1,44)	7,99 (1,55)	0,43 (0,62)
	Magalhães de Almeida (MG)	23	0,792 (0,05)	49	8,66 (1,56)	7,63 (1,59)	0,22 (0,48)
Floresta Aberta com Babaçu e Cerrado	Caxias (CX)	26	0,770 (0,05)	46	8,5 (1,83)	6,94 (1,62)	0,10 (0,34)
	Vargem Grande (VG)	31	0,816 (0,02)	62	10,83 (1,04)	8,28 (1,05)	1,38 (1,07)
Cerrado Meridional	Formosa da Serra Negra (FN)	30	0,756 (0,08)	60	10,16 (1,77)	7,68 (1,47)	0,86 (0,86)
Restinga	Humberto de Campos (HC)	24	0,772 (0,05)	47	8,5 (1,94)	7,17 (1,67)	0,36 (0,67)
Área Urbana	São Luís (SL)	24	0,794 (0,07)	61	9,66 (1,66)	9,35 (1,58)	0,79 (0,55)
	Belém (BL)	24	0,750 (0,05)	48	8,33 (1,83)	6,96 (1,64)	0,42 (0,64)

435 Durante o estudo foram encontrados 14 machos diploides em cinco das
 436 localidades estudadas CP (n=2), HC (n=2), MG (n=3), VG (n=1), SL (n=6),
 437 correspondendo a 4,15% dos indivíduos capturados. O maior número de indivíduos
 438 diploides foi encontrado na área urbana de São Luís, os quais corresponderam a 25% do
 439 total de machos capturados nesta ilha. A Fig. 2 ilustra os padrões encontrados para quatro
 440 locos microssatélites, que revelam a diploidia para um macho de *E. cordata*.
 441



442
 443 **Fig. 2** Perfil de eletroferograma ilustrando a diploidia de um macho de *Euglossa cordata*,
 444 para quatro locos de microssatélite (EGC 30A, EGC 18, EGC 24 e EGC 26).

445 Para as amostras de *E. cordata* capturadas nas diferentes localidades, a análise de
 446 variância molecular (AMOVA) revelou que a maior parte da variação genética se
 447 encontra dentro das subpopulações (92,75%) estudadas, enquanto a variação entre
 448 subpopulações representou uma menor proporção (7,25%) (Tabela 2).

449
 450 **Tabela 2** Análise de Variância Molecular (AMOVA) das amostras (ou subpopulações)
 451 de *Euglossa cordata* das 13 localidades de estudo.

Fonte de variação	g.l.	Soma dos quadrados	Componente de variação	Porcentagem de variação	ϕ_{ST}
Entre as subpopulações	12	118,296	0,15267	7,25	0,0725
Dentro das subpopulações	661	1291,676	1,95412	92,75	
Total	673	1409,972	2,10679		

452 *(p<0,001)

453 O valor global detectado de ϕ_{ST} foi de 0,0725, indicando uma moderada
 454 diferenciação genética entre o conjunto de subpopulações estudadas. No caso das
 455 comparações entre os pares de subpopulações, as análises revelaram que das 78
 456 combinações de comparações efetuadas, em 58 pares de amostras foram detectados
 457 valores de ϕ_{ST} significativamente diferentes de zero, indicando, portanto, algum nível de
 458 estruturação genética entre as subpopulações estudadas. Os valores de ϕ_{ST} variaram de
 459 0,03 (pares: CP x PA; CP x SL; FN x SL) a 0,20 (pares: BC x AL; FN x AL; SL x AL)
 460 (Tabela 3).

461

462 **Tabela 3** Estimativas de diferenciação genética D_{jost} (diagonal superior) e ϕ_{ST} (diagonal
 463 inferior) para os dados de microssatélites obtidos entre as subpopulações de *Euglossa*
 464 *cordata* de oito ecossistemas distintos do Maranhão e uma no estado do Pará Localidades
 465 com colorações similares estão presentes na mesma fitorregião. De cor cinza, os valores
 466 significativos de diferenciação mais elevados para os dois estimadores, enquanto os
 467 valores em negrito são valores não significativos.

FITORREGIÕES													
Local	CA	CC		CM	FA		FB	FBC		FD	R	UR	
	AJ	CN	MG	FN	AL	CP	BC	CX	VG	CA	HC	BL	SL
AJ	--	0,20	0,29*	0,38*	0,11*	0,15*	0,453*	0,12*	0,25*	0,21*	0,28*	0,21*	0,34*
CN	0,07	--	0,10	0,09*	0,31*	0,03	0,13*	0,07	0,00	0,04*	0,01	0,06	0,11*
MG	0,09*	0,03	--	0,17*	0,43*	0,02	0,41*	0,04	0,22*	0,33*	0,13*	0,20*	0,01
FN	0,12*	0,05*	0,06*	--	0,46*	0,09*	0,55*	0,09*	0,19*	0,40*	0,07*	0,05	0,09*
AL	0,06*	0,14*	0,17*	0,20*	--	0,24*	0,47*	0,29*	0,34*	0,27*	0,43*	0,26*	0,57*
CP	0,06*	0,02	0,02	0,04*	0,10*	--	0,38*	0,00	0,13*	0,22*	0,03	0,05	0,08*
BC	0,13*	0,06*	0,12*	0,17*	0,20*	0,11*	--	0,41*	0,11*	0,08*	0,26*	0,43*	0,41*
CX	0,05*	0,04	0,03	0,04*	0,13*	0,01	0,13*	--	0,15*	0,25*	0,04	0,07*	0,10*
VG	0,07*	0,01	0,06*	0,07*	0,13*	0,04*	0,05*	0,05*	--	0,09*	0,05	0,12*	0,18*
CA	0,07*	0,03	0,08*	0,12*	0,13*	0,06*	0,04*	0,08*	0,04	--	0,24*	0,20*	0,33*
HC	0,09*	0,02	0,05*	0,04*	0,18*	0,03	0,09*	0,03	0,02	0,07*	--	0,05	0,01
BL	0,08*	0,03	0,07*	0,04	0,13*	0,03*	0,14*	0,04*	0,05*	0,07*	0,04	--	0,13*
SL	0,09*	0,03	0,02	0,03*	0,20*	0,03*	0,11*	0,04	0,43*	0,08*	0,02	0,05*	--

468 Nível de significância: *p < 0,05

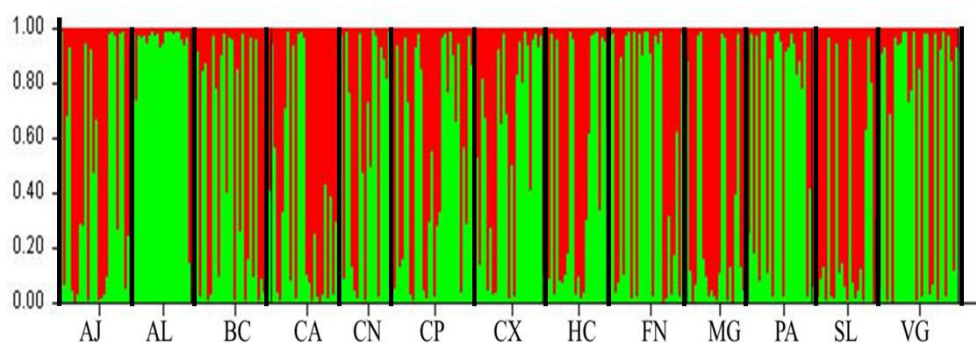
469

470 Quanto aos valores de diferenciação genética obtidos para o estimador D_{jost} , o
 471 valor global foi de 0,207 ($p < 0,001$). Nas 78 comparações entre os pares de amostras,
 472 apenas 17 não mostraram diferenças significativas. Como esperado, pelas características
 473 inerentes a este estimador quando comparado ao ϕ_{ST} , na maior parte dos casos os valores
 474 de D_{jost} foram superiores aos de ϕ_{ST} . Os valores obtidos variaram de 0,07 (pares: FN x
 475 HC; CX x PA) a 0,57 (BC x SL). Valores expressivamente elevados de D_{jost} foram

476 também encontrados entre os seguintes pares de amostras: BC x FN (0,55), AL x FN
477 (0,46), e $D_{jost} = 0,43$ para os pares AL x HC, AL x MG e BC x PA (Tabela 3).

478 No caso destes dois estimadores de diferenciação genética, não foi constatada
479 correlação significativa entre o log da distância geográfica com qualquer um destes (ϕ_{ST} ,
480 $r = 0,212$, $p > 0,05$; D_{jost} , $r = 0,2785$, $p > 0,05$), o que mostra que outros fatores além da
481 distância geográfica podem ter influenciado na diferenciação genética entre as
482 subpopulações. Uma significativa e forte correlação positiva foi encontrada entre estes
483 dois estimadores de diferenciação genética ($r_s = 0,947$; $p < 0,005$), demonstrando que
484 ambos são eficientes na detecção de diferenciação genética entre populações.

485 As análises de agrupamentos Bayesianos, aplicadas para os dados de
486 microssatélites, indicaram a partir de $\ln Pr(X/K)$ e ΔK que o valor mais provável
487 de K (número de agrupamentos) foi $K = 2$ (Fig. 3).

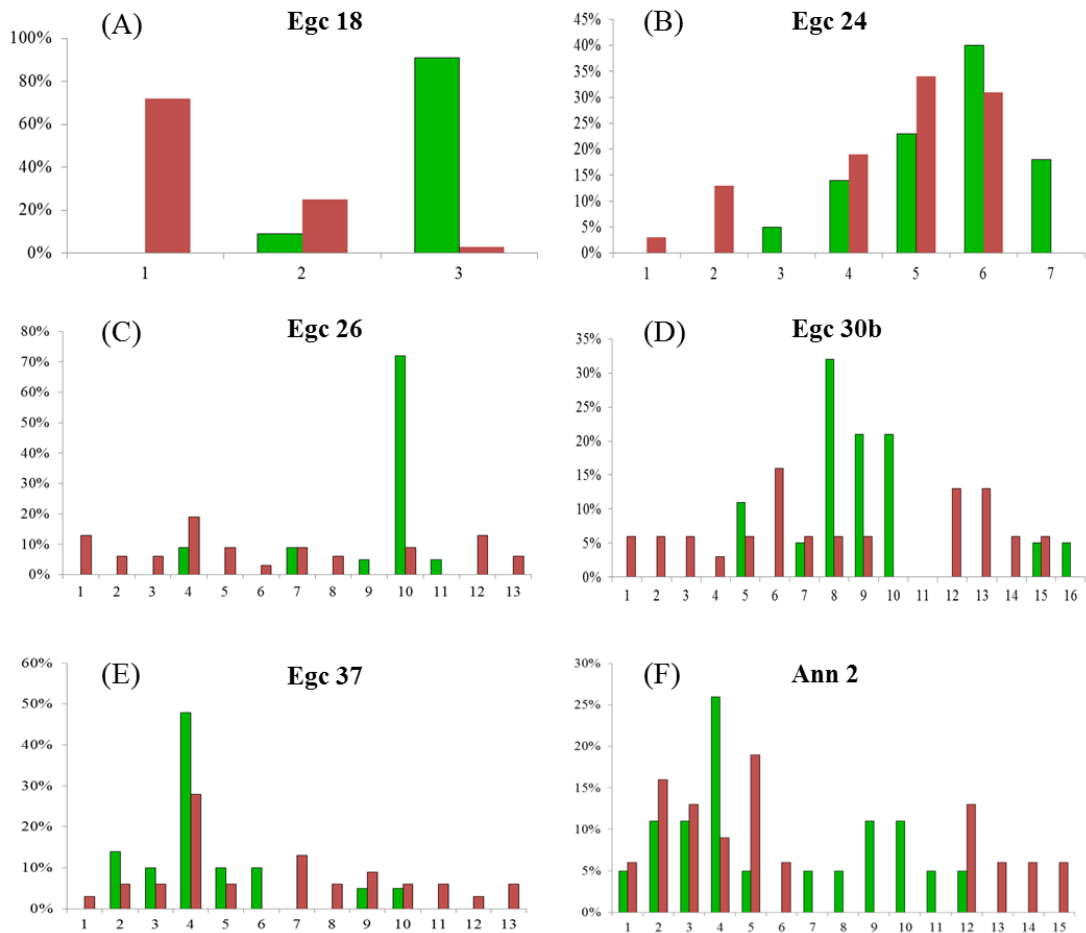


488 **Fig. 3** Agrupamentos Bayesianos formados a partir de $K=2$ para amostras de *Euglossa*
489 *cordata* de diferentes localidades maranhenses e uma do estado do Pará.
490

491

492 A representação gráfica de $K=2$ (Figura 4) mostrou uma distribuição heterogênea
493 das ancestralidades, porém, algumas amostras mostram uma estruturação mais bem
494 definida. Desta forma, merecem destaque as amostras de Alcântara (AL, em verde) e São
495 Luís (SL, em vermelho) pelas diferenças apresentadas entre si. Tais resultados
496 corroboram fortemente os obtidos pelos estimadores ϕ_{ST} e D_{jost} , que revelaram acentuada
497 estruturação genética entre estas duas amostras (AL x SL: $\phi_{ST} = 0,20$ e $D_{jost} = 0,57$).

498 Na Fig. 4 são representadas as frequências alélicas nas amostras de AL e SL para
499 os seis locos microssatélites analisados. Nota-se claramente que as frequências de alguns
500 alelos diferiram conspicuamente em alguns locos, a exemplo do Egc 18 (alelos 1 e 3) e
501 Egc 26 (alelo 10).



502
503
504
505
506
507

Fig. 4 Frequência de alelos de microssatélites para subpopulações de *E. cordata* de Alcântara (verde) e São Luís (vermelho) em duas localidades em áreas de transição no nordeste do Brasil. Observar que as escalas dos eixos y variam nos diferentes gráficos.

508 *DNAmt*

509 A amplificação e sequenciamento do segmento do gene mitocondrial *Cit b*
510 resultou em 107 seqüências de 601pb com 21 sítios variáveis, dos quais dois foram
511 *singletons* e 19 foram parcimoniamente informativos (16 bialélicos e três trialélicos).
512 Estes sítios resultaram em 21 haplótipos, dos quais o haplótipo H1 foi o mais frequente
513 (46,7%), presente em todos os pontos amostrados. Já os dados de diversidade genética
514 variaram entre 0,417 (AL e VG) e 0,952 (PA) para as medidas de diversidade haplotípica
515 (*Hd*), e 0,0001 (VG) e 0,0820 (FN) para as medidas de diversidade nucleotídica (π). Os
516 dados de diversidade genética encontrados para cada área amostrada estão discriminados
517 na Tabela 4

518
519

520 **Tabela 4** Índices de diversidade genética baseados em 601 pb do gene mitocondrial *Cit b*
 521 proveniente de 107 indivíduos de *Euglossa cordata* amostrados em 12 localidades do
 522 estado do Maranhão (MA) e uma no estado do Pará (PA). N = número de machos
 523 analisados; S = número de sítios segregantes; Nh = Número de haplótipos; Hd = diversidade
 524 haplotípica; π = diversidade nucleotídica; dp = desvio padrão.

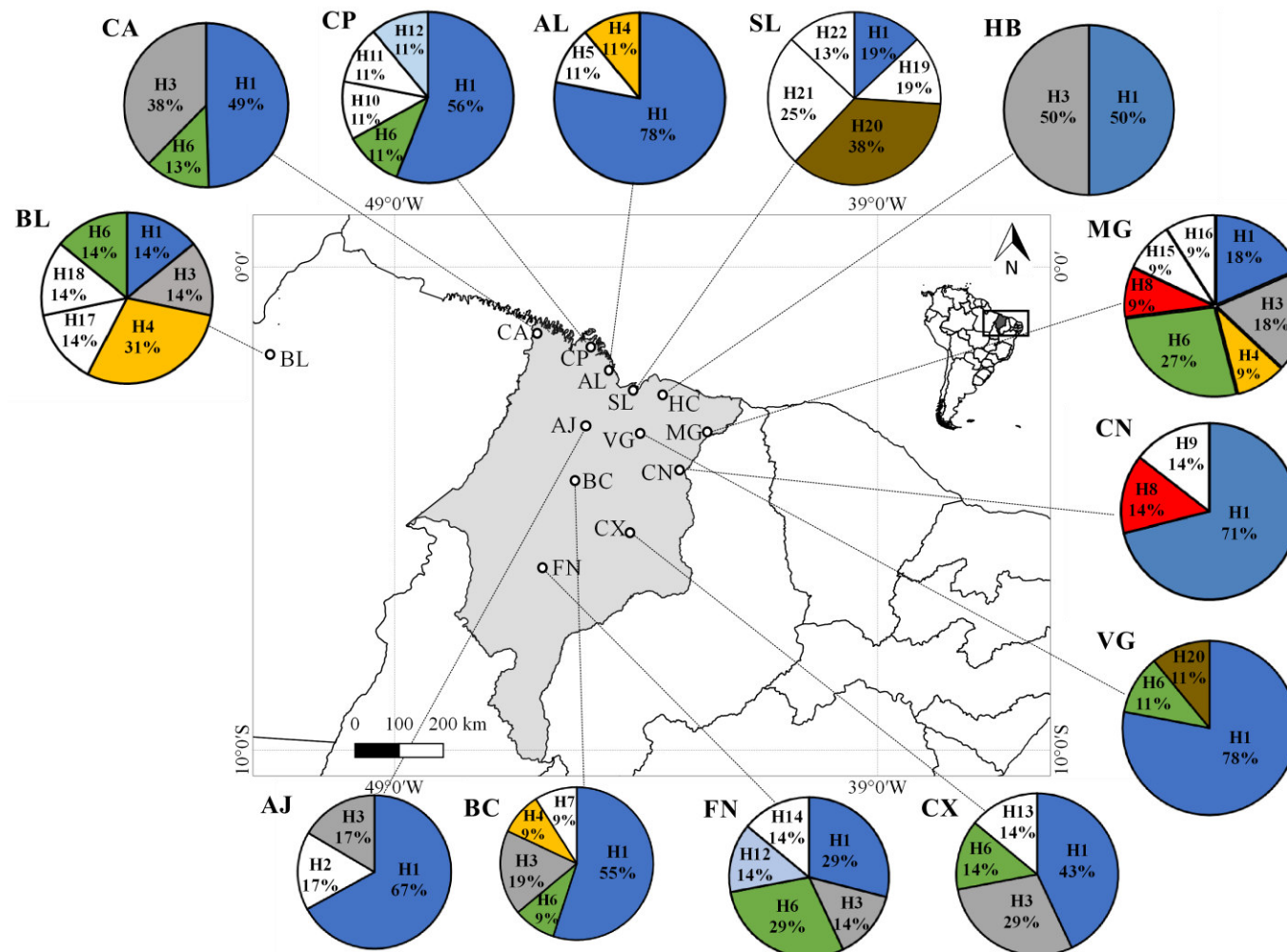
Localidade	N	S	Nh	Hd (dp)	π
AJ	6	2	3	0,600 (0,046)	0,0014
AL	9	3	3	0,417 (0,002)	0,0011
BC	11	3	5	0,709 (0,002)	0,0019
CA	8	2	3	0,679 (0,014)	0,0014
CN	7	6	3	0,524 (0,209)	0,0032
CP	9	14	5	0,722 (0,025)	0,0063
CX	7	3	4	0,810 (0,016)	0,0022
HC	8	1	2	0,571 (0,008)	0,0010
FN	7	13	5	0,905 (0,010)	0,0082
MG	11	5	7	0,909 (0,004)	0,0033
PA	7	4	6	0,952 (0,090)	0,0030
SL	8	5	5	0,857 (0,011)	0,0031
VG	9	3	3	0,417 (0,036)	0,0001
Média/total	8,231/107	4,923 /3,89	22	0,714 (0,001)	0,0032

525

526 A frequência dos haplótipos (Fig. 5) ao longo da área estudada apresenta
 527 diminuição na frequência do haplótipo H1 ao longo da paisagem à medida que se afasta
 528 do centro do estado, com exceção dos pontos SL e MG que demonstram uma quebra deste
 529 padrão. No caso do haplotipo H3 que foi o segundo mais frequente, estes não foi
 530 encontrado nas amostras de *E. cordata* do litorâneas AL, CP, SL e na direção leste do
 531 estado CN e VG.

532

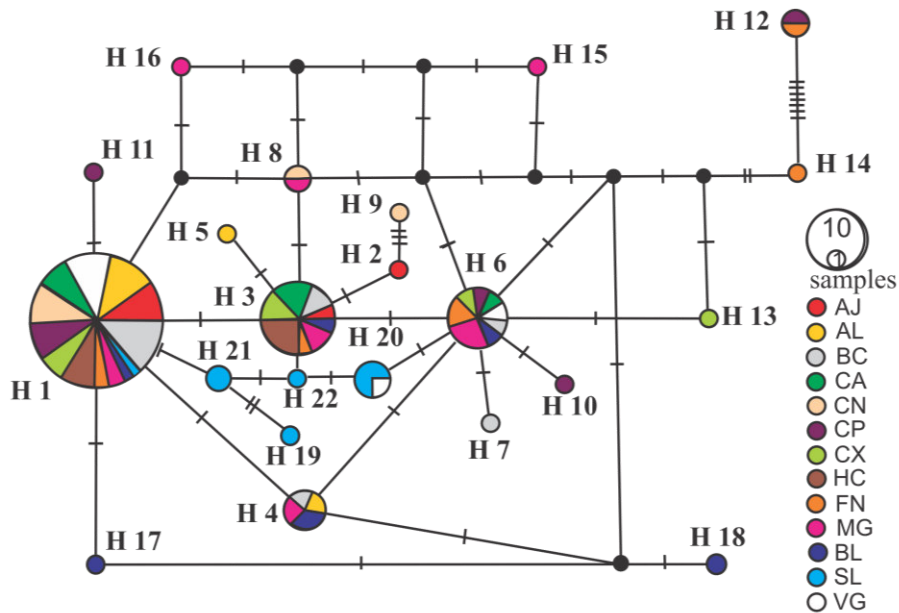
533



534

535 **Fig. 5** Frequência e distribuição dos diferentes haplótipos encontrados nas subpopulações de *E. cordata*. Os padrões coloridos representam os
 536 diferentes haplótipos encontrados nas populações de amostradas, enquanto que os haplótipos em branco correspondem à elementos privativos de
 537 cada população.

538 A rede de relacionamento de haplótipos exibiu uma mistura entre uma
 539 configuração característica de estrela com regiões mais complexas, onde vetores médios
 540 se intercalam com haplótipos amostrados por apenas um passo mutacional. A rede
 541 também indica o haplótipo H3 como central, embora H1 seja o mais frequente e também
 542 bem relacionado com muitos outros haplótipos por apenas um passo mutacional (Fig. 6).



543 **Fig. 6** Rede de haplótipos *Median-Joining* inferida a partir de 601pb do gene
 544 mitocondrial *Cit b* de 107 indivíduos distribuídos nos sítios de amostragem, gerado para
 545 os 22 haplótipos amostrados (H1-H22). Os tamanhos dos círculos são proporcionais à
 546 frequência dos respectivos haplótipos (H). Cada círculo representa um haplótipo, cores
 547 denotam localidades, enquanto as barras de linhas ligadas representa um passo mutacional
 548 e os círculos pretos representam os vetores medianos.

550

551 Na Tabela 5 são apresentadas as distâncias em quilometro e estimativas de
 552 diferenciação genética obtidas a partir da análise do segmento sequenciado do gene *Cit b*
 553 para os pares de 13 subpopulações estudadas. Assim como para os marcadores
 554 microsatélites, os valores de $mt\phi_{ST}$ nas comparações envolvendo indivíduos do ponto SL
 555 apresentaram-se significativos para todas as comparações, seguido pelo ponto AL que
 556 apresentou estruturação significativa em relação aos pontos (FN, PA e VG).

557 **Tabela 5** Distância em quilômetros e valores de $mt\phi_{ST}$ baseados na comparação par a par de 601pb de um segmento do gene mitocondrial
 558 *citocromo b (Cit b)* de 107 indivíduos de *Euglossa cordata* amostrados em 12 localidades no estado do Maranhão e uma no estado do
 559 Pará (BL). Fitorregiões L = código da localidade e N = número de indivíduos. Localidades com colorações similares estão presentes na
 560 mesma fitorregião. Valores em negrito correspondem as estimativas mais elevados de diferenciação genética.

FITORREGIÕES														
L	N	CA	CC		CM	FA		FB	FBC		FD	R	UR	
		AJ	CN	MG	FN	AL	CP	BC	CX	VG	CA	HC	BL	SL
AJ	6	--	204	270	350	100	165	97	237	100	277	144	475	88
CN	7	-0,105	--	139	349	256	340	189	77	121	475	183	677	233
MG	11	0,125	0,103	--	489	267	341	298	216	183	488	160	728	248
FN	7	0,136	0,138*	0,057	--	460	512	262	280	354	573	470	633	443
AL	9	-0,001	0,004	0,212*	0,220*	--	83	192	303	141	224	106	469	23,5
CP	9	-0,019	0,001	0,035	-0,04	0,014	--	252	388	225	148	176	400	105
BC	11	-0,037	0,008	0,054	0,132	0,018	-0,016	--	187	119	347	224	500	183
CX	7	0,011	0,032	-0,020	0,019	0,139	-0,04	-0,060	--	162	515	263	690	284
VG	9	-0,033	-0,006	0,112	0,157*	-0,054	-0,019	-0,064	0,011	--	356	112	566	120
CA	8	-0,065	-0,010	0,049	0,113	0,093	-0,012	-0,063	-0,093	-0,01	--	320	268	250
HC	8	-0,070	-0,009	-0,018	0,160*	0,141	0,021	0,004	-0,018	0,052	-0,114	--	573	87
BL	7	0,150	0,090	0,038	0,031	0,153*	-0,032	0,030	0,037	0,048	0,121	0,219*	--	485
SL	8	0,350*	0,307*	0,260*	0,217*	0,420*	0,186*	0,322*	0,275*	0,282	0,340*	0,392*	0,286*	--

561 *Valores estatisticamente significativos testados por 1000 permutações e $p < 0,05$. Valores negativos podem ser lidos como zero (0,000).

562 **Discussão/ Conclusão**

563 Os padrões de diversidade genética (H_e) revelados para as fitoregiões do
564 Maranhão apontam para ausência de diferenças entre estas formações vegetais, contudo
565 os municípios de São Luís, Bacabal, Anajatuba e Vargem Grande mostraram altos valores
566 de riqueza alélica. Vargem Grande ($A_p= 1,38$) e Carutapera ($A_p= 1,22$) mostrando
567 elevadas taxas de alelos privados.

568 Apesar do valor global de indicar uma moderada partição da variação genética
569 entre o conjunto de subpopulações ϕ_{ST} ($= 0,0725$; $p < 0,05$) de *E. cordata* analisadas no
570 presente estudo, quando as análises consideram os pares de subpopulações, uma estrutura
571 genética considerável se revela entre diversos pares destas subpopulações, com
572 implicações relevantes em termos de conservação da diversidade genética de *E. cordata*
573 ao longo da região estudada.

574 Quando tais resultados são comparados com os existentes da literatura para
575 populações desta espécie de Euglossini (Cerântola et al. 2011; Rocha-Filho et al. 2013;
576 Boff et al. 2014), estes chegam mesmo a surpreender, uma vez que, são raros ou
577 inexistentes os registros de valores de ϕ_{ST} como os encontrados para a subpopulação de
578 Alcântara (Al) em relação às amostras de BC, FN, HC e SL, que mostraram valores de
579 ϕ_{ST} da ordem de 0,20, indicando alta diferenciação genética. Os resultados são ainda mais
580 expressivos quando se considera os valores obtidos com o estimador de Jost (2008), D_{jost} ,
581 que indicaram significativa e alta estruturação genética para grande parte dos pares de
582 amostras analisados.

583 Por outro lado, um resultado, de certo modo contrastante foi obtido com as
584 análises do gene mitocondrial *Cit b*, que mesmo mostrando alta diferenciação para as
585 subpopulações de São Luís e Alcântara, assim como as análises nucleares, apontaram
586 resultados divergentes entre as amostras de BL e HC ($mt\phi_{ST}= 0,219$; $\phi_{ST} = 0,04$; $p>0,05$)
587 para os dois marcadores utilizados. Diferenças nos padrões de diferenciação genética
588 obtidos com marcadores nucleares e mitocondriais já constam na literatura do grupo
589 (López-Uribe et al. 2014; Penha et al. 2015), embora os valores de diferenciação
590 encontrados no presente estudo mostrem-se superiores aos destes estudos.

591 O sequenciamento do *Cit b* demonstrou mudanças nas frequências de haplótipos
592 (H1) na medida em que se afasta do centro do estado, com as localidades SL e MG
593 fugindo a este padrão. O haplótipo H3, que foi revelado como ancestral pela rede
594 haplotípica e esteve ausente nas amostras de *E. cordata* das localidades litorâneas de AL,

595 CP e SL, e ainda nas localidades na direção a lestes do estado com as amostras de CN e
596 VG. Estes padrões encontrados pode indicar eventos evolutivos particulares a estas
597 localidades aliados aos diferentes comportamentos de machos e fêmeas de Euglossini,
598 tendo como resultado padrões complexos na distribuição do grupo.

599 O comportamento filopátrico das fêmeas, reconhecido para a tribo Euglossini
600 (Augusto e Garófalo 2011; López-Uribe et al. 2014) e o fato dos machos não retornarem
601 mais aos ninhos maternos após emergência, sendo considerados como o sexo dispensor
602 em termos genéticos (López-Uribe et al. 2014), têm sido atribuídos à maior diferenciação
603 genética revelada pelos marcadores nucleares frente aos mitocondriais (López-Uribe et
604 al. 2014). Não menos importantes são as características distintas inerentes aos dois tipos
605 de DNA, nuclear e mitocondrial (Avisé 2004), que podem ter contribuído para o contraste
606 nos resultados destes. Apesar disto, no presente estudo, embora valores moderados (SL x
607 AJ; SL x BC) a alto (SL x AL) de diferenciação genética tenham sido encontrados por
608 meio dos marcadores mitocondriais para as amostras da ilha de São Luís. Os marcadores
609 nucleares e mitocôndrias utilizados demonstraram altos padrões de diferenciação para os
610 mesmas pares de localidades (AL x FN, AL x MG, AL x SL), com bases nestes resultados
611 medidas de manejo baseados nos padrões destes dois marcadores podem gerar resultados
612 mais satisfatório no conservação da diversidade genética paras as subpopulações de *E.*
613 *cordata* para estes ecossistemas de transição.

614 Em Euglossini, análises de genes mitocondriais, a exemplo do gene *Cit b*, têm
615 sido utilizadas para inferências sobre a história filogeográfica de algumas espécies e têm
616 se mostrado bastante informativas (López-Uribe et al. 2014; Penha et al. 2015; Frantine-
617 Silva et al. 2016). De acordo com López-Uribe et al. (2014) o DNAm_t é um marcador
618 informativo para fazer inferências sobre eventos de colonização, mesmo que este
619 marcador revele exclusivamente a história evolutiva de linhagens maternas. Assim, os
620 resultados combinados e fortemente congruentes de ambos os tipos de marcadores
621 empregados no presente estudo apontam seguramente para eventos históricos relevantes,
622 como um efeito fundador, no qual alguns indivíduos de *E. cordata* com um número
623 restrito de alelos tenham colonizado a ilha de São Luís a muito tempo atrás, seguido de
624 um aumento no crescimento populacional (Grant e Bowen 1998), isto é evidenciado pelo
625 riqueza alélica encontrados em São Luís ($R_a = 9,35$).

626 Interessantemente a análise do *Cit b* mostrou a tanto a ausência de estruturação
627 genética quanto a presença de haplótipos compartilhados entre pontos extremamente
628 distantes, como no caso de BL-FN (633km) e BL-CX (690km). Ao mesmo tempo, a rede

629 de relacionamento de haplótipos apresenta um padrão de íntima associação entre eles,
630 estando os principais separados por poucos passos mutacionais. Além disto, a maioria das
631 amostras mostram altos níveis de diversidade haplotípica ($h > 0,5$) e diversidade
632 nucleotídica abaixo de 0,5%, padrão que segundo Grant e Bowen (1998), indica gargalo
633 genético seguido de um rápido crescimento populacional e acúmulo de mutações,
634 sugerindo uma relação com o padrão de colonização de *E. cordata* na área estudada.

635 A influência do padrão de colonização explicaria a ausência de diferenciação entre
636 a maioria das amostras a partir dos dados mitocondriais, pois este genoma acaba
637 refletindo padrões de estruturação mais antigos. Marcadores nucleares, tais como
638 microssatélites, e mitocondriais, possuem características inerentes que muitas vezes
639 acabam fornecendo informações para períodos diferentes da história evolutiva de uma
640 espécie (Avise 2004). Deste modo é justificável o padrão contrastante dos marcadores
641 microssatélites em relação aos dados mitocondriais, mostrando diferenciação entre
642 grande parte das amostras inclusive dentro das mesmas fitoregiões (AL x CP, $\phi_{ST}=0,10$
643 e $D_{jost}=0,24$; CX x VG, $\phi_{ST}=0,05$ e $D_{jost}=0,15$). Deste modo, os dados de microssatélites
644 do presente estudo sugerem que apesar de algumas influências históricas (principalmente
645 no caso de São Luís), fatores mais contemporâneos, incluindo limitações no fluxo gênico,
646 possivelmente sejam os principais determinantes dos padrões de diferenciação genética
647 encontrado nesta área de estudo.

648 Embora a tribo Euglossini reúna abelhas reconhecidamente dotadas de grande
649 capacidade de voo (Janzen 1971; Pokorný et al. 2015), e de se ter registro na literatura de
650 que machos de *E. cordata* conseguiram transpor áreas desmatadas entre fragmentos
651 separados por uma distância de 4 km (Raw 1989), Boff et al. (2014) detectaram uma
652 restrição relevante no fluxo gênico de machos desta espécie entre ilhas oceânicas. Da
653 mesma forma, através dos nossos resultados pode-se inferir que os níveis de estrutura
654 genética da amostra de São Luís são consequência de uma possível restrição na dispersão
655 dos machos entre ilha e continente, ocasionando um efeito de isolamento desta
656 subpopulação. Por outro lado, Rocha-Filho et al. (2013), usaram nove locos
657 microssatélites para avaliar a diferenciação genética entre amostras de ambientes
658 insulares, localizados a 30 km do continente na região sudeste do Brasil, e verificaram
659 que os corpos d'água não constituem barreiras para machos de *E. cordata*.

660 O fato de São Luís ser uma área urbana também poderia ser outro ponto a ser
661 considerado na tentativa de explicar os elevados níveis de diferenciação genética
662 encontrados para a subpopulação de *E. cordata* desta ilha em relação a outras localidades.

663 Contudo, isto deve ser argumentado com cautela, pois Cerântola et al. (2011), ao
664 analisarem amostras de machos e fêmeas de *E. cordata* no estado de São Paulo,
665 encontraram, além de uma alta diversidade genética, níveis baixos de estruturação
666 genética entre amostras de 11 áreas urbanas. Ao mesmo tempo, quando se compara o
667 número de machos diploides encontrados por estes autores e o do presente estudo, os
668 resultados são conspicuamente diferentes (Cerântola et al. 2011; Rocha-Filho et al. 2014).

669 No caso da ilha de São Luís os resultados são ainda mais divergentes, pois de um
670 total de 24 machos analisados, seis foram identificados como sendo diploides. Enquanto
671 isto, no estudo de Boff et al. (2014), por exemplo, a maior frequência de machos diploides
672 foi encontrada para a subpopulação de *E. cordata* da menor ilha amostrada, com a
673 ocorrência de um macho diploide entre os 80 indivíduos analisados. Assim, no presente
674 estudo, o elevado número de machos diploides encontrado para SL pode estar refletindo
675 algum efeito de um antigo gargalo genético, que resultou em uma perda local de
676 diversidade de alelos no loco CSD, que determina o sexo nestes insetos (Zayed 2009).

677 Outra subpopulação que mostrou elevada diferenciação genética, tanto para
678 marcadores microssatélites quanto para mitocondrial, neste último caso de forma não tão
679 contundente quanto revelado pelos marcadores nucleares, foi a de Alcântara (AL). Como
680 já destacado, a maior estimativa de diferenciação encontrada no presente trabalho foi
681 entre a amostra desta localidade e da ilha de São Luís, tanto no caso das análises de
682 microssatélites ($\phi_{ST} = 0,20$, $D_{est} = 0,57$), quanto de DNAm (mt $\phi_{ST} = 0,42$), que são áreas
683 separadas 23,5km pela Baía de São Marcos. Tais resultados reforçam a ideia de que o
684 mar constitui sim uma possível barreira a dispersão destas subpopulações de *E. cordata*,
685 assim como demonstrado por Boff et al (2014) ao pesquisarem a diversidade genética desta
686 espécie em relação a ilhas e continente no Parque Estadual de Ilhabela em São Paulo.
687 Estes autores relatam também perda da diversidade genética desta espécie em razão do
688 isolamento pelo oceano.

689 O Golfão Maranhense, uma grande reentrância central do litoral do estado do
690 Maranhão, localizada entre Alcântara (a oeste) e São Luís (a leste), é uma região
691 delimitado pelas baías do Cumã, São José, São Marcos e Tubarão (Feitosa 2006). Esta
692 região, particularmente na localidade de Alcântara, está bruscamente delimitada por
693 falésias e colinas tabulares dos Tabuleiros Costeiros de Alcântara-Guimarães,
694 configuração esta que pode ter isolado as subpopulações de *E. cordata* com a expansão
695 da cidade, causando assim os elevados valores de diferenciação.

696 O Maranhão abriga uma complexa mistura de formações vegetais, que se sobrepõe
697 na região fornecendo recursos florais importantes para a manutenção de diversos
698 polinizadores como aves (Schulz-Neto et al 2010; Almeida e Almeida 2003), morcegos
699 (Cruz et al. 2007; Dias et al. 2009), besouros (Martins et al. 2011) e especialmente abelhas
700 (Rebêlo et al. 2003; Albuquerque et al. 1996; Albuquerque et al. 2001; Rêgo et al. 2006;
701 Silva et al. 2009), que são responsáveis por grande parte dos serviços de polinização.

702 Assim como alguns destes polinizadores, os machos de Euglossini se utilizam do
703 néctar para a alimentação e ainda fontes diversas de aromas para o comportamento de
704 corte, dessa maneira seria de se esperar que *Euglossa cordata* apresentasse maior
705 variabilidade genética para uma das fitorregiões do estado, por exemplo, para a Floresta
706 Perenifólia Densa a qual os Euglossini de forma geral tem como habitat de origem
707 (Ramirez et al. 2010), contudo nossos dados demonstraram que as subpopulações de *E.*
708 *cordata* apresentam medidas similares de variabilidade genética ao longo das áreas de
709 estudo.

710 Embora se descarte a associação de clusters genéticos de *E. cordata* a uma dada
711 fitorregião, esta mostrou uma diversidade genética numericamente maior para os
712 ambientes mais contrastantes, incluindo a zona de contato Floresta Aberta com Babaçu e
713 Cerrado ($He=0,816$), Floresta Perenifólia Aberta ($He=0,810$), Floresta Perenifólia Densa
714 ($He=0,804$), porém estes valores não foram estatisticamente diferentes (ANOVA,
715 $F=0,653$, $df=12$, $p>0,05$).

716 Em razão da associação de *E. cordata* com áreas alteradas (Powell e Powell 1987;
717 Milet-Pinheiro e Schlindwein 2005), muitas vezes esta espécie é negligenciada do ponto
718 de vista de sua conservação. Desconsiderando este aspecto, *E. cordata* desempenha papel
719 importante na manutenção dos ecossistemas neotropicais por conseguir transpor tanto
720 ambientes florestais quanto de matrizes pastos agrícolas, com isto tal plasticidade
721 ecológica garante a esta espécie eficiência nos serviços de polinização.

722 Portanto, respondendo a primeira questão levantada sobre a distribuição da
723 diversidade genética de *Euglossa cordata* para as diferentes fitorregiões do estado do
724 Maranhão, nossas análises de diversidade genética e de estruturação, apontam que
725 variabilidade genética nesta espécie se encontra distribuída de forma muito heterogênea
726 entre as diferentes áreas e ecossistemas amostrados e sem associação ao tipo de
727 fitorregião. Sobre a estrutura genética, segunda questão, não foi observada correlação
728 entre diferenciação genética e distância geográfica, no entanto padrões incomuns de
729 estruturação genética foram revelados, com áreas a 23km de distância mostrando alta

730 diferenciação (Alcântara e São Luís) e áreas mais distantes, 690km (Belém e Caxias)
731 apresentando baixa diferenciação. Assim nossos resultados apontam que as
732 subpopulações desta espécie amostradas no estado do Maranhão apresentam diferenças
733 genéticas importantes que merecem atenção ao se propor medidas para manejo e
734 conservação de tais populações.
735
736

REFERÊNCIAS

- Ackerman JD (1983) Specificity and mutual dependency of the orchid-euglossine bee interaction. *Biological Journal of the Linnean Society* 20:301–314
- Ackerman JD (2007) Geographic and Seasonal Variation in Fragrance Choices and Preferences of Male Euglossine Bees. *Biotropica* 21:340–347
- Albuquerque PMC, Mendonça, JAC (1996) Anthophoridae (Hymenoptera; Apoidea) e flora associada em uma formação de Cerrado no município de Barreirinhas, MA, Brasil. *Acta Amazônica* 1:45–54
- Almeida A, Couto HD, Almeida AF (2003) Diversidade beta de aves em habitats secundários da Pré-Amazônia maranhense e interação com modelos nulos. *Ararajuba* 11:157–171
- Ambruster WS, McCormick KD (1990) Diel foraging Pattern of Male Euglossine Bees: Ecological Causes and Evolutionary Response by Plants. *Biotropica* 22:160–170
- Aguiar WM, Gaglianone, MC (2011) Euglossine bees (Hymenoptera, Apidae, Euglossina) on an inselberg in the Atlantic Forest domain of southeastern Brazil. *Tropical Zoology* 24:107–125
- Arias MC, Silvestre D, Francisco, FO, Weinlich R, Sheppard, WS(2008)An oligonucleotide primer set for PCR amplification of the complete honey bee mitochondrial genome. *Apidologie* 39:475–480
- Augusto S, Garófalo C (2011) Task allocation and interactions among females in nests (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Apidologie* 2:162–173
- Avise JC (2004) *Molecular markers, natural history, and evolution*, Sunderland (Massachusetts), Sinauer Associates
- Boff S, Soro A, Paxton RJ, 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* 15:1123–1135
- Cameron SA (2004) Phylogeny and biology of neotropical orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Entomology* 49:377–404

- Campos LAO, Silveira FA, Oliveira ML, Abrantes CVMA, Morato EF, Melo GAR (1989) Utilização de armadilhas para a captura de machos de Euglossini (Hymenoptera, Apoidea). *Revista Brasileira de Zoologia* 6:21–626
- Cardinal S, Danforth BN (2011) The antiquity and evolutionary history of social behavior in bees. *PLoS ONE* 6: e21086
- Carvalho CC De, Rêgo MMC, Mendes FN (2006) Dinâmica de populações de Euglossina (Hymenoptera, Apidae). *Iheringia, Sér Zool* 96:249–256
- Cerântola NCM, Oi CA, Cervini M, Del Lama MA (2011) Genetic differentiation of urban populations of *Euglossa cordata* from the state of São Paulo, Brazil. *Apidologie* 42:214–222
- Cordeiro FA (2006) Atlas Escolar do Maranhão, Espaço Geo-historico e Cultural. Editora Grafset, João Pessoa
- Cori A, Ayles H, Beyers N, Schaap A, Floyd S, Sabapathy K, Moore A (2014) HPTN 071 (PopART): a cluster-randomized trial of the population impact of an HIV combination prevention intervention including universal testing and treatment: mathematical model. *PLoS One* 9:e84511
- Cruz LD, Martínez C, Fernandes FR (2007) Comunidades de morcegos em habitats de uma Mata Amazônica remanescente na Ilha de São Luís, Maranhão. *Acta amazonica* 37:613–620
- Dellicour S, Mardulyn P (2014) SPADS 1.0: a toolbox to perform spatial analyses on DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Resources* 14:647–651
- Dias PA, Santos CLC DOS, Rodrigues FS, Rosa LC, Silva K, Rebêlo JMM (2009) Espécies de moscas ectoparasitas (Diptera, Hippoboscoidea) de morcegos (Mammalia, Chiroptera) no estado do Maranhão. *Revista Brasileira de Entomologia* 53:128–133
- Dressler R (1982) Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics* 13:373–394
- Duart OMP, Gaiotto FA, Costa MA (2014) Genetic Differentiation in the Stingless Bee *Scaptotrigona xanthotricha* Moure 1950 (Apidae: Meliponini), a Species with Wide Geographic Distribution in the Atlantic Rainforest, *Journal of Heredity* 105:477–484.
- Dunlop DJ (2002) Theory and application of the Day plot (Mrs/Ms versus Hcr/Hc) 1. Theoretical curves and tests using titanomagnetite data. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth* 107:4–22
- Earl, DA, Von Holdt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7

- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE , a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611–2620
- 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, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5, A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564–567
- Farias RCAP, Madeira-da-Silva MC, Pereira-Peixoto MHP, Martins CF (2008) Composição e sazonalidade de espécies de Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em mata e duna na Área de Proteção Ambiental da Barra do Rio Mamanguape, Rio Tinto. *Neotropical Entomology* 37:253–258
- Farias RCAP, Martins CF (2013) Sazonalidade e Padrões Diários de Atividade de Machos de Euglossina (Hymenoptera, Apidae, Apini) e Preferências por Fragrâncias Artificiais em um Remanescente de Brejo de Altitude na Paraíba. *EntomoBrasilis* 6:202–9
- Feitosa A (2006) Relevo do Estado do Maranhão: uma nova proposta de classificação topomorfológica. *Simpósio Nacional de Geomorfologia; Regional Conference on Geomorphology* 1:1–11
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genética. Embrapa-Cenarge, Brasília.
- Frantine-Silva W, Giangarelli DC, Penha RE, Suzuki KM, Gaglianone MC, Alves-dos-Santos I, Sofia SH (2016) Phylogeography and historical demography of the orchid bee *Euglossa iopoeila*: signs of vicariant events associated to Quaternary climatic changes. *Conservation Genetics*. doi:10.1007/s10592-016-0905-7
- Freiria GA, Ruim JB, Sofia SH (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* 43:392–402
- Grant WAS, Bowen BW (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89:415–426
- Giangarelli DC, Freiria GA, Colatreli OP, Suzuki KM, Sofia SH (2009) *Eufriesea violacea* (Blanchard) (Hymenoptera, Apidae), an orchid bee apparently sensitive to size reduction in forest patches. *Neotropical Entomology* 38:610–615
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 1997. Zoneamento Geoambiental do Estado do Maranhão. Disponível em, ftp://geofp.ibge.gov.br/documentos/recursos_naturais/diagnosticos/maranhao.pdf. Acessado, 20 maio 2015

- Janzen DH (1971) Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical. *Science* 171: 203–205
- Justino DG, Augusto SC (2010) Avaliação da eficiência de coleta utilizando armadilhas aromáticas e riqueza de Euglossini (Hymenoptera, Apidae) em áreas de Cerrado do Triângulo Mineiro. *Revista Brasileira de Zoociências* 12:227–239
- Hinojosa-Díaz IA, Engel MS (2009) Potential distribution of orchid bees outside their native range, The cases of *Eulaema polychroma* (Mocsay) and *Euglossa viridissima* Friese in the USA (Hymenoptera, Apidae). *Diversity and Distribution* 15:421–428
- Kalinowski ST (2005) HP-RARE: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Mol Ecol Notes* 5:187–189
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452
- López-Uribe MM, Oi CA, Del Lama MA (2008) Nectar-foraging behavior of Euglossine bees (Hymenoptera, Apidae) in urban areas. *Apidologie* 39:410–418
- López-Uribe MM, Zamudio KR, Cardoso CF, Danforth BN (2014) Climate, physiological tolerance and sex-biased dispersal shape genetic structure of Neotropical orchid bees. *Molecular Ecology* 23:1874–1890
- Lozier JD, Zayed A (2016) Bee conservation in the age of genomics. *Conservation Genetics* doi: 10.1007/s10592-016-0893-7
- Martins MB, Oliveira TGD (2011) Amazônia Maranhense: diversidade e conservação. Mpeg, Belém
- Martins UR, Galileo MHM, Limeira-de-Oliveira F (2011) Cerambycidae (Coleoptera) do estado do Maranhão, Brasil: III. Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo) 51: 275–293
- Mendes FN, Rêgo MMC, Carvalho CC De (2008) Abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) coletadas em uma monocultura de eucalipto circundada por Cerrado em Urbano Santos, Maranhão, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia* 98:285–290
- Michener CD (2007) *The bees of the world*. Baltimore, Johns Hopkins University
- Milet-Pinheiro P, Schlindwein C (2005) Do euglossine males (Apidae, Euglossini) leave tropical rainforest to collect fragrances in sugarcane monocultures? *Revista Brasileira de Zoologia* 22:853–858
- Moure JS, Melo GAR, Faria JRLR (2012) Euglossini Latreille, 1802. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs) *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region*, online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acessado 25 Outubro 2016

- Nemésio A (2010) The orchid-bee fauna (Hymenoptera, Apidae) of a forest remnant in northeastern Brazil, with new geographic records and an identification key to the known species of the Atlantic Forest of northeastern Brazil. *Zootaxa* 2656: 55–60
- Nemésio A, Silveira FA (2007) Diversity and distribution of orchid bees (Hymenoptera, Apidae) with a revised checklist of species. *Neotropical Entomology* 36:874–888
- Nemesio A (2010) The orchid-bee fauna (Hymenoptera: Apidae) of a forest remnant in northeastern Brazil, with new geographic records and an identification key to the known species of the Atlantic Forest of northeastern Brazil. *Zootaxa* 2656: 55-66
- Nemésio A (2012) Methodological concerns and challenges in ecological studies with orchid bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossina). *Bioscience Journal* 28:118–134
- Nemesio A, Rasmussen C (2011) Nomenclatural issues in the orchid bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossina) and an updated catalogue. *Zootaxa* 3006: 1-42.
- Nemésio A, Cerântola NCM, Vasconcelos HL, Nabout JC, Silveira FA, Del Lama MA (2012) Searching for *Euglossa cyanochlora* Moure, 1996 (Hymenoptera, Apidae), one of the rarest bees in the world. *Journal of Insect Conservation* 16:745–755
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira, MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294–307
- Oliveira R, Pinto CE, Schlindwein C (2015) Two common species dominate the species-rich Euglossine bee fauna of an Atlantic Rainforest remnant in Pernambuco, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 75:1–8
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5, genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539.
- Parra-H A, Nates-Parra G (2007) Variación de la comunidad de abejas de las orquídeas (Hymenoptera, Apidae) en tres ambientes perturbados del piedemonte llanero colombiano. *Revista de Biología Tropical* 55:931–941
- Paxton RJ, Marion U, Zobel MU, Steiner J, Anne Zillikens A (2009) Microsatellite loci for *Euglossa annectans* (Hymenoptera, Apidae) and their variability in other orchid bees. *Conservation Genetics Resources* 9:1221–1223
- Penha RES, Gaglianone MC, Almeida FS, Boff SV, Sofia SH (2015) Mitochondrial DNA of *Euglossa iopoecila* (Apidae, Euglossini) reveals two distinct lineages for this orchid bee species endemic to the Atlantic Forest. *Apidologie* 46: 346-358
- Peruquetti RC, Antonio L, Campos O De (1999) Abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica, abundância, riqueza e aspectos biológicos. *Revista Brasileira de Zoologia* 16:101–118

- Pokorny T, Loose D, Dyker G, Quezada-Euán JJG, Eltz T (2015) Dispersal ability of male orchid bees and direct evidence for long-range flights. *Apidologie* 46:224–237
- Powell AH, Powell GVN (1987) Population dynamics of male euglossine bees in Amazonian forest fragments. *Biotropica* 19:176–179
- R Core Team (2015) R, A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Ramalho AV, Gaglianone MC, Oliveira ML de (2009) Comunidades de abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em fragmentos de Mata Atlântica no Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* 53:95–101
- Raw A (1989) The dispersal of euglossine bees between isolated patches of eastern Brazilian wet forest (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 33:103–107
- Rebêlo JMM, Silva F, Pereira YN, Costa JL, Silva J (1999) Distribuição de *Aedes aegypti* e do dengue no Estado do Maranhão, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro 15:477–486
- Rebêlo JMM, Silva FS (1999) Distribuição das abelhas Euglossini (Hymenoptera: Apidae) no estado do Maranhão, Brasil. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 28:389–401
- Rebêlo JMM, Cabral AJM (1997) Abelhas Euglossinae de Barreirinhas, Zona do Litoral da Baixada Oriental Maranhense. *Acta Amazonica* 27:145–152
- Rebêlo JMM, Silva FS (1999) Distribuição das abelhas Euglossini (Hymenoptera, Apidae) no Estado do Maranhão, Brasil. *Anais Sociedade Entomológica do Brasil* 28:389–401
- Rebêlo JMM, Rêgo MMC, Albuquerque PMC (2003) Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) da região setentrional do Estado do Maranhão, Brasil. *Apoidea Neotropica, Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure*. Editora UNESC, Criciúma 90: 265–278
- Rego M, Albuquerque P, Ramos MC, Carreira LM (2006) Nesting biology of *Centris flavifrons* (Friese) (Hymenoptera: Apidae, Centridini), one of the main pollinators of *Byrsonima crassifolia* L. Kunth in Maranhão, Brazil. *Neotropical entomology* 35:579–58
- Rocha-Filho LC, Cerântola NCM, Garófalo CA, Imperatriz-Fonseca VL, Del Lama M A (2013) Genetic differentiation of the Euglossini (Hymenoptera, Apidae) populations on a mainland coastal plain and an island in southeastern Brazil. *Genética* 141:65–74

- Rosa J. F., Ramalho, M., Monteiro, D. & Dantas, M. (2015). Permeability of matrices of agricultural crops to Euglossina bees (Hymenoptera, Apidae) in the Atlantic Rain Forest. *Apidologie*, 46(6), 691–702
- Roubik DW, Hanson PE (2004). *Orchid bees of tropical America, biology and field guide*. Heredia, Costa Rica INBIO
- Sydney NV, Gonçalves RB, Faria LR (2010) Padrões espaciais na distribuição de abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) da região Neotropical. *Papéis Avulsos de Zoologia* 50: 667–679
- Siegel S, Castellan NJ Jr (1988) *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. McGraw-Hill Book Company, New York
- Silva FS, Rebêlo JMM (2002) Population Dynamics of Euglossinae Bees (Hymenoptera, Apidae) in an early Second-Growth Forest of Cajual Island, in the State of Maranhão, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 29:587–599
- Silva O, Rêgo MMC, Albuquerque PMC, Ramos MC (2009) Abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em Área de Restinga do Nordeste do Maranhão. *Neotropical Entomology* 38:186–196
- Silveira GC, Freitas RF, Tosta THA, Rabelo LS, Gaglianone MC, Augusto SC (2014) The orchid bee fauna in the Brazilian savanna, do forest formations contribute to higher species diversity? *Apidologie* 46:197–208. doi:10.1007/s13592-014-0314-1
- Sofia HS, Suzuki KM (2004) Comunidades de machos de abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em fragmentos florestais no Sul do Brasil. *Neotropical Entomology* 33:693–702
- Sofia SH, Paula FMD, Santos AMD, Almeida FS, Sodré LM (2005) Genetic structure analysis of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae) populations from southern Brazilian Atlantic rainforest remnants. *Genetics and Molecular Biology* 28:479–484
- Souza RO, Cervini M, Del-Lama MA, Paxton RJ (2007) Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera, Apidae). *Molecular Ecology Notes* 7:1352–1356
- Schulz-Neto A, Serrano IL, Efe MA (2010) Muda e parâmetros biométricos de aves migratórias no norte do Brasil. *Ornithologia* 3:21–33
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013). *Molecular Biology and Evolution* 30:2725–2729
- Thomazini MJ, Thomazini APBW (2000) A fragmentação florestal e a diversidade de insetos nas florestas tropicais úmidas. *Embrapa Acre* 57:1–21

- Thummajitsakul S, Klinbunga S, Smith D, Sittipraneed S (2008). Original article Genetic diversity and population structure of *Trigona pagdeni* Schwarz in Thailand *Apidologie* 39:446–455
- Tonhasca JA, Blackmer JL, Albuquerque GS (2002) Abundance and Diversity of Euglossine Bees in the Fragmented Landscape of the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 34:416–422
- Tonhasca A, Albuquerque GS, Blackmer JL (2003) Dispersal of euglossine bees between fragments of the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Tropical Ecology* 19:99–102
- Waldschmidt AM, Lopes LA, Marco P, Campos LAO(2005) Genetics of Euglossini bees (Hymenoptera) in fragments of the Atlantic Forest in the region of Viçosa, MG. *Brazilian Journal of Biology* 65:541–549
- Wikelski M, Moxley J, Eaton-Mordas A, Opez-Urbe MML, Holland R, Moskowitz D, Roubik DW, Kays R (2010). Large-range movements of neotropical orchid bees observed via radio. *PLoS ONE* 5:e10738
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15:323–354
- Zayed A (2009) Bee genetics and conservation. *Apidologie* 40:237–262

Apêndice

Tabela 1S. Número de alelos encontrados em oito fitorregiões do Maranhão para seis locos de microssatélites de *Euglossa cordata*. Os primers utilizados referem-se aos descritos por Souza et al. (2007) e Paxton et al. (2009).

Locos	Motivo	Sequencia promotora	Na	Extensão (pb)
Ann2	(CT) ₁₂	F, 5'-ATTGCCTTGAACGTTTCCAC-3' R, 5'-GCTAGACGCGCGTAATCTTC-3'	34	144-226
Egc18 HEX	(GAA) ₉	F 5'-TGATACAGGTCGGCGTAAAA-3' R 5'-GGTAACTCCGTCGCGAACTA-3'	18	159-207
Egc 24 NED	(GAA) ₆	F 5'-AGGAGAACCGAACAGCGATA-3' R 5'-CCGAGCTTTTTCTTCCCTCT-3'	12	192-225
Egc 26 PET	(CTT) ₅	F 5'-GCCGAACAAACATCTCGTCT-3' R 5'-CGGAACTTTGATATCGTCGAG-3'	30	132-231
Egc 30b FAM	(CT) ₁₂	F 5'-CGAATCTTGAAATGGCTGAGA-3' R 5'-ACACCGCGAGAGCGAGAG-3'	35	56-196
Egc 37 NED	(CTT) ₆	F 5'-ATCCTCCTCTTCGTGGTCCT-3' R 5'-GGCAAACCTCCGCTTGATA-3'	26	159-237

Ecology Home >
Life Sciences

> Ecology

SERIE TEXT BOOKS REFERENCE
WORKS

SUBDISCIPLINES JOURNALS BOOKS



Conservation Genetics

Editor: A. Rus Hoelzel

ISSN: 1566-0621 (print version)

ISSN: 1572-9737 (electronic version)

Journal no. 10592

\$99.00

Get Subscription



Personal Rate e-only for the Americas

Online subscription, valid from January through December of current calendar year Immediate access to this year's issues via SpringerLink

1 Volume(-s) with 6 issue(-s) per annual subscription Automatic annual renewal

More information: >> FAQs // >> Policy

[ABOUT THIS JOURNAL](#) [EDITORIAL BOARD](#) [ETHICS & DISCLOSURES](#) [INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#)

Instructions for Authors

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

ARTICLE TYPES

Appropriate subjects for papers in Conservation Genetics are described in the section on 'aims and scope' (and see note appended below on dominant markers).

Original research papers are typically no longer than 6,000 words, but can be up to a maximum of 8,000 words. The writing style should be concise and consistently relevant. Manuscripts should be structured as follows. The title page should be organized as described in the section 'title page'. This should be followed by the Abstract (typically 200-250 words), Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion sections. These sections can be divided into subsections, as appropriate. Both print and online appendices are allowed (online versions encouraged for large appendices). Further specific information on the formatting of the text and nature of the acknowledgements (which follow the text and precede the references) is given in the section on 'text'. Referencing format is described in the section on 'references'. References should be followed by the figure captions, figures and tables, in that order.

Short communications of a maximum 2,000 words, 30 references and three display items will also be considered. These should normally follow the above format, though results and discussion sections can be combined if preferred.

Review Articles and Perspectives are typically solicited by the editors, but can be submitted after an initial contact with the editor in chief. Reviews will be concise reports on an area of interest in conservation genetics and should be no more than 7,000 words long. They are not expected to adhere to a strict format, though they should include the title page and abstract as described above. Perspectives can provide personal viewpoints, promote discussion on current topics, or propose new areas of conservation genetic research, application or development. They must meet the normal standards of scientific objectivity and will be subjected to peer review. These should be no longer than 3,000 words.

Important note on RAPDs, ISSRs and similar dominant markers:

We do not send for review papers that use only RAPD (or similar) markers when using different markers, or other markers in addition would be more appropriate. This holds for all studies looking at population structure in sexual species, given the problems with dominance and interpretation. There are exceptional circumstances for which RAPDs (or similar) may work well (e.g. with clonal species), and we therefore don't exclude their inclusion entirely, but discourage their exclusive use in all cases, and when used, require rigorous assessment of the repeatability of the genotypes.

The word count should include title, abstract, keywords, body of the text, figures, and tables but excluding authors affiliations, references and on-line supplementary material.

TITLE PAGE

[Title Page](#)

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

[Abstract](#)

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

[Keywords](#)

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages. Do

not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Genus and species names should be in italics.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990). This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

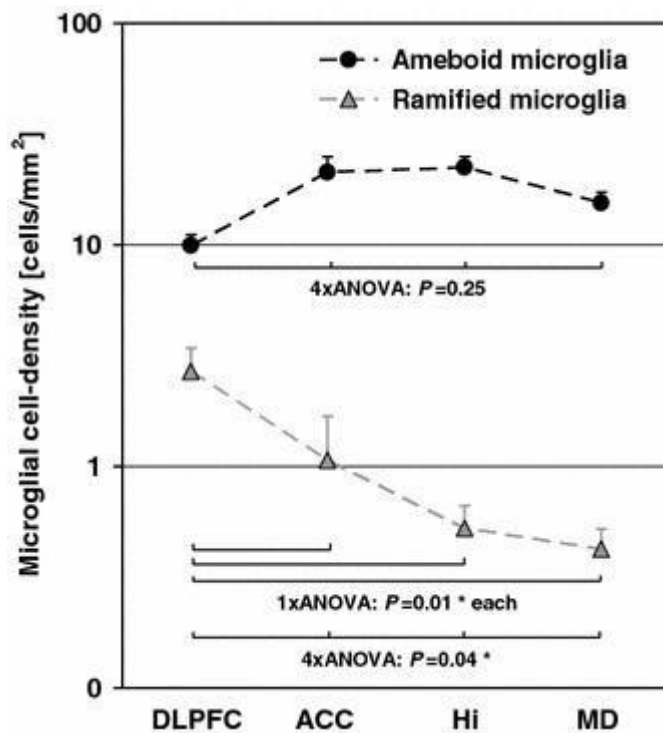
Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

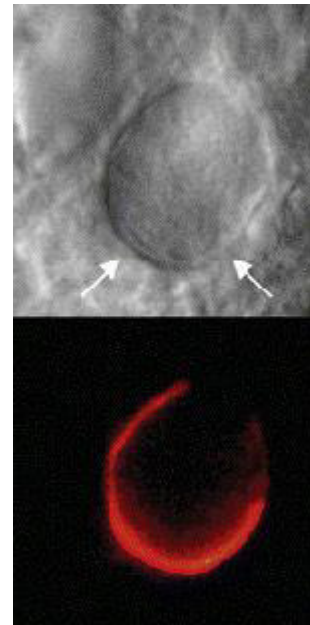
Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

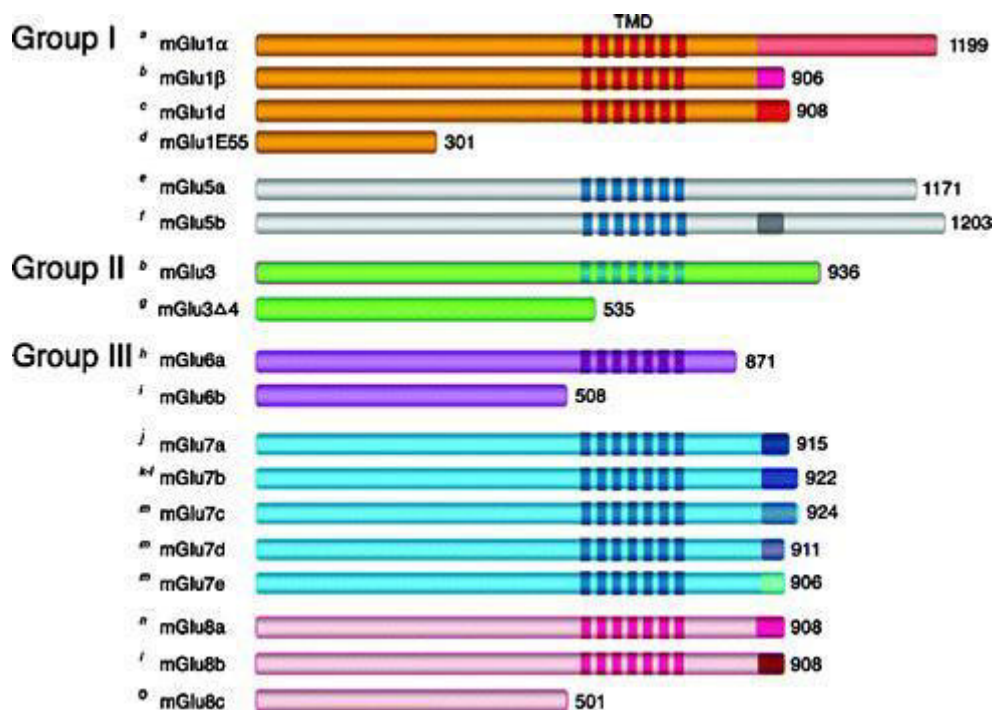
Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



Combination Art



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order. Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

⋮

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file. Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible. When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".

Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

ENGLISH LANGUAGE EDITING

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.

Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts.

English language tutorial

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

为便于编辑和评审专家准确评估您稿件中陈述的研究工作，您需要确保您的英语语言质量足以令人理解。如果您需要英文写作方面的帮助，您可以考虑：

- 请一位以英语为母语的同事审核您的稿件是否表意清晰。
 - 查看一些有关英语写作中常见语言错误的教程。
 - 使用专业语言编辑服务，编辑人员会对英语进行润色，以确保您的意思表达清晰，并识别需要您复核的问题。我们的附属机构 Nature Research Editing Service 和合作伙伴 American Journal Experts 即可提供此类服务。
- 教程

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

请注意，使用语言编辑服务并非在期刊上发表文章的必要条件，同时也并不意味或保证文章将被选中进行同行评议或被接受。

如果您的稿件被接受，在发表之前，我们的文字编辑会检查您的文稿拼写是否规范以及文体是否正式。

エディターと査読者があなたの論文を正しく評価するには、使用されている英語の質が十分に高いことが必要とされます。英語での論文執筆に際してサポートが必要な場合には、次のオプションがあります：

- ・英語を母国語とする同僚に、原稿で使用されている英語が明確であるかをチェックしてもらう。
- ・英語で執筆する際によくある間違いに関する英語のチュートリアルを参照する。
- ・プロの英文校正サービスを利用する。校正者が原稿の意味を明確にしたり、問題点を指摘し、英語を向上させます。Nature Research Editing Service と American Journal Experts の2つは弊社と提携しているサービスです。

英語のチュートリアル

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

英文校正サービスの利用は、このジャーナルに掲載されるための条件ではないこと、また論文審査や受理を保証するものではないことに留意してください。

原稿が受理されますと、出版前に弊社のコピーエディターがスペルと体裁のチェックを行います。

영어원고의 경우, 에디터 및 리뷰어들이 귀하의 원고에 실린 결과물을 정확하게 평가할 수 있도록, 그들이 충분히 이해할 수 있을 만한 수준으로 작성되어야 합니다. 만약 영작문과 관련하여 도움을 받기를 원하신다면 다음 의사항들을 고려하여 주십시오:

- 귀하의 원고의 표현을 명확히 해 줄 영어 원어민 동료료를 찾아서 리뷰를 의뢰합니다.
- 영어 튜토리얼 페이지에 방문하여 영어로 글을 쓸 때 자주 하는 실수들을 확인합니다.
- 리뷰에 대비하여, 원고의 의미를 명확하게 해주고 리뷰에서 요구하는 문제점들을 식별해서 영문 수준을 향상시켜주는 전문 영문 교정 서비스를 이용합니다. Nature Research Editing Service와 American Journal Experts에서 저희와 협약을 통해서 서비스를 제공하고 있습니다.

영어 튜토리얼 페이지

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

영문 교정 서비스는 게재를 위한 요구사항은 아니며, 해당 서비스의 이용이 피어 리뷰에 논문이 선택되거나 게재가 수락되는 것을 의미하거나 보장하지 않습니다.

원고가 수락될 경우, 출판 전 저희 측 편집자에 의해 원고의 철자 및 문체를 검수하는 과정을 거치게 됩니다.

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling ("self-plagiarism")).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. "salami-publishing").

No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ("plagiarism"). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.

Adding and/or deleting authors at revision stage may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the role of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.

Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is maintained on the platform, watermarked "retracted" and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

The author's institution may be informed.
COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information

regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest
 Research involving Human Participants and/or Animals
 Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)

- Honoraria for speaking at symposia Financial

- support for attending symposia Financial

- support for educational programs Employment

- or consultation

- Support from a project sponsor

- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships

- Multiple affiliations

- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest

- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)

- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color. Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License
[Offprints](#)

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

OPEN CHOICE

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Open Choice

[Copyright and license term – CC BY](#)

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Find more about the license agreement

READ THIS JOURNAL ON SPRINGERLINK

[View Open Access Articles](#)[Online First Articles](#)[All Volumes & Issues](#)

FOR AUTHORS AND EDITORS

	2
	.
	0
2015 Impact	4
Factor	0

[Aims and Scope](#)[Submit Online](#)[Open Choice - Your Way to Open Access](#)[Instructions for Authors](#)[Abstracts for practitioners](#)

SERVICES FOR THE JOURNAL

[Contacts](#)[Download Product Flyer](#)[Shipping Dates](#)[Order Back Issues](#)[Article Reprints](#)[Bulk Orders](#)

ALERTS FOR THIS JOURNAL

Get the table of contents of every new issue published in [Conservation Genetics](#).

Your E-Mail Address

SUBMIT



Please send me information on new Springer publications in [Conservation Biology / Ecology](#).

