

Estrutura genética de populações insulares e continentais  
de abelhas da Mata Atlântica

Relatório científico apresentado ao Instituto  
Ambiental do Paraná.

**Responsável: Ms. Flavio de Oliveira Francisco**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Arias

Laboratório de Genética e Evolução de Abelhas  
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva  
Instituto de Biociências  
Universidade de São Paulo

São Paulo - SP

2010

## 1. RESUMO

Na primeira etapa da realização do projeto foram realizadas viagens de coleta de abelhas em cidades do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Um total de 118 abelhas da espécie *T. angustula* foram genotipadas para 8 loco microssatélites. As análises mostraram uma alta diversidade genética na espécie como um todo, mas um pouco menor na população da Ilha Grande, RJ. Além disso, cálculos estatísticos mostram isolamento genético entre as populações estudadas até o momento. Em relação a *Bombus morio*, 34 indivíduos foram genotipados para 10 locos e baixa variabilidade genética foi detectada. Pequeno número amostral e/ou o uso de “primers” de microssatélites heterospecíficos são possíveis explicações para esse resultado. Análises populacionais mostraram não diferenciação genética entre abelhas dessa espécie da Ilha Grande e de Céu Azul (PR), sugerindo que os 2 km que separam a ilha do continente podem não ser uma barreira a sua dispersão.

## 2. INTRODUÇÃO

O DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) vem sendo, desde o século passado, uma das moléculas mais empregadas em estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas e o entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos (Wilson *et al.*, 1985; Avise *et al.*, 1987; Moritz *et al.*, 1987). A utilização dessa molécula em tais estudos se deve ao fato dela apresentar alta taxa de evolução, ser circular, pequena e de estrutura gênica simples (Brown, 1985; Harrison, 1989). O seqüenciamento de regiões do DNAm<sub>t</sub> tem sido uma das metodologias mais aplicadas para a caracterização desse genoma e para a detecção de variabilidade genética entre populações ou espécies.

Outra classe de marcador molecular amplamente utilizada em estudos populacionais é a dos microssatélites. Estes, compreendem regiões que apresentam um número variável de repetições em tandem de 1 a 6 bases do DNA (Hancock, 1999), e que podem ser amplificadas via PCR. Por serem caracteres mendelianos, codominantes, seletivamente neutros e altamente polimórficos (Strassmann

*et al.*, 1996), os microssatélites têm sido extremamente úteis em estudos de mapeamento gênico, relações de parentesco (Chakraborty e Kimmel, 1999), variação intraespecífica (Moritz e Hillis, 1996), hibridação, história populacional e filogeografia. Também têm sido empregados para avaliar o impacto do comportamento reprodutivo, estrutura social e dispersão em populações em extinção (Beaumont e Bruford, 1999).

A caracterização da variabilidade genética de populações é essencial para o conhecimento da biodiversidade de um determinado ecossistema. Entretanto, a devastação da vegetação nativa, nos diversos ecossistemas brasileiros, vem ameaçando de extinção as espécies de abelhas que dependem de substratos como ocos de árvores para a nidificação, e segundo Kerr *et al.* (1996) esse número já chega a cerca de 100 espécies. Um bioma que vem sofrendo com a perda de florestas é a Mata Atlântica. Acredita-se que o ecossistema da Mata Atlântica esteja entre os mais ameaçados do planeta (Galindo-Leal e Câmara, 2005). Devido à grande devastação sofrida e ao alto nível de endemismo, a Mata Atlântica é considerada como um dos 25 locais prioritários para ações de conservação da biodiversidade na Terra (Myers *et al.*, 2000).

A diminuição do tamanho populacional devido à fragmentação do habitat causado pelo desmatamento pode levar à diminuição da variabilidade genética da população (Beebee e Rowe, 2004), aumentando suas chances de extinção. Contudo, existem ambientes que são naturalmente fragmentados e que mesmo assim, apresentam elevado número de espécies endêmicas: as ilhas. Os ambientes insulares são muito propícios à especiação (Vieitas, 1995). Fatores como o grau de isolamento geográfico da ilha e o tempo transcorrido desde o estabelecimento das espécies ancestrais influenciam o processo de especiação de organismos insulares (Attenborough, 1988).

As ilhas são um dos ecossistemas mais desafiantes para a sobrevivência das comunidades de plantas e animais. A presença da água circundante faz com que cada ilha possa ser considerada como um ecossistema individualizado (Ângelo, 1989). Como características comuns a todas as ilhas destacam-se o isolamento geográfico e a área geralmente pequena. Além destas, outras características influem na diversidade da biota insular, como por exemplo, a idade da ilha; a

diversidade de habitats da ilha; e a distância entre a ilha e o continente ou ilhas vizinhas, pois estes podem servir como fonte de organismos colonizadores (MacArthur e Wilson, 1963; Vanzolini, 1973; Cox *et al.*, 1976; Diamond, 1976; Connor e McCoy, 1979; Williamson, 1981; Ângelo, 1989). Isso faz com que a diversidade de espécies do continente ou de áreas vizinhas influa na composição da biota insular (Ângelo, 1989). A atividade humana tem influenciado a ecologia das ilhas de várias maneiras, mas a mais negativa certamente deve ser a extinção de numerosas espécies e linhagens insulares. Existem quatro razões principais pelas quais as espécies insulares são reduzidas pela ação humana: (1) predação direta; (2) introdução de espécies exóticas; (3) difusão de doenças; e (4) degradação ou perda de habitat (Whittaker, 1998). Em um contexto global, a perda de habitat é comumente vista como o maior problema para a biodiversidade (Lawton e May, 1995).

Uma característica interessante em relação às ilhas é poder estudar suas populações sabendo quando elas se isolaram fisicamente das populações do continente. Portanto, as variações do nível do mar, no tempo geológico, interessam em particular, pois as ilhas continentais brasileiras estão intimamente relacionadas a estes eventos. As alterações do nível do mar são resultantes da interação de processos como as variações no volume de água dos oceanos (devido aos períodos glaciais e interglaciais), os movimentos tectônicos e o relevo local (Martin *et al.*, 1987). Durante os períodos glaciais do Quaternário, uma massa significativa de água existente sobre a Terra transformou-se em geleiras (Ângelo, 1989). No último período glacial (40.000-20.000 anos atrás) o mar encontrava-se a mais de 100 m abaixo do nível atual (Sampaio, 1997). Esse recuo do mar coincide mais ou menos com o limite da plataforma continental e, portanto, todas as ilhas existentes hoje na plataforma estiveram ligadas ao continente (Ângelo, 1989). No final do Pleistoceno e início do Holoceno, há cerca de 16.000 anos, o clima passou gradualmente a quente e úmido, levando a um aumento no nível do mar. Tal aumento, chamado de transgressão, foi o responsável pela formação das ilhas continentais, através do isolamento de algumas colinas e morrotes do continente (Sampaio, 1997). Portanto, pode-se considerar que a transgressão do nível do mar isolou fisicamente as populações insulares por aproximadamente 16.000 anos, constituindo dessa maneira, um dado muito importante

para o conhecimento da biologia da fauna e flora das ilhas.

Em virtude do exposto acima, nós pretendemos estudar a variabilidade e a estrutura genética de populações em fragmentos de Mata Atlântica dos Estados de SC, PR, SP, MG e RJ, e em ilhas com mais de 100 hectares (ha) localizados nos Estados de SC, PR, SP e RJ de duas espécies de abelhas: *Tetragonisca angustula* e *Bombus morio* utilizando o DNAm e os microssatélites como marcadores moleculares.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Nessa primeira etapa do trabalho foram realizadas viagens de coleta em cidades do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. A Tabela I sumariza os pontos de coleta e o número de abelhas coletadas até o momento.

**Tabela I.** Locais de coleta e respectivo número amostral. *Ta*: *Tetragonisca angustula*; *Bm*: *Bombus morio*.

Local	Ponto Amostral	<i>Ta</i>	<i>Bm</i>
Continente	Céu Azul, PR	30	6
	Guaratuba, PR	6	2
	Apiaí, SP	4	5
	Teodoro Sampaio, SP	18	2
	Itamonte, MG	7	-
	Teresópolis/Petrópolis, RJ	10	4
Ilha	Ilha de São Sebastião, SP	1	2
	Ilha de Búzios, SP	-	1
	Ilha Grande, RJ	42	12
TOTAL		118	34

As abelhas sobre as flores ou próximas a elas foram capturadas com auxílio de rede entomológica e armadilhas de sucção. Com o intuito de diminuir a probabilidade de se coletar duas abelhas do mesmo ninho, cada ponto amostral foi dividido em subáreas de modo que cada indivíduo fosse coletado a pelo menos 500m de distância de outro. Tal estratégia não foi empregada quando as abelhas foram coletadas de ninhos, o que aconteceu somente com *T. angustula* (Tabela II). Nesses casos, a coleta foi realizada independentemente da distância entre os ninhos, os quais foram

separados em duas categorias: ninhos naturais e ninhos em caixas. Os primeiros foram aqueles localizados em árvores ou outros tipos de substratos. Os ninhos em caixas eram mantidos por residentes das áreas de coletas e, de acordo com eles, as caixas (vazias) eram ocupadas por enxames naturais de *T. angustula*. Não foram coletadas amostras de ninhos resultantes de divisão artificial. Depois de coletadas as abelhas foram armazenadas em tubos Falcon com etanol 70%, transportadas para o laboratório, lavadas e armazenadas a -80°C até a extração do DNA.

**Tabela II.** Número de abelhas *Tetragonisca angustula* coletadas em flores e em ninhos. C: número total de indivíduos coletados em flores e ninhos; T: ninhos naturais; X: ninhos em caixas.

Número	Ponto Amostral	C	Flor	Ninho	
				T	X
3	Céu Azul, PR	30	12	1	17
5	Guaratuba, PR	6	1	-	5
6	Apiáí, SP	4	2	1	1
7	Teodoro Sampaio, SP	18	1	8	9
9	Itamonte, MG	7	4	3	-
10	Teresópolis/Petrópolis, RJ	10	10	-	-
16	Ilha de São Sebastião, SP	1	-	1	-
21	Ilha Grande, RJ	42	2	9	31

O procedimento para extração de DNA total, descrito por Aljanabi e Martinez (1997), foi adaptado para ser utilizado nas espécies desse projeto. O material utilizado como fonte de DNA para a extração foi um tórax para a espécie *T. angustula* e uma perna para *B. morio*. Abaixo segue a descrição do protocolo de extração:

1. Em uma placa com 96 poços de 1 ml, adicionar o material (tórax ou perna) de uma abelha em cada poço;
2. Colocar em cada poço uma esfera de aço inoxidável de 0,2mm de diâmetro;
3. Adicionar 0,1 mg/ml de proteinase K ao tampão de digestão (NaCl 10mM; Tris 10mM pH 8,0; EDTA 10mM pH 8,0; SDS 0,5%). Adicionar 500 µl dessa mistura em cada um dos poços;
4. Selar a placa;
5. Colocar a placa no homogeneizador de tecidos por 5 min a 25 Hz;
6. Inverter a placa e repetir o passo 5;

7. Incubar a 55°C de um dia para o outro;
8. Repetir os passos 5 e 6;
9. Incubar a 55°C por 30 min;
10. Retirar o plástico que sela a placa e adicionar 20 µl de NaCl 5M em cada um dos poços;
11. Selar a placa e a inverter por 10 vezes;
12. Incubar a -20°C por 40 min;
13. Centrifugar a 4.100 rpm por 60 min a 4°C;
14. Retirar o plástico que sela a placa, recolher 200 µl do sobrenadante e adicionar a uma nova placa;
15. Adicionar 400 µl de etanol 98% gelado;
16. Selar a placa e a inverter por 10 vezes;
17. Incubar a -20°C de um dia para o outro;
18. Centrifugar a 4.100 rpm por 60 min a 4°C;
19. Retirar o plástico que sela a placa, descartar o sobrenadante e lavar o precipitado com 600 µl de etanol 70%;
20. Selar a placa e centrifugar a 4.100 rpm por 20 min a 4°C;
21. Retirar o plástico que sela a placa, descartar o etanol 70% e deixar a placa secar na bancada por 60 min;
22. Dissolver o precipitado com 50 µl de TE 1×;
23. Deixar a placa na bancada por 30 min;
24. Vortexar brevemente por duas vezes.
25. Armazenar a placa a -20°C.

As reações de amplificação dos locos microssatélites foram adaptadas do método descrito por Schuelke (2000) em que quatro “primers” (5’-CCTGGCGACTCCTGGAG-3’) são marcados na sua extremidade 5’ com os fluoróforos 6-FAM, VIC, NED e PET, respectivamente. Os “primers” “forward” (F) tem adicionalmente à sua sequência, a mesma sequência do “primer” marcado na sua

extremidade 5'. As reações de PCR foram realizadas em volumes de 5 µl finais contendo: tampão de PCR 1×; 200 µM de dNTPs; 1,5-2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,0125 µM do “primer” F; 0,125 µM do “primer” marcado com 6-FAM, VIC, NED ou PET; 0,125 µM do “primer” R; Glicerol 1%; 0,5 µl da extração de DNA e 0,15 U de *Taq* DNA polimerase (Fisher Biotech). Quinze pares de “primers” foram desenhados para a amplificação dos locos microssatélites em ambas as espécies. Para *T. angustula* foram utilizados “primers” homoespecíficos (Brito *et al.*, 2009) enquanto que para *B. morio* “primers” derivados de *B. spp.* (Estoup *et al.*, 1995; Estoup *et al.*, 1996; Funk *et al.*, 2006). Informações acerca dos locos utilizados, como tipo de repetição, sequência dos “primers” e condições de amplificação podem ser visualizados na Tabela III para *T. angustula* e na Tabela IV para *B. morio*.

Após a amplificação, misturou-se 2 µl do produto da amplificação dos quatro “primers” marcados com os diferentes tipos de fluoróforos (totalizando 8 µl) a 7 µl de água Milli-Q. Depois, 1 µl dessa solução diluída foi adicionado a 10 µl de formamida e 0,1 µl do marcador de peso molecular (GeneScan 500 LIZ da Applied Biosystems). Essa solução foi analisada no “Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer”. A genotipagem dos indivíduos foi realizada automaticamente pelo GENEMAPPER 3.7 (Applied Biosystems) e conferida visualmente.

Frequências alélicas, número de alelos (Na), número efetivo de alelos (Ne), riqueza alélica ( $\hat{A}$ ), número médio de alelos privados por população ( $\hat{A}_p$ ), porcentagem de locos polimórficos (PLP), índices de fixação (f) e taxas de heterozigose observada (Ho) e esperada (He) foram calculados pelo programa GENALEX 6.2 (Peakall e Smouse, 2006). Para a comparação de ‘ $\hat{A}$ ’ e ‘ $\hat{A}_p$ ’ entre populações de tamanho amostral diferente foi utilizado o método de rarefação implementado no programa HP-RARE 1.1 (Kalinowski, 2005). O programa GENEPOP 4.0.10 (Rousset, 2008) foi utilizado para verificar se as populações se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (eHW), para calcular o desequilíbrio de ligação entre os locos e a ocorrência de isolamento genético entre as populações.



**Tabela III.** Descrição dos locos de microssatélite e seqüência dos “primers” utilizados em *Tetragonisca angustula*. CA: Condições de amplificação.

Loco	Tipo de repetição	Seqüências dos "primers" (5'-3')	CA
Tang03	(AG) <sub>11</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGGGAACATTTGTTGAAGGAATTTG R: GCTTCTGCCGCATTGGTTTTCTTAAT	1
Tang11	(GA) <sub>22</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGTATTCTATTACGCGATGC R: GCTTCTAGACGATATGGTGGCATTCA	2
Tang12	(GA) <sub>24</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGCCAGATGCAACCCTTTGACT R: GCTTCTAGGCCCATCGAAGACCAT	3
Tang17	(AG) <sub>23</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGGTAATGTGGAACGTCTACG R: GCTTCTGATAATCGCGCGAGTGGAG	2
Tang29	(GA) <sub>26</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGCGGTCCTGAAGTGCGGAATA R: GCTTCTCAGGAACGCGTAACCAACTT	*
Tang40	(TCAC) <sub>7</sub> TCAT(TC) <sub>14</sub> TGT(TCTTC) <sub>3</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGTACGTGACAACCTCCGAATG R: GCTTCTCGCCGCTAGTTCATATC	*
Tang48	(CT) <sub>13</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGTGACGGATAAAGAGAGGTTCGAG R: GCTTCTCTCTCGGATTCCTTGAGCTT	*
Tang57	(TC) <sub>5</sub> TT(TC) <sub>2</sub> TGTT(TC) <sub>18</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGGCCGATTTATGGCAACGATA R: GCTTCTTCGAATTTATAGTCTTCCGATTC	1
Tang60	(AG) <sub>27</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGGAGAAAACGATGAATGCCG R: GCTTCTTGAGAGAAGGCAAGTTGTTGA	2
Tang65	(AG) <sub>14</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGTGCTCGTTATAATTGCACCA R: GCTTCTCAGCTCAAGCCGTAAGATG	2
Tang68	(TC) <sub>10</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGTAACGGAGCCGAGGATACAG R: GCTTCTCGATGAAATCGTGGATGAAG	*
Tang70	(AG) <sub>10</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGGGTTAGGGCGGTTCGACTTAT R: GCTTCTTGTTCTCTCCGTTTTTCGAC	3
Tang77	(CT) <sub>16</sub> CC(CT) <sub>3</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGCGTTTGAACGATGAACTGGA R: GCTTCTCTATTTCGACGCTCTGTC	*
Tang78	(CT) <sub>23</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGCGAATACGATCTGCACTCCTC R: GCTTCTATTACGACGATACGCCACT	*
Tang79	(TC) <sub>21</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGCTAGGCCGGACGACAGATTC R: GCTTCTTGAAGTGTCTTCTATCGTCTG	*

1: MgCl<sub>2</sub>: 2,0 mM; 95°C/7min, 6× (94°C/30s, 59°C/30s, 72°C/30s), 6× (94°C/30s, 58.5°C/30s, 72°C/30s), 6× (94°C/30s, 57°C/30s, 72°C/30s), 6× (94°C/30s, 56.5°C/30s, 72°C/30s), 6× (94°C/30s, 56°C/30s, 72°C/30s), 6× (94°C/30s, 55.5°C/30s, 72°C/30s), 6× (94°C/30s, 55°C/30s, 72°C/30s), 72°C/5min, 4°C/∞;

2: MgCl<sub>2</sub>: 1,5 mM; 96°C/8min, 35× (94°C/30s, 48°C/60s, 72°C/60s), 72°C/10min, 25°C/∞;

3: MgCl<sub>2</sub>: 2,0 mM; 96°C/8min, 35x (94°C/30s, 53°C/60s, 72°C/60s), 72°C/10min, 25°C/∞;

\*: a ser definido.

**Tabela IV.** Descrição dos locos de microssatélite e seqüência dos “primers” utilizados em *Bombus morio*. CA: Condições de amplificação.

Loco	Tipo de repetição	Seqüências dos "primers" (5'-3')	CA
BL03	(AG) <sub>25</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGCGAAAATCAGGGGTGACAAAC R: GCTTCTCCTTTCTGTTTATAGTTCGTCGG	4
BL05	(TG) <sub>5</sub> TA(TG) <sub>9</sub> (TC) <sub>5</sub> TT(TC) <sub>9</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGCGTTCAACATTAGATGTAGAGTACC R: GCTTCTCGACACAAGTAATAAGATAGG	*
BL10	(CA) <sub>28</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGACGTCTGCACGCTCTCTTATG R: GCTTCTGGTCTCCGCAAATCCGATTC	5
BL15	(GT) <sub>19</sub> (GC) <sub>8</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGCGAACGAAAACGAAAAAGAGC R: GCTTCTCGAACGAAAACGAAAAAGAGC	*

BL16	(GT) <sub>14</sub> TGC(GT) <sub>7</sub> TGC (GT) <sub>6</sub> TGC(GT) <sub>6</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGCGTCCTCTCCAATGTGTGACTC R: GCTTCTGGATCGGTTTAACAACGAAGTC	4
B132	(CT) <sub>12</sub> TC(CT) <sub>3</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGGAAATTCGTGCGGAGGG R: GCTTCTCAGAGAACTACCTAGTGCTACGC	4
BT01	(GT) <sub>12</sub> GC(GT) <sub>5</sub> (GA) <sub>7</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGCCGATCTGTGAGAATGACAGTATCG R: GCTTCTCGTGTTCGATTAGCAAAGCTACG	4
BT02	(GT) <sub>10</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGAGGAACCGAGCGATAGAACCAC R: GCTTCTGCTTTGCCCTTCCATCTTGCTG	5
BT06	(TC) <sub>23</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGAGTCGTCGCTTTGGGATTC R: GCTTCTGAACTATCGGGCTCTGTTAGC	*
BT09	(TC) <sub>28</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGCAGTCGTCGGAAGTACGATCCG R: GCTTCTAACGTCGATTACCGTCACCGAG	5
BT15	(GA) <sub>20</sub> ...(GT) <sub>9</sub> GC(GT) <sub>5</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGACTTAGCCAGCCATCGCTAC R: GCTTCTCTCTCTTTCTCTCTCTTATACGC	5
BT16	(GA) <sub>10</sub> AA(GA) <sub>3</sub> GC(GA) <sub>9</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGCAGCCAAAAAATCAGTGGAGTGC R: GCTTCTTCTTCTCTGTTTCTCGTTCACG	4
BT20	(CT) <sub>21</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGTTCACAGCGTTTTTCTTAAGTC R: GCTTCTATGGACGGCGAGATCGTGAG	*
BT23	(CT) <sub>15</sub> GT(CT) <sub>6</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGGCAACAGAAAATCGTCGGTAGTG R: GCTTCTGCGGCAATAAAGCAATCGG	5
BT24	(TG) <sub>4</sub> ...(GT) <sub>4</sub> CT(GT) <sub>6</sub>	F: CCTGGCGACTCCTGGAGTCTTCCGTTTTTCCCCTG R: GCTTCTCACCCACTTACATACATACACGCTC	*

4: MgCl<sub>2</sub>: 3,0 mM; 96°C/8min, 35× (94°C/30s, 48°C/60s, 72°C/60s), 72°C/10min, 25°C/∞;

5: MgCl<sub>2</sub>: 2,0 mM; 96°C/8min, 30× (94°C/30s, 52°C/45s, 72°C/45s), 8× (94°C/30s, 48°C/45s, 72°C/45s), 72°C/10min, 25°C/∞;

\*: a ser definido.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. *Tetragonisca angustula*

Nessa primeira etapa do projeto 118 indivíduos foram genotipados para 8 locos microssatélites. No total foram encontrados 126 alelos diferentes (Tabela V). A maior frequência encontrada para um alelo foi de 0,521 (231, Tang70), o que indica que todos os locos foram polimórficos (frequência do alelo mais comum  $\geq 0,05$ ). Também é possível observar a grande quantidade de alelos raros, isto é, de frequência baixa.

**Tabela V.** Análise de 8 locos microssatélites em 118 indivíduos de *Tetragonisca angustula*. Os alelos e suas frequências são apresentados. T: tamanho do alelo em pares de bases; FA: frequência absoluta; FR: frequência relativa.

Loco	T	FA	FR	Loco	T	FA	FR	Loco	T	FA	FR
<b>Tang03</b>	<b>223</b>	113	0,483	<b>Tang17</b>	<b>146</b>	1	0,004	<b>Tang60</b>	<b>140</b>	15	0,064
	<b>225</b>	87	0,372		<b>148</b>	1	0,004		<b>142</b>	6	0,025
	<b>227</b>	22	0,094		<b>152</b>	1	0,004		<b>144</b>	8	0,034
	<b>229</b>	1	0,004		<b>156</b>	2	0,008		<b>146</b>	9	0,038
	<b>231</b>	10	0,043		<b>158</b>	8	0,034		<b>148</b>	5	0,021
	<b>233</b>	1	0,004		<b>160</b>	37	0,157		<b>150</b>	6	0,025
					<b>162</b>	5	0,021		<b>151</b>	1	0,004

<b>Tang11</b>	<b>156</b>	2	0,008		<b>166</b>	4	0,017		<b>152</b>	29	0,123
	<b>180</b>	2	0,008		<b>168</b>	86	0,364		<b>153</b>	1	0,004
	<b>184</b>	2	0,008		<b>170</b>	46	0,195		<b>154</b>	22	0,093
	<b>186</b>	53	0,225		<b>172</b>	12	0,051		<b>156</b>	54	0,229
	<b>188</b>	26	0,110		<b>174</b>	1	0,004		<b>158</b>	12	0,051
	<b>190</b>	21	0,089		<b>176</b>	11	0,047		<b>160</b>	13	0,055
	<b>192</b>	4	0,017		<b>178</b>	7	0,030		<b>161</b>	2	0,008
	<b>196</b>	11	0,047		<b>180</b>	10	0,042		<b>162</b>	14	0,059
	<b>198</b>	9	0,038		<b>182</b>	3	0,013		<b>164</b>	16	0,068
	<b>200</b>	20	0,085		<b>184</b>	1	0,004		<b>166</b>	6	0,025
	<b>202</b>	30	0,127						<b>168</b>	11	0,047
	<b>204</b>	20	0,085	<b>Tang57</b>	<b>132</b>	2	0,008		<b>172</b>	4	0,017
	<b>206</b>	12	0,051		<b>164</b>	57	0,242		<b>174</b>	2	0,008
	<b>208</b>	8	0,034		<b>166</b>	1	0,004				
	<b>210</b>	7	0,030		<b>186</b>	13	0,055	<b>Tang65</b>	<b>191</b>	2	0,008
	<b>212</b>	3	0,013		<b>188</b>	4	0,017		<b>195</b>	3	0,013
	<b>214</b>	2	0,008		<b>198</b>	12	0,051		<b>197</b>	33	0,140
	<b>222</b>	3	0,013		<b>200</b>	4	0,017		<b>199</b>	30	0,127
	<b>226</b>	1	0,004		<b>202</b>	35	0,148		<b>201</b>	4	0,017
					<b>204</b>	25	0,106		<b>203</b>	102	0,432
<b>Tang12</b>	<b>200</b>	4	0,017		<b>206</b>	24	0,102		<b>205</b>	2	0,008
	<b>202</b>	13	0,056		<b>208</b>	35	0,148		<b>209</b>	4	0,017
	<b>206</b>	1	0,004		<b>210</b>	15	0,064		<b>211</b>	1	0,004
	<b>208</b>	7	0,030		<b>212</b>	4	0,017		<b>217</b>	2	0,008
	<b>210</b>	43	0,184		<b>214</b>	3	0,013		<b>219</b>	2	0,008
	<b>211</b>	2	0,009		<b>220</b>	2	0,008		<b>221</b>	3	0,013
	<b>212</b>	7	0,030						<b>223</b>	6	0,025
	<b>214</b>	4	0,017	<b>Tang70</b>	<b>229</b>	66	0,280		<b>225</b>	10	0,042
	<b>216</b>	2	0,009		<b>231</b>	123	0,521		<b>227</b>	6	0,025
	<b>218</b>	8	0,034		<b>233</b>	42	0,178		<b>229</b>	11	0,047
	<b>222</b>	6	0,026		<b>235</b>	3	0,013		<b>231</b>	3	0,013
	<b>224</b>	17	0,073		<b>237</b>	2	0,008		<b>233</b>	4	0,017
	<b>226</b>	25	0,107						<b>235</b>	1	0,004
	<b>228</b>	28	0,120						<b>237</b>	2	0,008
	<b>230</b>	31	0,132						<b>239</b>	2	0,008
	<b>232</b>	20	0,085						<b>240</b>	1	0,004
	<b>234</b>	8	0,034						<b>241</b>	1	0,004
	<b>236</b>	4	0,017						<b>245</b>	1	0,004
	<b>238</b>	2	0,009								
	<b>240</b>	2	0,009								

Um resumo dos índices de diversidade genética para as amostras coletadas pode ser visualizado na Tabela VI. O número de alelos encontrado foi muito alto, variando de cinco (Tang70) a 24 (Tang65), com uma surpreendente média de 15,75. O loco Tang11 apresentou a maior de taxa de heterozigose observada (0,8475) enquanto que o loco Tang03, a menor (0,3761). Todos os locos apresentaram um número de heterozigotos menor do que o esperado segundo as proporções do 'eHW', o que é bem evidenciado pelos valores positivos de 'f'.

**Tabela VI.** Índices de diversidade genética em *Tetragonisca angustula*. N: número de indivíduos analisados; Na: número de alelos; Ho: taxa de heterozigose observada; He: taxa de heterozigose esperada; f: índice de Fixação; EP: erro-padrão.

	Tang03	Tang11	Tang12	Tang17	Tang57	Tang60	Tang65	Tang70	Média	EP
N	117	118	117	118	118	118	118	118	117,750	0,164
Na	6	19	20	17	15	20	24	5	15,750	2,418
Ho	0,376	0,847	0,769	0,542	0,636	0,822	0,475	0,525	0,624	0,061
He	0,618	0,890	0,901	0,795	0,865	0,898	0,770	0,618	0,795	0,042
f	0,391	0,048	0,147	0,318	0,265	0,085	0,384	0,150	0,223	0,047

Cálculos de análise populacional só foram realizados para os pontos amostrais com 10 ou mais indivíduos coletados, como Céu Azul (PR), Teodoro Sampaio (SP), Teresópolis/Petrópolis (RJ) e Ilha Grande (RJ), cujos tamanhos amostrais foram de 30, 10, 18 e 42, respectivamente.

Primeiramente foram realizados testes exatos para verificar se essas populações se encontravam em ‘eHW’ e se os oito locos estavam em desequilíbrio de ligação. Os resultados mostraram que as populações de Céu Azul (PR) e de Teodoro Sampaio (SP) não estavam em ‘eHW’ ( $P = 0$ ). Desequilíbrio de ligação ( $P < 0,05$ ) foi verificado para os pares de locos Tang11/Tang12, Tang03/Tang17, Tang12/Tang57, Tang11/Tang60, Tang57/Tang60, Tang12/Tang65 e Tang03/Tang70. Como consequência, os dados provenientes dos locos Tang03, Tang12 e Tang60 não foram utilizados nos cálculos posteriores.

Testes exatos de diferenciação entre as populações foram realizados com base na distribuição genotípica de cinco locos, visto que ‘eHW’ nas populações é uma premissa dos cálculos de diferenciação alélica (Weir, 1996). Os resultados mostram que as quatro populações estão diferenciadas geneticamente ( $P = 0$ ).

Na comparação da diversidade genética entre as populações (Tabela VII) é possível observar que, embora apresente o maior número de indivíduos analisados, a população de Ilha Grande (RJ) apresentou a menor riqueza alélica ( $5,4 \pm 1,5$ ). Após a aplicação do método de rarefação, que padronizou as amostras das populações para 10 indivíduos, a população do Parque Estadual dos Três Picos (RJ) apresentou a maior riqueza alélica (7,6). Em números absolutos, o maior número médio de alelos privados por loco foi encontrado no Parque Nacional do Iguaçu, PR ( $3,2 \pm 2,2$ ).

Todavia, após a aplicação do método de rarefação, o maior valor foi encontrado novamente na população de Teresópolis/Petrópolis (2,69). O número de alelos efetivos, que é o número de alelos igualmente frequentes necessário para se atingir o valor determinado de 'He', também foi menor na população de Ilha Grande (3,5 ± 1,0) e maior na de Teresópolis/Petrópolis (5,5 ± 1,3). As quatro populações apresentaram altos valores de 'He', embora 'Ho' só tenha sido muito alto na população de Teresópolis/Petrópolis (0,800 ± 0,063). Os valores positivos de 'f' nas populações de Céu Azul e Teodoro Sampaio são um indicio de que o desvio do 'eHW' se deva a um excesso de homozigotos. Finalizando, de acordo com nossos dados a população de Teresópolis/Petrópolis foi a que apresentou maior variabilidade genética, enquanto que Ilha Grande, a menor.

**Tabela VII.** Índices de diversidade genética em quatro populações de *Tetragonisca angustula*: Céu Azul, PR (1), Teresópolis/Petrópolis (2); Teodoro Sampaio (3) e Ilha Grande (4). N: número de indivíduos analisados; Â: riqueza alélica; Â10: riqueza alélica corrigida pelo método de rarefação para 10 indivíduos; Âp: Número médio de alelos privados por loco; Âp10: Número médio de alelos privados por loco corrigido pelo método de rarefação para 10 indivíduos; Ne: Número efetivo de alelos; PLP: porcentagem de locos polimórficos (95% de critério); Ho: taxa de heterozigose observada; He: taxa de heterozigose esperada. f: índice de Fixação.

	1	2	3	4
N	30	10	18	42
Â	9,8 ± 2,7	7,6 ± 1,7	8,4 ± 1,2	5,4 ± 1,5
Â10	6,2	7,6	6,96	4,29
Âp	3,2 ± 2,2	1,8 ± 0,6	1,6 ± 0,6	0,2 ± 0,2
Âp10	2,11	2,69	1,74	0,39
Ne	4,2 ± 1,9	5,5 ± 1,3	4,9 ± 0,6	3,5 ± 1,0
PLP	100	100	100	100
Ho	0,533 ± 0,092	0,800 ± 0,063	0,544 ± 0,102	0,652 ± 0,098
He	0,619 ± 0,095	0,775 ± 0,046	0,784 ± 0,027	0,622 ± 0,087
f	0,133 ± 0,122	-0,030 ± 0,033	0,311 ± 0,118	-0,040 ± 0,031

#### 4.2. *Bombus morio*

Para as abelhas dessa espécie, 10 locos microssatélites foram analisados em 34 indivíduos. Oito locos apresentaram-se polimórficos e dois monomórficos (BL10 e BT09). No total 68 alelos diferentes foram encontrados (Tabela VIII). Com exceção do loco BT16, os outros locos polimórficos apresentaram poucos alelos frequentes e muitos alelos raros, assim como encontrado em *T. angustula*. Contudo, até o momento, cerca de 13% dos genótipos ainda não puderam ser determinados.

**Tabela VIII.** Análise de 10 locos microssatélites em 34 indivíduos de *Bombus morio*. Os alelos e suas frequências são apresentados. T: tamanho do alelo em pares de bases; FA: frequência absoluta; FR: frequência relativa.

Loco	T	FA	FR	Loco	T	FA	FR	Loco	T	FA	FR
<b>BL03</b>	<b>157</b>	39	0,591	<b>BT01</b>	<b>165</b>	4	0,063	<b>BT16</b>	<b>141</b>	2	0,033
	<b>159</b>	12	0,182		<b>170</b>	20	0,313		<b>143</b>	1	0,017
	<b>161</b>	7	0,106		<b>172</b>	10	0,156		<b>145</b>	1	0,017
	<b>163</b>	1	0,015		<b>174</b>	15	0,234		<b>154</b>	1	0,017
	<b>165</b>	2	0,030		<b>176</b>	8	0,125		<b>156</b>	1	0,017
	<b>167</b>	1	0,015		<b>180</b>	2	0,031		<b>158</b>	2	0,033
	<b>169</b>	4	0,061		<b>186</b>	3	0,047		<b>160</b>	8	0,133
					<b>190</b>	2	0,031		<b>162</b>	5	0,083
<b>BL10</b>	<b>125</b>	26	1,000						<b>166</b>	2	0,033
				<b>BT02</b>	<b>151</b>	4	0,063		<b>168</b>	8	0,133
<b>BL16</b>	<b>122</b>	51	0,750		<b>153</b>	60	0,938		<b>170</b>	3	0,050
	<b>124</b>	13	0,191						<b>172</b>	2	0,033
	<b>132</b>	1	0,015	<b>BT09</b>	<b>130</b>	56	1,000		<b>174</b>	1	0,017
	<b>134</b>	1	0,015						<b>176</b>	5	0,083
	<b>136</b>	2	0,029	<b>BT15</b>	<b>126</b>	1	0,016		<b>178</b>	1	0,017
					<b>128</b>	2	0,031		<b>181</b>	4	0,067
<b>B132</b>	<b>167</b>	4	0,059		<b>130</b>	2	0,031		<b>183</b>	3	0,050
	<b>169</b>	55	0,809		<b>132</b>	13	0,203		<b>185</b>	2	0,033
	<b>171</b>	4	0,059		<b>134</b>	19	0,297		<b>187</b>	4	0,067
	<b>173</b>	1	0,015		<b>136</b>	12	0,188		<b>189</b>	1	0,017
	<b>177</b>	3	0,044		<b>138</b>	5	0,078		<b>191</b>	2	0,033
	<b>195</b>	1	0,015		<b>140</b>	7	0,109		<b>193</b>	1	0,017
					<b>142</b>	1	0,016				
					<b>143</b>	1	0,016	<b>BT23</b>	<b>177</b>	1	0,017
					<b>145</b>	1	0,016		<b>179</b>	3	0,052
									<b>185</b>	12	0,207
									<b>191</b>	40	0,690
									<b>195</b>	2	0,034

A Tabela IX mostra o resumo dos índices de diversidade genética determinados para as amostras de *B. morio*. O número de alelos variou de um (BL10 e BT09) a 22 (BT16) com uma média de 6,8. Os locos que apresentaram o menor e o maior número de alelos também apresentaram a menor e a maior taxa de heterozigose observada, respectivamente (0,0000 a 0,7000). Assim como em *T. angustula*, todos os locos apresentaram uma taxa de heterozigose observada menor do que a esperada; e os valores positivos de 'f' indicam um excesso de homozigotos para esses locos. Quando comparado com *T. angustula*, observa-se que *B. morio* apresentou menores valores de diversidade genética. Contudo, pode-se argumentar que essa diferença é resultado do menor tamanho amostral ou até mesmo do uso de "primers" heteroespecíficos (Pépin *et al.*, 1995; Francisco *et al.*, 2006).

**Tabela IX.** Índices de diversidade genética em *Bombus morio*. N: número de indivíduos analisados; Na: número de alelos; Ho: taxa de heterozigose observada; He: taxa de heterozigose esperada; f: índice de Fixação; EP: erro-padrão.

	BL03	BL10	BL16	B132	BT01	BT02	BT09	BT15	BT16	BT23	Média	SE
N	33	13	34	34	32	32	28	32	30	29	29,700	1,961
Na	7	1	5	6	8	2	1	11	22	5	6,800	1,965
Ho	0,455	0,000	0,382	0,294	0,594	0,000	0,000	0,438	0,700	0,345	0,321	0,079
He	0,601	0,000	0,400	0,337	0,799	0,117	0,000	0,814	0,928	0,477	0,447	0,107
f	0,244	-	0,043	0,126	0,257	1,000	-	0,463	0,246	0,278	0,332	0,094

Cálculos de diferenciação genética entre pares de populações só foram realizadas nos pontos amostrais com 5 ou mais indivíduos: Céu Azul (PR), Apiaí (SP) e Ilha Grande (RJ), cujos tamanhos amostrais foram de 6, 5 e 12, respectivamente.

Testes exatos mostraram que a população de Céu Azul foi a única que estava em ‘eHW’ ( $P = 0,3655$ ), e que os 10 locos não apresentavam desequilíbrio de ligação ( $P > 0,2678$ ). Contudo, os dados do loco BL10 não serão considerados nas análises populacionais pelo fato da maioria dos indivíduos ainda não terem sido genotipados.

Os cálculos para diferenciação das populações foram feitos com base na distribuição genotípica. Os resultados mostram diferenciação genética apenas entre as populações Apiaí × Ilha Grande ( $P = 0,0001$ ). Entretanto, ao contrário do observado para *T. angustula*, pode-se dizer que as abelhas *B. morio* da Ilha Grande não estão geneticamente isoladas, visto a não diferenciação entre essas e as de Céu Azul.

Os índices de diversidade genética comparativos (Tabela X) mostram uma riqueza alélica maior na população de Ilha Grande ( $4,333 \pm 1,202$ ). Tal fato deve ser devido ao seu maior número amostral, visto que para ‘ $\hat{A}_3$ ’, a população de Apiaí apresentou o maior valor de riqueza alélica (3,18). O método de rarefação foi utilizado para corrigir o número amostral das populações em 3, visto que esse foi o número de indivíduos genotipados para o loco BT15 na população do Apiaí. Essa população também apresentou os maiores valores de ‘ $\hat{A}_p$ ’ ( $1,556 \pm 0,444$ ), ‘ $\hat{A}_p3$ ’ (1,44), ‘ $N_e$ ’ ( $3,108 \pm 0,505$ ), ‘PLP’ (88,89), ‘ $H_o$ ’ ( $0,370 \pm 0,118$ ) e ‘ $H_e$ ’ ( $0,593 \pm 0,082$ ). Como já mencionado anteriormente, a diversidade genética da espécie como um todo foi baixa. E nossos resultados até agora não mostraram que a população insular de *B. morio* tenha uma variabilidade menor do que as populações continentais, embora seja necessário aumentar o número de populações analisadas.

**Tabela X.** Índices de diversidade genética em três populações de *Bombus morio*: Céu Azul, PR (1), Apiaí, SP (2) e Ilha Grande (3). N: número de indivíduos analisados;  $\hat{A}$ : riqueza alélica;  $\hat{A}_{10}$ : riqueza alélica corrigida pelo método de rarefação para 3 indivíduos;  $\hat{A}_p$ : Número médio de alelos privados por loco;  $\hat{A}_{p3}$ : Número médio de alelos privados por loco corrigido pelo método de rarefação para 3 indivíduos; Ne: Número efetivo de alelos; PLP: porcentagem de locos polimórficos (95% de critério); Ho: taxa de heterozigose observada; He: taxa de heterozigose esperada. f: índice de Fixação.

	1	2	3
N	5,444 ± 0,176	4,444 ± 0,242	11,444 ± 0,338
$\hat{A}$	3,333 ± 0,764	3,778 ± 0,596	4,333 ± 1,202
$\hat{A}_3$	2,52	3,18	2,54
$\hat{A}_p$	0,667 ± 0,441	1,556 ± 0,444	1,556 ± 0,868
$\hat{A}_{p3}$	0,69	1,44	0,81
Ne	2,556 ± 0,695	3,108 ± 0,505	2,728 ± 0,747
PLP	77,78	88,89	77,78
Ho	0,348 ± 0,093	0,370 ± 0,118	0,353 ± 0,076
He	0,392 ± 0,113	0,593 ± 0,082	0,420 ± 0,110
f	0,043 ± 0,060	0,427 ± 0,143	0,063 ± 0,081

## 5. CONCLUSÕES PRELIMINARES

Apesar de *T. angustula* ser muito comum em áreas urbanizadas, nossos dados estão indicando ausência de fluxo gênico entre as populações dos fragmentos. Apesar disso, esses fragmentos possuem um tamanho que parece ser suficiente para a manutenção de um alto polimorfismo genético. Com capacidade de voo limitada, essas abelhas não estão conseguindo vencer a distância de 2 km que separa a Ilha Grande do continente. Além disso, o tamanho da ilha (16.960 ha) parece não ser grande o suficiente para a manutenção de um polimorfismo tão alto quanto nos fragmentos continentais.

*Bombus morio* é uma espécie com maior capacidade de voo e nossos dados sugerem que essas abelhas conseguem voar da Ilha Grande para o continente. Talvez por esse motivo a variabilidade genética da população insular não seja menor do que o encontrado em um fragmento no continente. Todavia, a interpretação desse resultado deve ser feita com cuidado pois ainda é necessário coletar em outros pontos amostrais. Além disso, ainda há uma probabilidade de que a utilização de “primers” de microssatélites heterospecíficos podem não indicar a real variabilidade da população e/ou espécie.



## 6. PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Atividades	2010		2011	
	1º sem.	2º sem.	1º sem.	2º sem.
Coleta de espécimes no campo				
Extração de DNA das amostras coletadas				
Amplificação via PCR do DNAm <sub>t</sub>				
Seqüenciamento de regiões do DNAm <sub>t</sub>				
Amplificação dos locos de microssatélite				
Eletroforese dos locos de microssatélite				
Utilização de programas para análise de dados				
Redação da tese				
Defesa da tese				

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aljanabi, S.M. e Martinez, I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* **25**: 4692-4693.

Ângelo S. (1989) *Ilhas do litoral paulista*. São Paulo: Série documentos – SMA.

Attenborough D. (1988) *The living planet, a portrait of the Earth*. 4. ed. William Collins Sons & Co LTD/BBC Books. London.

Avise J.C.; Arnold J.; Ball R.M.; Bermingham E.; Lamb T.; Neigel J.E.; Reeb C.A. e Saunders N.C. (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 489-522.

Beaumont M.A. e Bruford M.W. (1999) Microsatellites in conservation genetics. “In” *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds. D.B. Goldstein e C. Schlötterer), pp. 165-182, Oxford University Press, New York.

Beebe T.J.C. e Rowe G. (2004) *An Introduction to Molecular Ecology*. Oxford University Press, Oxford.

- Brito, R.M.; Francisco, F.O.; Domingues-Yamada, A.M.T.; Gonçalves, P.H.P.; Pioker, F.C.; Soares, A.E.E. e Arias, M.C. (2009) Characterization of microsatellite loci of *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Conservation Genetics Resources* DOI: 10.1007/s12686-009-9045-4.
- Brown W.M. (1985) The mitochondrial genome of animals. "In" *Molecular Evolutionary Genetics* (ed. R.J. MacIntyre), pp. 95-130, Plenus Press, New York.
- Chakraborty R. e Kimmel M. (1999) Statistics of microsatellite loci: estimation of mutation rate and pattern of population expansion. "In" *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds. D.B. Goldstein e C. Schlötterer), pp. 139-150, Oxford University Press, New York.
- Connor E.F. e McCoy E.D. (1979) The statistics and biology of the species-area relationship. *American Naturalist* **113**: 791-833.
- Cox C.B.; Healey I.N. e Moore P.D. (1976) *Biogeography, an Ecological and Evolutionary Approach*. Blackwell Scientific Publ., Oxford.
- Diamond J.M. (1976) Island biogeography and conservation: strategy and limitations. *Science* **193**: 1027-1029.
- Estoup A.; Tailliez C.; Cornuet J.-M. e Solignac M. (1995) Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Molecular Biology and Evolution* **12**: 1074-1084.
- Estoup A.; Solignac M.; Cornuet J.-M; Goudet J. e Scholl A. (1996) Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. *Molecular Ecology* **5**: 19-31.
- Funk C.R.; Schmid-Hempel R. e Schmid-Hempel P. (2006) Microsatellite loci for *Bombus* spp.. *Molecular Ecology Notes* **6**: 83-86.
- Galindo-Leal C. e Câmara I.G. (2005) *Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas*. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo.

- Hancock J.M. (1999) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. "In" *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds. D.B. Goldstein e C. Schlötterer), pp. 1-9, Oxford University Press, New York.
- Harrison R.G. (1989) Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution* **4**: 6-11.
- Kalinowski, S.T. (2005) HP-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes* **5**: 187-189.
- Kerr W.E.; Carvalho G.A. e Nascimento V.A. (1996) *Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação*. Fundação Acangaú, Belo Horizonte.
- Lawton J.H. e May R.M. (1995) *Extinction Rates*. Oxford University Press, Oxford.
- MacArthur R.H. e Wilson E.O. (1963) An equilibrium theory of insular zoogeography. *Evolution* **17**: 373-387.
- Martin L.; Suguio K. e Flexor J.-M. (1987) Flutuações do nível relativo do mar no quaternário e seu papel na sedimentação costeira: exemplos brasileiros. *Publicações da Academia de Ciências do Estado de São Paulo* **54**: 40-61.
- Moritz C. e Hillis D.M. (1996) Molecular systematics: context and controversies. "In" *Molecular Systematics*. 2nd edition (eds. D.M. Hillis; C. Moritz e B.K. Mable), pp. 1-13, Sinauer Associates, Massachusetts.
- Moritz C.; Dowling T.E. e Brown W.M. (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 269-292.
- Myers N.; Mittermeier R.A.; Mittermeier C.G.; Fonseca G.A.B. e Kent J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**: 853-858.
- Peakall R. e Smouse P.E. (2006) Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**: 288-295.

- Rousset F. (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**:103-106.
- Sampaio P.D. (1997) Florística e estrutura de floresta atlântica secundária - Reserva Biológica Estadual da Praia do Sul, Ilha Grande, RJ. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo.
- Schuelke M. (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* **18**: 233-234.
- Strassmann J.E.; Solís C.R.; Peters J.M. e Queller D.C. (1996) Strategies for finding and using highly polymorphic DNA microsatellite loci for studies of genetic relatedness and pedigrees. "In" *Molecular Methods in Zoology and Evolution* (eds. J.D. Ferraris e S.R. Palumbi), pp. 163-178, 528-549, Wiley-Liss, New York.
- Vanzolini P.E. (1973) Distribution and differentiation animals of along the coast and in continental islands in the state of São Paulo. 1. An introduction to the problems. *Papéis Avulsos de Zoologia* **26**: 281-294.
- Vieitas C.F. (1995) Análise ambiental das ilhas da região de Ubatuba (SP), e proposta de manejo para a Ilha do Mar Virado. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo.
- Weir, B.S. (1996) Intraspecific differentiation. "In" *Molecular Systematics*. 2nd edition (Eds. D.M. Hillis, C. Moritz e B.K. Mable), pp. 385-405, Sinauer Associates, Massachusetts.
- Williamson M. (1981) *Island populations*. Oxford University Press, Oxford.
- Wilson A.C.; Cann R.L.; George S.M.; Gyllensten U.B.; Helm-Bychowski K.M.; Higuchi R.G.; Palumbi S.R.; Prager E.M.; Sage R.D. e Stoneking M. (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* **26**: 375-400.