



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

ALINE PRISCILA FÉLIX

**EFEITOS DA FRAGMENTAÇÃO DA RESTINGA NA ESTRUTURA
GENÉTICA POPULACIONAL DE *DICHOTOMIUS SCHIFFLERI* E SUAS
IMPLICAÇÕES PARA CONSERVAÇÃO**

Recife
2020

ALINE PRISCILA FÉLIX

**EFEITOS DA FRAGMENTAÇÃO DA RESTINGA NA ESTRUTURA
GENÉTICA POPULACIONAL DE *DICHOTOMIUS SCHIFFLERI* E SUAS
IMPLICAÇÕES PARA CONSERVAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rita de Cássia de Moura

Coorientador: Prof. Dr. Geyner Alves dos Santos Cruz

Recife

2020

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Félix, Aline Priscila

Efeitos da fragmentação da restinga na estrutura genética populacional de *Dichotomius schiffleri* e suas implicações para conservação / Aline Priscila Félix. - 2020.

64 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia de Moura.

Coorientador: Prof. Dr. Geyner Alves dos Santos Cruz.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2020. Inclui referências.

1. Coleóptero. 2. Besouros. 3. Genética de populações. I. Moura, Rita de Cássia de (orientadora). II. Cruz, Geyner Alves dos Santos (coorientador). III. Título.

595.76

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020 -112

Aline Priscila Félix

**Efeitos da fragmentação da restinga na estrutura genética
populacional de *Dichotomius schiffleri* e suas implicações para
conservação**

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora:

Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Maria Raquel Moura Coimbra
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Vilma Loreto da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Recife
2020

À minha fonte de inspiração para buscar o conhecimento, meus pais.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Rita de Moura, minha orientadora, pelo seu empenho e dedicação na orientação, além da sua presteza em todos os detalhes das demandas que surgiram durante este período.

Ao Prof. Dr. Geyner Alves, meu coorientador, por sua valiosa contribuição no desenvolvimento deste trabalho e por estar sempre à disposição.

Ao Dr. Igor Amorim, por sua contribuição neste trabalho, além da sua amizade e conselhos que foram muito importantes para mim nesta fase.

À Giuliene Medeiros, pelas contribuições no trabalho com a realização de experimentos e por me ensinar que ouvir uma música é a melhor forma de iniciar o dia de trabalho.

À Prof^a Dra. Raquel Coimbra da Universidade Federal Rural de Pernambuco, por disponibilizar equipamentos e insumos para sequenciamento de um conjunto de amostras. E ao seu aluno, Gênisson Silva, pela ajuda na realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Fernando Silva da Universidade Federal do Pará, pela análise morfológica dos espécimes utilizados neste trabalho, para confirmação da identificação da espécie.

Aos amigos, Dra. Crislaine Xavier, Felipe Amorim e Josival Francisco, pela contribuição na coleta do material biológico e pela ótima companhia após os dias longos de trabalho.

A todos do Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos (LBGI), ICB–UPE, Dra. Adriana Melo, Dra. Crislaine Xavier, Bruna Monteiro, Bruno Pereira, Catarine Mello, Josival Francisco, Júlio Henrique, Liliane Lopes, Nicolas Oliveira, Nina Dietz e Tarcio Tomé, pelos bons momentos de convivência e aprendizagem.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pelo financiamento da bolsa de pós-graduação (IBPG–05472.02/18), equipamentos e insumos utilizados nesta pesquisa.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, pela contribuição na minha formação acadêmica.

E por último, o mais importante. Agradeço especialmente aos meus familiares, pois sem eles esta etapa da minha jornada acadêmica não seria possível.

Aos meus pais, Marlene Simplício e José Félix, a quem sou eternamente grata por me apoiarem em todos os momentos.

Aos meus irmãos, por terem compartilhado este momento comigo e por trazerem leveza aos dias mais cansativos.

À Everton Paiva, por ouvir meu discurso animado com ideias novas sobre o trabalho e também minhas reclamações. Por me retirar do trabalho para descansar e por lembrar a hora de voltar. Pela sua disponibilidade em todos os momentos, além da sua contribuição com este trabalho.

À todos, muito obrigada.

“Tornemos nosso mundo significativo com a coragem de nossas perguntas e a profundidade de nossas respostas”.

(Carl Sagan, 1980)

RESUMO

Dichotomius schiffleri é uma espécie de besouro ameaçada de extinção devido a sua distribuição restrita. Além disso, apresenta especificidade à restinga, a qual encontra-se amplamente fragmentada e modificada. A caracterização da estrutura e diversidade genética de populações remanescentes de *D. schiffleri*, contribuirá na avaliação do seu *status* de conservação. Espécimes dos municípios de Ipojuca-PE, Maraú-BA, Santa Cruz de Cabralia-BA e Vila Velha-ES foram analisados utilizando os marcadores ISSR e DNAm (COI e 16S). As análises foram realizadas através do cálculo de índices de diversidade genética, Φ_{ST} , clusterização genética, AMOVA, modelos populacionais e árvore de distância genética. Além disso, foi feita análise de *mismatch distribution*, testes de neutralidade e rede de haplótipos. Os resultados para o ISSR e DNAm foram similares, ambos marcadores demonstraram níveis semelhantes de diversidade genética quando comparados à espécies próximas, sugerindo que as alterações no ambiente não influenciaram nos níveis de diversidade genética de *D. schiffleri*. Foi observado também que as populações estão sob influência de seleção purificadora, sendo sugerido relação com enchentes periódicas que diminuem temporalmente o tamanho das populações de *D. schiffleri*. Os dados também indicaram diferenciação genética entre todas as populações, que provavelmente está relacionada com a descontinuidade da restinga apresentando assim isolamento por distância. Desse modo, é sugerido o delineamento de quatro unidades de manejo distintas para fins de conservação da espécie.

Palavras-chave: Diversidade genética. fragmentação de habitat. status de conservação.

ABSTRACT

Dichotomius schiffleri is an endangered species of beetle due to its restricted distribution. Moreover, it presents specificity to the coastal sandy–dune vegetation (restinga), which is widely fragmented and altered. The characterization of the structure and genetic diversity of *D. schiffleri* remnant populations will contribute to the evaluation of their conservation status. Specimens from the cities of Ipojuca–PE, Maraú–BA, Santa Cruz de Cabralia–BA and Vila Velha–ES were analyzed using the ISSR and DNAmT markers (COI and 16S). The analyzes consisted of calculating genetic diversity indices, Φ_{ST} , genetic clustering, AMOVA, population models and genetic distance tree. In addition, mismatch distribution analysis, neutrality tests and haplotype network were performed. Results for ISSR and mtDNA were similar both markers had similar levels of genetic diversity when compared to closed species, suggesting that changes in the environment did not affected *D. schiffleri* genetic diversity levels. It was also observed that the populations are under the influence of purifying selection, likely related with periodic floods that temporarily decrease the size of *D. schiffleri* populations. The data also indicated genetic differentiation among all populations that is probably related to the restinga discontinuity thus presenting isolation by distance. Therefore, four management units are suggested for the species conservation.

Key words: genetic diversity. habitat fragmentation. conservation status.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Características morfológicas gerais de espécime macho de <i>Dichotomius schiffleri</i>	21
Figura 2 –	Mapa de parte do litoral do Brasil com distribuição das populações amostradas de <i>Dichotomius schiffleri</i> em remanescentes de restinga nos estados de Pernambuco (PE), Bahia (BA) e Espírito Santo (ES).....	29
Figura 3 –	Coleta de espécimes de <i>Dichotomius schiffleri</i> com a utilização de armadilhas <i>pitfall</i>	30
Figura 4 –	Inferência de clusterização bayesiana, com base em ISSR, nas populações de Ipojuca (IPJ), Maraú (MRU), Santa Cruz de Cabralia (SCC) e Vila Velha (VLV).....	40
Figura 5 –	Árvore de distância genética baseada em ISSR e método de Neighbor–Net, com representação dos 80 indivíduos das populações Ipojuca (IPJ), Maraú (MRU), Santa Cruz de Cabralia (SCC) e Vila Velha (VLV) distribuídos em quatro agrupamentos.....	41
Figura 6 –	Distribuição de diferenças par a par das sequências concatenadas do DNAm (COI e 16S)	44
Figura 7 –	Distribuição dos valores de Φ_{ST} par a par entre as populações de Ipojuca–IPJ, Maraú–MRU, Santa Cruz de Cabralia–SCC e Vila Velha–VLV.....	45
Figura 8 –	Rede de haplótipos com base no DNAm (COI e 16S), com quatro haplogrupos que correspondem a cada uma das quatro populações de Ipojuca–IPJ, Maraú–MRU, Santa Cruz de Cabralia–SCC e Vila Velha–VLV.....	46
Figura 9 –	Rede de haplótipos para as populações de Ipojuca – IPJ, Maraú – MRU, Santa Cruz de Cabralia – SCC e Vila Velha – VLV, com base no DNAm.....	47
Figura 10 –	Atribuição de clusters genéticos nas populações de Ipojuca–IPJ, Maraú–MRU, Santa Cruz de Cabralia–SCC e Vila Velha–VLV, com base no DNAm.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Populações amostradas com localização, estado de conservação, tamanho e número de indivíduos analisados para os marcadores ISSR e dos genes COI e 16S do DNAm ^t	31
Tabela 2 – Conjunto de 25 primers de ISSR testados quanto a diferentes parâmetros de polimorfismo.....	37
Tabela 3 – Índices de diversidade genética por população baseados em ISSR.....	38
Tabela 4 – Distâncias genéticas do Φ_{ST} par a par (abaixo da diagonal) e distâncias geográficas em km (acima da diagonal) por pares de populações.....	39
Tabela 5 – Parâmetros estatísticos obtidos para os quatro modelos populacionais analisados com base nos dados de ISSR.....	39
Tabela 6 – Índices de diversidade genética e testes de neutralidade por população com base nas sequências concatenadas do DNAm ^t (COI e 16S)	42
Tabela 7 – Índices de diversidade genética e testes de neutralidade por população com base no DNAm ^t (COI e 16S)	43
Tabela 8 – Análise de Variância Molecular (AMOVA) nas populações de <i>D. schiffleri</i> categorizados pela sequência analisada.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Θ	<i>Theta</i> – índice de diferenciação genética
Π	<i>Pi</i> – Diversidade nucleotídica
Φ_{ST}	Índice de distância genética molecular
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados
AMOVA	Análise de Variância Molecular
BA	Bahia
BAPS	<i>Bayesian Analysis of Population Structure</i> – Análise Bayesiana de Estrutura Populacional
COI	Citocromo C Oxidase Subunidade I
COII	Citocromo C Oxidase Subunidade II
CytB	Citocromo B
Dbar	Média a posteriori do desvio
Dg	Diversidade genética
DIC	<i>Deviance Information Criterion</i> – Critério de Informação de Desvio
DNAmt	DNA mitocondrial
dNTP	<i>2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate</i>
ES	Espírito Santo
F	Análogo do coeficiente de endogamia
F_{IS}	Coeficiente de endogamia
F_{IT}	Coeficiente de endogamia total
FP	Frequência polimórfica
F_{ST}	<i>Fixation index</i> – Índice de fixação

G'_{ST}	Coeficiente de divergência genética entre populações com mensuração de desequilíbrio de ligação
G_{ST}	Coeficiente de divergência genética entre populações
G_{ST-B}	Coeficiente bayesiano de divergência genética entre populações
Hap	Número de haplótipos
Hd	Diversidade haplotípica
H _E	Heterozigosidade esperada
H _O	Heterozigosidade observada
H _s	Heterozigosidade subpopulacional
H _T	Heterozigosidade total
IBD	Isolamento por distância
IBL	Isolamento por limitação de dispersão
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IPJ	Ipojuca
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeat</i> – Sequências Entre Repetições Únicas
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature's</i> – União Internacional para Conservação da Natureza
K	Número de <i>cluster</i> genético
MI	<i>Marker Index</i> – Índice marcador
MRU	Maraú
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> – Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
Nad4	NADH dehydrogenase subunidade 4
Nad5	NADH dehydrogenase subunidade 5

Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Pernambuco
PIC	<i>Polymorphism Information Content</i> – Conteúdo de Informação de Polimorfismo
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> – Polimorfismo do DNA Amplificado Aleatório
RNase	Ribonuclease
RP	<i>Resolution Power</i> – Poder de resolução
RPPN	Reserva Particular do Patrimônio Natural
SCC	Santa Cruz de Cabralia
SRAP	<i>Sequence-Related Amplified Polymorphism</i> – Polimorfismo Amplificado Relacionado a Sequência
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i> – Repetição de Sequência Simples
TL	Número total de <i>loci</i>
TLM	Número total de <i>loci</i> monomórficos
TLP	Número total de <i>loci</i> polimórficos
VLV	Vila Velha

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	OBJETIVOS.....	19
1.1.1	Objetivo Geral.....	19
1.1.2	Objetivos Específicos.....	19
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1	ASPECTOS ECOLÓGICOS E TAXONÔMICOS DA FAMÍLIA SCARABAEIDAE E GÊNERO DICHOTOMIUS HOPE, 1838.....	20
2.1.1	<i>Dichotomius schiffleri</i> Vaz-de-Mello, Louzada e Gavino, 2001.....	21
2.2	FLORESTAS COSTEIRAS DA MATA ATLÂNTICA E SEU STATUS DE CONSERVAÇÃO.....	22
2.3	DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL.....	24
2.3.1	Marcadores ISSR no estudo da diversidade e estrutura genética populacional em insetos.....	26
2.3.2	DNAmT na análise da diversidade e estrutura genética populacional em insetos.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	AMOSTRAGEM E ISOLAMENTO DE DNA.....	30
3.2	AMPLIFICAÇÃO DOS MARCADORES ISSR E DO DNAMT (COI E 16S)	31
3.2.1	Seleção e aplicação dos primers de ISSR.....	31
3.2.2	Sequenciamento e tratamento das sequências do COI e 16S.....	32
3.3	DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL POR ISSR.....	33
3.4	DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL POR GENES COI E 16S.....	34

4	RESULTADOS.....	36
4.1	SELEÇÃO DE PRIMERS DE ISSR.....	36
4.2	DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL PELO MARCADOR ISSR.....	37
4.3	DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL POR DNAMT.....	41
5	DISCUSSÃO.....	49
5.1	DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL.....	59
5.2	IMPLICAÇÕES PARA CONSERVAÇÃO.....	52
6	CONCLUSÕES.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

O besouro *Dichotomius schiffleri* é uma espécie classificada como em Perigo de Extinção pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature's* – União Internacional para Conservação da Natureza), sendo esse *status* definido com base em parâmetros ecológicos como distribuição geográfica e área de ocupação.

Esta espécie ocorre nos estados de Pernambuco, Bahia e Espírito Santo localizados na costa do Brasil, habitando predominantemente florestas costeiras da Mata atlântica, conhecidas como restinga. A restinga é um ambiente de condições adversas para o estabelecimento de escarabeíneos devido ao solo arenoso que afeta a capacidade desses animais de cavar e manter túneis para nidificação. Ainda assim, *D. schiffleri* é abundante e geralmente dominante na comunidade de escarabeíneos mesmo quando em simpatria com outras espécies, como a espécie competidora *Dichotomius irinus*, evidenciando sua adaptação à restinga.

As restingas se encontram fragmentadas e seus remanescentes são frequentemente modificados, principalmente pelo intenso crescimento urbano. Estas modificações resultam na redução do número de indivíduos das populações de *D. schiffleri*. Assim, devido à sua sensibilidade às alterações ambientais, é considerada bioindicador ecológico. Além disso, devido à sua preferência alimentar por excrementos e hábito paracoprídeo, é uma espécie que contribui para manutenção dos ecossistemas através da incorporação de matéria orgânica e aeração do solo, e dispersão secundária de sementes.

Apesar de se tratar de uma espécie ameaçada com importante função ecológica para manutenção do ecossistema, a diversidade e estrutura genética de populações remanescentes de *D. schiffleri* ainda não foram estudadas. Essas informações são relevantes para a identificação de vulnerabilidade populacional, além de auxiliar para melhor compreensão do *status* de conservação dessa espécie, o que contribui para elaboração de medidas para seu manejo e conservação.

Tendo a diversidade genética implicações importantes na evolução e conservação das espécies, esta tem sido estudada através de diferentes classes de marcadores moleculares e também pela combinação desses, geralmente nucleares, como ISSR, e DNAm. As investigações baseadas em marcadores com base genética distinta têm permitido a obtenção de informações relevantes a respeito da diversidade

e estrutura genética de populações naturais, tendo em vista as diferentes formas de herança desses marcadores.

Desta forma, por se tratar de uma espécie ameaçada de extinção que apresenta especificidade à restinga e por ter um importante papel ecológico, é fundamental a caracterização da estrutura e diversidade genética de populações remanescentes de *D. schiffleri*, pois contribuirá na melhor compreensão do seu *status* de conservação. Portanto, será testada a seguinte hipótese: A fragmentação e modificações naturais no ambiente da restinga alteram a diversidade genética e contribuem para o aumento da diferenciação genética entre populações do besouro *Dichotomius schiffleri*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Caracterizar a estrutura e diversidade genética de populações do besouro *Dichotomius schiffleri*, no intuito de contribuir para avaliação do seu *status* de conservação.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Estimar os níveis de diversidade genética nas populações de *Dichotomius schiffleri* para identificar áreas de maior fragilidade populacional.
- Analisar a estrutura populacional entre as populações de *Dichotomius schiffleri*, com o intuito de identificar unidades de manejo e auxiliar na sua conservação.
- Verificar a história demográfica das populações de *Dichotomius schiffleri* a fim de identificar se podem ser influenciadas pela geomorfologia das restingas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS ECOLÓGICOS E TAXONÔMICOS DA FAMÍLIA SCARABAEIDAE E GÊNERO *DICHOTOMIUS* HOPE, 1838

A família Scarabaeidae é representada por besouros que exploram excrementos e alguns outros recursos, como animais e frutas em decomposição. Estes hábitos alimentares contribuem principalmente para a aeração e incorporação de matéria orgânica no solo, o que torna essas espécies fundamentais na manutenção de ecossistemas devido a esses serviços ambientais (Halffter e Matthews 1966; Halffter, 1991; Hanski e Cambefort, 1991; Nichols, et al., 2008). O hábito alimentar desses besouros pode ser classificado de acordo com seu comportamento de realocação de recurso em paracoprídeo (escavadores), telecoprídeo (roladores) e endocoprídeo (residentes) (Hanski e Cambefort, 1991).

Os escarabeíneos apresentam ciclo de vida curto, as fêmeas podem apresentar cuidado parental e ovopositam de quatro a seis vezes durante toda a vida, e em cada prole há dezenas de larvas (Favila, 1993). Embora as proles não se apresentem numerosas em criações de laboratório, estes besouros mantêm grandes populações em diferentes ambientes, representando uma considerável biomassa (Didham et al., 1996). Aspectos como estes, relacionados à estrutura populacional desses besouros na natureza, são pouco conhecidos, sendo geralmente realizados estudos por criação em laboratório (Barreto et al., 2019).

A família Scarabaeidae é um grupo diverso que possui cerca de 200 gêneros, com pelo menos 49 que ocorrem no Brasil, incluindo o gênero *Dichotomius* Hope, 1838 (Halffter, 1991; Browne e Scholtz, 1999; Vaz-de-Mello, 2000). O gênero *Dichotomius* é um dos grupos mais abundantes dentro de Scarabaeidae, composto por cerca de 190 espécies com mais de 100 ocorrendo no Brasil (Vaz-de-Mello, 2000; Nunes e Vaz-de-Mello, 2013; Maldaner et al., 2015; Nunes et al., 2016; Valois et al., 2017; Nunes et al., 2019). Este gênero apresenta alguns complexos de espécies, como o complexo *Dichotomius sericeus* (Vaz-de-Mello et al., 2001), revisado recentemente por Valois et al., (2017).

Após a revisão do grupo *Dichotomius sericeus* o número de espécies aumentou para oito, sendo quatro novas espécies: *Dichotomius gilletti* Valois, Vaz-de-Mello e Silva, 2017, *Dichotomius iannuzziae* Valois, Vaz-de-Mello e Silva, 2017, *Dichotomius*

catimbau Valois, Vaz-de-Mello e Silva, 2017 e *Dichotomius guaribensis* Valois, Vaz-de-Mello e Silva, 2017. As outras quatro espécies que compõe o grupo são *Dichotomius sericeus* (Luederwaldt, 1929), *Dichotomius laevicollis* (Felsche, 1901), *Dichotomius irinus* (Harold, 1867) e *Dichotomius schiffleri* Vaz-de-Mello, Louzada e Gavino, 2001.

A espécie *D. schiffleri*, redescrita por Valois et al (2017), foi amostrada pela primeira vez na restinga arbórea de área conservada na Ilha do Guriri, município de São Mateus, no estado do Espírito Santo. Neste local foram amostrados os espécimes utilizados na descrição da espécie, o holótipo macho e alótipo amostrados em maio de 1996 por Schiffler, Louzada e Vaz-de-Mello e cerca de 900 exemplares parátipos coletados na sua maioria por Louzada (Vaz-de-Mello, Louzada e Gavino, 2001).

2.1.1 *Dichotomius schiffleri* Vaz-de-Mello, Louzada e Gavino, 2001

A espécie *D. schiffleri* é caracterizada morfologicamente pela presença de dois dentes clipeais conspicuos e ausência de angulação na borda da sutura clipeo-genal (Vaz-de-Mello et al., 2001). Apresenta também caracteres sexuais secundários que diferenciam as fêmeas pela presença de dentes córneos mais agudos, superfície anterior do clipeo com sulcos transversais bem definidos e porção medial do sexto esternito, tão alongado quanto o quinto (Figura 1) (Valois et al., 2017).

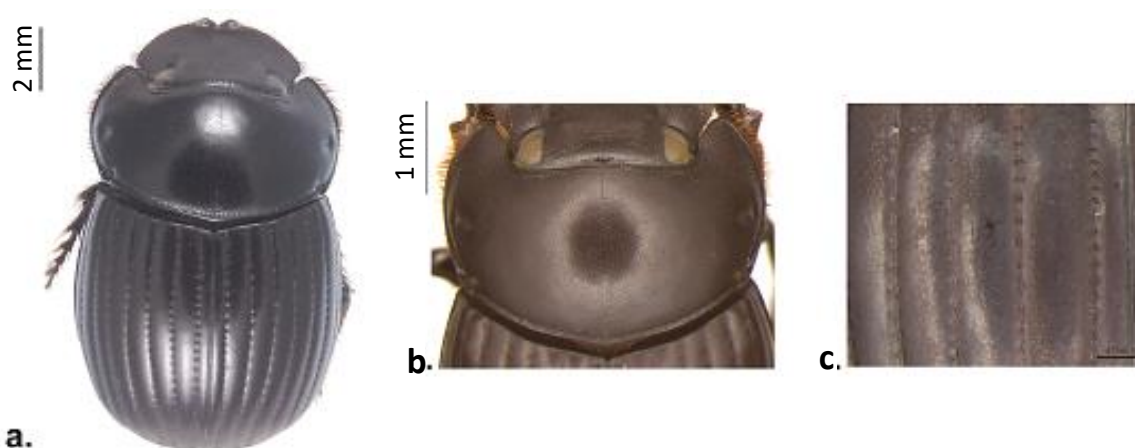


Figura 1. Características morfológicas gerais de espécime macho de *Dichotomius schiffleri*. a) Visão dorsal do corpo; b) Região do pronoto; c) Detalhe da superfície do élitro. Fonte: Valois et al., 2017, com adaptações.

Dichotomius schiffleri apresenta distribuição em florestas costeiras do Brasil (restingas) com registros de ocorrência nos estados de Pernambuco, Bahia e Espírito Santo (Valois et al. 2017; Silva, comunicação pessoal). A amplitude da distribuição desta espécie, a inclui no critério de “distribuição restrita com extensão menor que 5000 km²” e para o critério de “tamanho populacional restrito com área de ocupação menor que 500 km²” (Corrêa et al., 2011; Vieira et al., 2011). Estes critérios apoiam seu *status* de conservação como espécie ameaçada na categoria “Em Perigo” (*Endangered* – EN), descrita na IUCN (Vaz-de-mello et al., 2013).

Nos locais de sua ocorrência, *D. schiffleri* é considerada abundante, sendo geralmente uma espécie dominante na comunidade de escarabeíneos mesmo em simpatria com a espécie competidora *D. irinus*, que apresenta sobreposição de nicho ecológico (Vieira et al., 2011; Beiroz et al., 2019). A abundância e dominância de *D. schiffleri* em locais de coexistência com a espécie competidora, indicam se tratar de uma espécie altamente adaptada ao ambiente de restinga, o qual apresenta condições adversas para o estabelecimento de escarabeíneos, devido ao solo arenoso que pode afetar a capacidade de cavar e manutenção de túneis para nidificação (Halfter e Edmonds 1982; Vieira et al., 2008; Vieira et al., 2011; Beiroz et al., 2019).

2.2 FLORESTAS COSTEIRAS DA MATA ATLÂNTICA E SEU STATUS DE CONSERVAÇÃO

No Brasil, a Mata Atlântica está distribuída na costa leste abrangendo 17 estados, desde o Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul (Fundação SOS Mata Atlântica, 2019). Dentro desta ampla distribuição latitudinal são encontradas regiões tropicais e subtropicais, além de grande variação em níveis de pluviosidade de acordo com a variação longitudinal. Além disso, é um ecossistema que ocupa uma região com gradiente altitudinal que varia desde o nível do mar até 2700 m (Metzger, 2009).

A Mata Atlântica tem sido bastante desflorestada ao longo do tempo desde a ocupação do território brasileiro pelos europeus (Dean, 1995; Ribeiro et al., 2009). Desta forma, apesar da enorme importância ecológica, dada sua riqueza em número de espécies, sendo várias endêmicas, restam atualmente apenas 12,4% de

fragmentos remanescentes da cobertura original de 1.315.460 km². (Fundação SOS Mata Atlântica, 2019).

O desmatamento tem ocorrido por extração de madeira, extensão da agricultura e, principalmente pelo crescimento urbano das cidades em áreas costeiras, tendo em vista que 72% da população brasileira reside em áreas correspondentes à ocupação original da Mata Atlântica (Morellato e Haddad, 2000; Fundação SOS Mata Atlântica, 2019). Desse modo, as formações localizadas próximas a costa atlântica são as mais afetadas.

Nessa área são encontradas as formações pioneiras sob influência marinha, conhecidas como restinga (Veloso et al., 1991). A restinga, como formação fito-geomorfológica, surgiu a partir de depósitos arenosos originados no quaternário, cuja gênese foi influenciada pelas variações do nível do mar ocasionadas pelas mudanças ocorridas no Quaternário (Suguio e Tessler 1984; Suguio e Martin, 1987). Ao longo do tempo, as restingas tiveram sua disposição influenciada também devido às características do substrato, como a composição e condições de drenagem, sendo este último ocasionado pela ascensão dos lençóis freáticos durante períodos chuvosos (Silva, 1999).

As restingas apresentam uma condição histórica e contemporânea de vulnerabilidade devido à fragmentação, e ainda é um ambiente que apresenta fragilização devido à sua baixa resiliência a modificações no ambiente. A baixa resiliência se deve ao acúmulo de serapilheira no solo (Louzada et al., 1996; Perovano e Lima, 2003) e vegetação sobre solos arenosos, altamente lixiviados e pobres em nutrientes (Araújo et al. 2004., Guedes et al., 2006), características que potencializam a ocorrência de queimadas (Louzada et al., 1996).

Além da fragilização que as restingas apresentam, estas por fazerem parte do cenário de belezas naturais do litoral, são alvo de exploração turística e sofrem o impacto causado pelo crescimento das cidades costeiras, que se estabelecem principalmente a partir de uma economia baseada no turismo, o que contribui para fragmentação e modificação das restingas (Vieira et al., 2008; Amaral et al., 2016).

Atualmente, alguns de seus remanescentes apresentam proteção por lei para conservação da biodiversidade, como as reservas Reserva Particular do Patrimônio Natural Nossa Senhora de Oiteiro (Ipojuca-PE), RPPN Sapiranga (Salvador-BA), Reserva Florestal da Vale do Rio Doce (Linhares-ES), entre outras (ICMBio, 2019). No entanto, alguns remanescentes permanecem sem proteção legal, como os

fragmentos presentes em Praia da Baleia (Espírito Santo) e na faixa do litoral de Santa Cruz de Cabralia (Bahia), que estão constantemente sendo alterados por exploração comercial e residencial.

A contínua destruição da restinga traz grande impacto sobre a sua biodiversidade, promovendo a redução da abundância de diferentes grupos biológicos, entre esses, as comunidades de escarabeíneos (Moraes, 1999; Rocha et al., 2005; Rocha et al., 2007; Rocha et al., 2008; Vieira et al., 2008). Desse modo, as frequentes modificações nas restingas, ambiente de distribuição de *D. schiffleri*, levam a redução da abundância de indivíduos e populações desta espécie, como visto por Vieira et al., (2008).

A diminuição no tamanho das populações da espécie *D. schiffleri* em ambientes impactados a torna um importante bioindicador ecológico na restinga (Marinoni e Ganho, 2006; Nichols et al., 2007; Vieira et al., 2008). Portanto, é fundamental entender a estrutura genética das populações de *D. schiffleri*, pois esse é um parâmetro complementar aos conhecidos aspectos ecológicos dessa espécie, e que pode contribuir para avaliação do seu status de conservação (Frankham, 2008; Carnaval, 2009).

2.3 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL

A diversidade genética tem implicações importantes na evolução e conservação das espécies, sendo moldada por mecanismos macro e microevolutivos (Templeton, 2011). A microevolução diz respeito a evolução ao nível de populações, unidade evolutiva composta por indivíduos que se reproduzem alterando as frequências alélicas no tempo e no espaço (Hendry e Kinnison, 2001; Templeton, 2011; Ellegren e Galtier, 2016). Esta é descrita em termos de frequência alélica, diversidade alélica e heterozigosidade, e sua estimativa pode ser feita por parâmetros específicos como heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), diversidade alélica, haplotípica e nucleotídica (Frankham et al., 2008).

Além da inferência dos índices de diversidade genética, é possível analisar a distribuição das frequências alélicas no espaço, o que permite estimar o padrão de fluxo gênico entre as populações (Holsinger e Weir, 2009). Estas medidas são obtidas pelo cálculo dos índices de diferenciação genética, baseado em estatísticas “F” (F_{ST} , F_{IS} e F_{IT}) (Wright, 1951) e análogos como o G_{ST} (Nei 1977), G'_{ST} (Hendrick, 2005) e

estatística – Φ (Excoffier et al., 1992), sendo este último apropriado tanto para marcadores co-dominantes, como dominantes ou herança uniparental (Meirmans e Hedrick, 2011).

Além desses índices, análises bayesianas possibilitam investigar a estrutura populacional com base em informações *a priori* testadas a partir da exaustão estatística, desta forma, têm sido utilizadas para inferir o particionamento da variabilidade genética em indivíduos ou grupos através de programas como o *Structure* e BAPS (*Bayesian Analysis of Population Structure* – Análise Bayesiana de Estrutura Populacional). Através do *Structure* podem ser analisados dados de marcadores codominantes e dominantes, como também de herança uniparental, no entanto, este não leva em consideração a ausência de recombinação entre os indivíduos, como realizado pelo BAPS (Pritchard et al., 2000; Corander e Tang, 2007).

Além disso, também através de análise bayesiana podem ser testados modelos populacionais no programa *Hickory*, realizada especificamente para marcadores dominantes. Esta análise é baseada nos índices θ e f (equivalente a F_{IS}) os quais podem indicar desvios para previsão de modelos populacionais, como o modelo *full* em que os valores de diferenciação populacional e endogamia diferem de zero, $f=0$ sugerindo ausência de endogamia, $\theta=0$ para ausência de diferenciação da população e o modelo *f free* com valores aleatórios (Holsinger et al., 2002).

A distribuição da variabilidade genética no tempo (em gerações) permite analisar quais eventos ocorreram durante a história de uma população, esta informação pode ser obtida por meio de análises de sequências de DNA não recombinantes de uma região do genoma que pode ou não ser um gene, sendo referidas como haplótipos (Templeton, 2011). Estas sequências podem ser analisadas com base na teoria da coalescência, por exemplo, a partir de análises de testes de neutralidade e *mismatch distribution* (Rogers e Harpending 1992).

A aplicação dessas metodologias para análise da diversidade e estrutura populacional requer a obtenção de dados genéticos através de marcadores moleculares baseados em sequência de DNA, como por exemplo o SSR, um marcador codominante de sequências de DNA nuclear (*Simple Sequence Repeat* – Sequência de Repetição Única), um dos primeiros marcadores a serem desenvolvidos (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989). Marcadores dominantes também são utilizados, como o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat* – Inter Sequência de Repetição Única), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo de

Comprimento de Fragmentos Amplificados) e o SRAP (*Sequence-Related Amplified Polymorphism* – Polimorfismo Amplificado Relacionado a Sequência) (Meyer et al., 1993; Vos et al., 1995; Li e Quiros 2001).

Além dos marcadores citados, também estão sendo recentemente analisados alguns genes mitocondriais, para animais. A exemplo disso, os genes CytB (citocromo B) (Pantoja-Gomez et al., 2019), rRNA 16S (subunidade ribossomal-16S) (Nolasco et al., 2017), Nad4 (NADH dehydrogenase subunidade 4), Nad5 (NADH dehydrogenase subunidade 5) (Güler et al., 2019) e o amplamente utilizado COI (citocromo oxidase subunidade I) (Avtzis et al., 2019; Cheng et al., 2019; Kang et al., 2018).

Em alguns estudos realizados em insetos, têm sido combinados a avaliação por genes mitocondriais e marcadores nucleares para obtenção de dados mais informativos a respeito da diversidade e estrutura genética populacional, tendo em vista os diferentes modos de herança dos genomas analisados através de cada um desses marcadores (Barbosa et al., 2014; Yang et al., 2015; Meng et al., 2018; Sadler et al., 2019).

2.3.1 Marcadores ISSR no estudo da diversidade e estrutura genética populacional em insetos

O ISSR é uma técnica desenvolvida por Meyer et al. (1993) baseada em *primers* com sequências de microssatélites, amplificados com um único *primer* longo (16 – 20 pb) que confere maior reprodutibilidade, consistindo de várias repetições de di- tri- ou tetra-nucleotídeos com ancoragem semi-arbitrária (Zietkiewicz et al., 1994). Apesar da sua herança dominante, ou seja, não diferencia homozigotos e heterozigotos, o ISSR não necessita do conhecimento prévio da sequência alvo, podendo assim ser aplicado em espécies não-modelos, além de demandar um baixo custo, ter alto índice de reprodutibilidade e permitir o acesso a elevados níveis de polimorfismo (Bornet e Branchard, 2001; Buhroo et al., 2018).

Desde a sua descrição, o ISSR tem sido utilizado em estudos de diversidade e estrutura genética populacional com invertebrados, especialmente em diferentes espécies de insetos, geralmente de importância econômica, como a mariposa *Antheraea mylitta* Drury, 1773 (Kar et al., 2005), a traça *Plutella xylostella* (Roux et al., 2007), a fulgomorfa *Sogatella furcifera* Horváth, 1899 (Liu et al., 2009), o bicho-da-

seda *Antheraea assamensis* Helfer, 1837 (Singh, et al., 2012), a abelha *Apis mellifera* meda Skorikow, 1829 (Rahimi et al., 2016) e a cochonilha *Lepidosaphes pistaciae* Archangelskaya, 1930 (Rouhani et al., 2018).

Outros estudos também foram realizados baseados em ISSR para análise dos impactos que as atividades antrópicas causam às espécies nativas como com a espécie de psocoptera, *Liposcelis bostrychophila* Badonnel, 1931. Neste estudo, foi possível identificar o impacto da fragmentação de habitat e também avaliar os efeitos do uso de inseticidas químicos favorecendo a perda da diversidade genética de populações subdivididas (Wang et al., 2016).

Marcadores ISSR também foram utilizados para investigar a diversidade e estrutura genética populacional para fins conservacionistas, como realizado por Ferreira–Neto et al. (2017) com o besouro *Canthon staigi* Pereira, 1953. Estes autores observaram que as populações analisadas apresentaram histórico de fluxo gênico entre diferentes tipos de ambientes da Mata Atlântica. Contudo, foi observado menor nível de diversidade genética em populações localizadas em áreas com maior degradação ambiental, sugerindo serem populações que precisam de maior atenção quanto à conservação de seus indivíduos.

2.3.2 DNAmT na análise da diversidade e estrutura genética populacional em insetos

A diversidade genética no genoma mitocondrial é analisada frequentemente utilizando o gene COI além de outros genes como o CytB, Nad5 e 16S. As sequências deste genoma são de herança materna, apresentam alta taxa de substituição de nucleotídeos comparada aos genes do genoma nuclear, pouca ou nenhuma recombinação e são seletivamente neutras (Avice et al., 1987; Moritz et al., 1987; Behura, 2006), por isso os genes de DNAmT são amplamente utilizados para responder diferentes tipos de perguntas relacionadas a estrutura genética de populações naturais.

Os genes do DNAmT têm sido utilizados em estudos para verificação de estrutura genética populacional aplicada à conservação, como no trabalho realizado por Pflieger et al., (2017) com a espécie de borboleta *Danaus plexippus* Linnaeus, 1758. Nesse estudo foi possível verificar estruturação populacional em grupos de populações

migradoras e não migradoras, sendo esta informação utilizada para fins de conservação da espécie.

A análise de diversidade e estrutura populacional também tem contribuído em planos de controle de espécies pragas, como observado em estudo realizado por Güller et al., (2019) com a mosca *Ceratitis capitata* Wiedemann, 1824. Nesse trabalho foi observada estruturação populacional histórica e gargalos genéticos subsequentes que ocorreram partindo da população de origem da espécie através de toda as populações da sua distribuição geográfica, indicando uma rota de dispersão dessa espécie.

Outra abordagem realizada com DNAm é quanto ao estudo do processo histórico e evolutivo, assim como realizado por Nolasco-Soto et al., (2017). Nesse estudo, os autores contribuíram para o entendimento e delimitação de linhagens evolutivas, além de identificar quais mudanças na ambiente afetaram a história demográfica do besouro *Canthon cyanellus* LeConte (1859).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM E ISOLAMENTO DE DNA

Os indivíduos da espécie *Dichotomius schiffleri* Vaz-de-Mello, Louzada e Gavino, 2001 foram coletados em quatro localidades que abrangem toda extensão de ocorrência da espécie. Os remanescentes amostrados são ambientes de restinga, localizados nos municípios de Ipojuca (PE), Maraú (BA), Santa Cruz de Cabrália (BA) e Vila Velha (ES) (Figura 2). As coletas foram realizadas com autorizações do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (SISBIO Licenças nº 16278–1 e nº 41761–1) e da administração local.

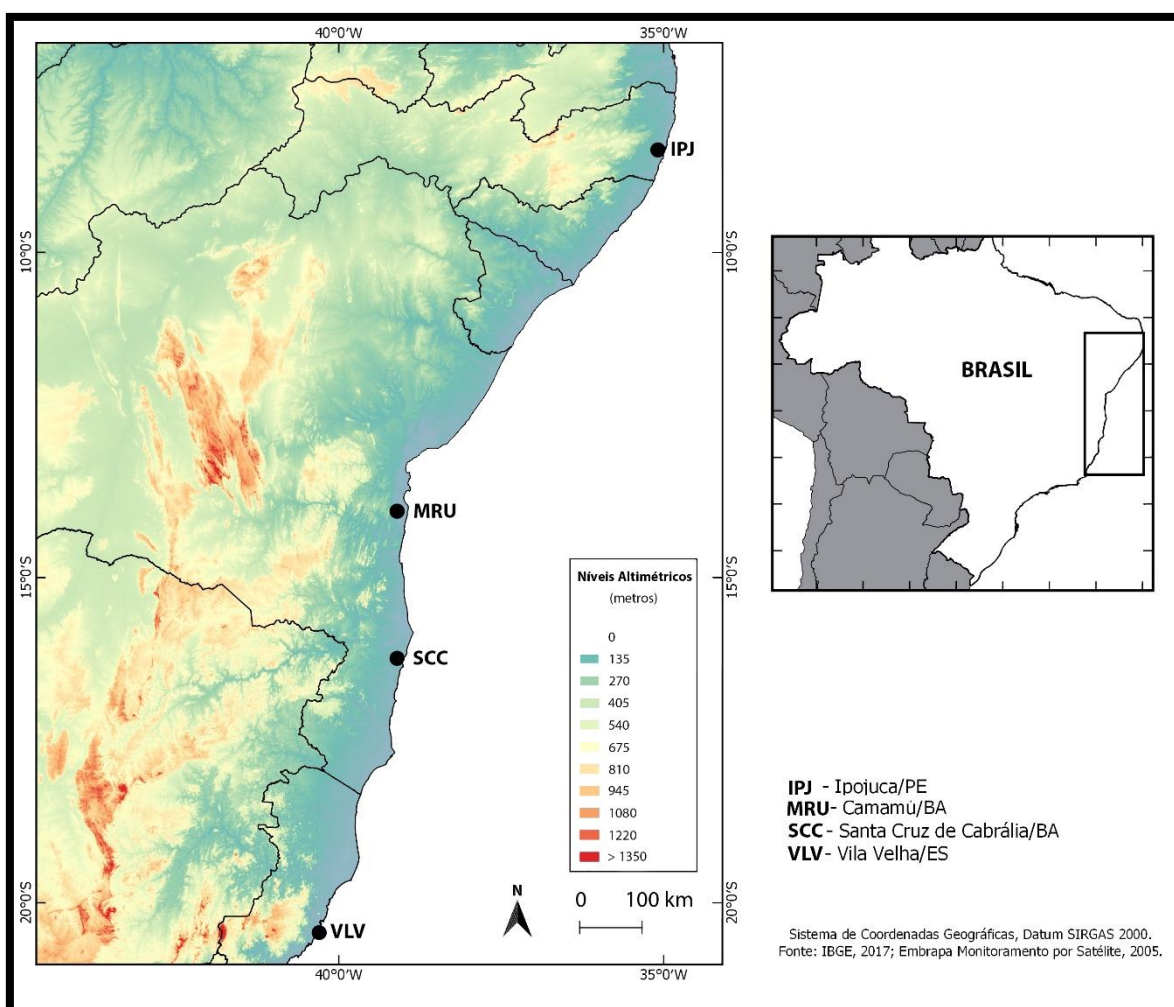


Figura 2. Mapa de parte do litoral do Brasil com distribuição das populações amostradas de *Dichotomius schiffleri* em remanescentes de restinga nos estados de Pernambuco (PE), Bahia (BA) e Espírito Santo (ES).

As coletas foram realizadas com a utilização de 40 armadilhas *pitfall* iscadas com fezes humanas e dispostas em transecto, distantes 20 m entre si, por um período de 48 h (Figura 3). Os espécimes coletados foram sacrificados e identificados morfologicamente ao nível de espécie pelo Prof. Dr. Fernando A. B. Silva (Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas), taxônomo especialista da família Scarabaeidae e um dos autores de revisão do Grupo sericeus, trabalho que inclui a redescritção de *Dichotomius schiffleri* (Valois et al., 2017). Após identificação, os indivíduos foram armazenados em álcool absoluto a -20°C , no Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos (LBGI), Centro de Pesquisa do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco (UPE).

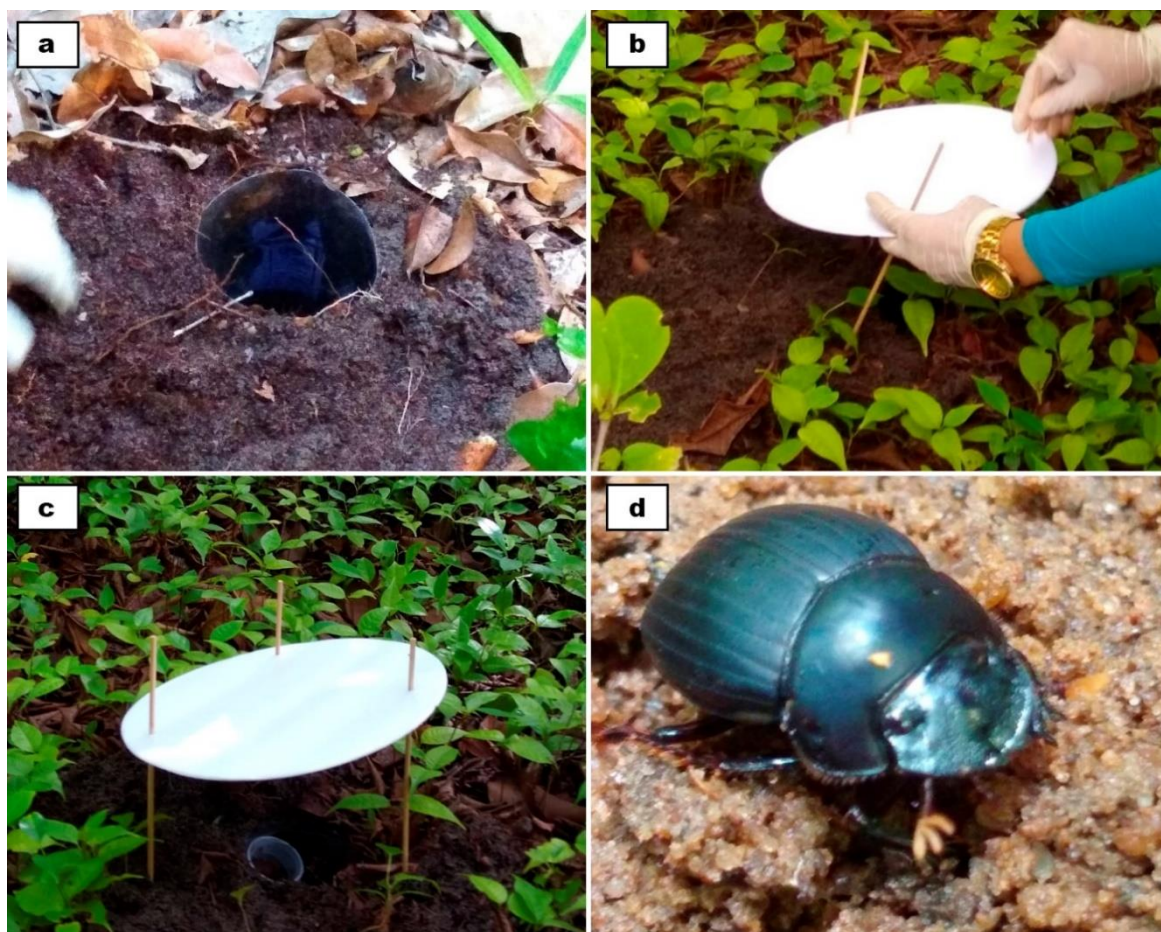


Figura 3. Coleta de espécimes de *Dichotomius schiffleri* com a utilização de armadilhas *pitfall*. a) Reservatório para os espécimes capturados; b) Cobertura da armadilha; c) *Pitfall* posicionada ao nível do solo; d) Indivíduo de *Dichotomius schiffleri* em campo

Após o processamento dos espécimes, foram utilizados 20 indivíduos de cada população para as análises moleculares (Tabela 1). Para o isolamento de DNA de cada espécime foi utilizado tecido do pronoto (Figura 1), seguindo o protocolo de

Sambrook e Russel (2001). Em seguida, o DNA foi tratado com RNase (0,2 µg/mL) durante 1h a 37 °C. A qualidade e concentração do DNA isolado foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose 1% a partir da comparação com DNA fago Lambda (Promega).

Tabela 1. Populações amostradas com localização, estado de conservação, tamanho e número de indivíduos analisados para os marcadores ISSR e dos genes COI e 16S do DNAmT.

Populações	Código	Coordenadas geográficas	Estado de conservação	Tamanho (ha)	N° de indivíduos		
					ISSR	DNAmT	
						COI	16S
Ipojuca/PE	IPJ	08°32'08.88"S 35°01'13.47"W	RPPN NSr ^a do Oiteiro de Maracaípe	76	20	9	7
Maraú/BA	MRU	14°09'38.39"S 39°00'23.33"W	APA Baía de Camamu	118.000	20	11	11
Santa Cruz de Cabralia/BA	SCC	16°19'24"S 39°01'21"W	Área sem proteção legal	630	20	11	9
Vila Velha/ES	VLV	20°29'40.15"S 40°21'11.93"W	Área sem proteção legal	22	20	10	10
Total	–	–	–	–	80	41	37

3.2 AMPLIFICAÇÃO DOS MARCADORES ISSR E DOS GENES DO DNAMT (COI E 16S)

3.2.1 Seleção e aplicação dos *primers* de ISSR

A amplificação dos marcadores ISSR foi realizada de acordo com Bornet e Branchard (2001), com adaptações segundo Amorim (2009). As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*; Reação em Cadeia da Polimerase) foram realizadas para um volume total de 15 µl a partir de 2,5 ng do DNA, 1x buffer, 2,5 mM MgCl₂, 250 µM dNTP–mix, 1 pmol *primer* e 1 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). A amplificação dos marcadores ISSR foi realizada em termociclador (MG96+/MG96G – Biocycler) e seguiu o seguinte programa de PCR: desnaturação do DNA a 94 °C durante 4 min, seguido de 35 ciclos de amplificação (94 °C por 30 s, 45 s sob a temperatura

específica de pareamento de cada *primer* que variou de 49,7 °C a 54,0 °C, e 2 min a 72 °C) e uma etapa de extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,8% por 2h e 30min e fotodocumentados em sistema de captura Gel logic 112.

As reações de PCR–ISSR foram executadas em duas repetições independentes no intuito de verificar o nível de reprodutibilidade de cada *locus* amplificado e eliminar padrões não reprodutíveis para evitar erros na interpretação dos dados. A análise de reprodutibilidade foi realizada através do cálculo de distância de Jaccard (Holland et al., 2008).

A avaliação dos *primers* de ISSR (Laboratório de Biotecnologia, University of British Columbia) mais informativos foi feita em duas etapas, um teste inicial de amplificação a partir de um conjunto de 49 *primers*, dos quais 25 *primers* apresentaram amplificação de bandas visualmente bem definidas. E em uma segunda etapa, estes 25 *primers* foram analisados quanto ao nível de polimorfismo afim de selecionar os *primers* mais informativos a serem utilizados na análise populacional. Nesta etapa, foi realizada amplificação do DNA via PCR em nove indivíduos, três de cada uma das populações IPJ, SCC e VLV.

A partir da análise dos géis foi construída uma matriz binária de presença (1) e ausência (0) de fragmentos amplificados. A matriz foi analisada quanto ao número total de *loci* (TL), número total de *loci* polimórficos (TLP), número total de *loci* monomórficos (TLM), média de frequência polimórfica por *primer* (FP) além do cálculo dos seguintes índices de polimorfismo: *Polymorphism Information Content* (PIC) (Roldán–Ruiz et al., 2000), *Marker Index* (MI) (Varshney et al. 2007) e *Resolution Power* (RP) (Prevost e Wilkinson 1999).

Os *primers* selecionados foram aplicados em 20 indivíduos de cada uma das quatro populações (IPJ, MRU, SSC e VLV), totalizando 80 indivíduos. Após a amplificação do DNA destes indivíduos, os géis foram genotipados sendo excluídas as bandas não reprodutíveis, e os dados gerados foram agrupados em uma matriz binária de presença e ausência.

3.2.2 Sequenciamento e tratamento das sequências do COI e 16S

O gene citocromo oxidase subunidade I (COI) do DNAm_t foi amplificado a partir do par de *primers* HCO1490 (*foward*) e LCO2198 (*reverse*) descritos por Folmer et al.

(1994). Para amplificação da região do gene 16S foram utilizados os *primers* 16SscaF (*foward*) e 16SscaR (*reverse*) descritos por Cabral-de-Mello et al. (2011). As reações para ambos os genes foram feitas com volume total de 30 µl utilizando 10 ng do DNA, 1x buffer, 2,5 mM MgCl₂, 250 µM dNTP-mix, 0,5 pmol *primer forward*, 0,5 pmol *primer reverse* e 1 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen).

O programa de PCR utilizado em termociclador (MG96+/MG96G – Biocycler) para ambos os genes, seguiu as seguintes etapas: desnaturação do DNA com temperatura inicial de 94 °C durante 5min, seguido de 40 ciclos de amplificação (94 °C por 30s, 30s sob a temperatura específica de pareamento de cada *primer*, 56,0 °C para o COI e 60,0 °C para o 16S, e 2min a 72 °C) e uma etapa de extensão final a 72 °C por 10min. O produto da reação foi purificado e sequenciado em sequenciador ABI–3730XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), em serviço terceirizado pela Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul).

As sequências obtidas foram visualizadas no programa Trev 1.9 (Bonfield et al., 2002) e analisadas quanto a qualidade de sequenciamento a partir de valor mínimo de Phred=20 no Pregap 4.1.5. Após essa etapa, foi gerada uma sequência consenso no Gap 4 4.1. Todos esses programas são do pacote Staden 2.0 (Staden, 1996). Posteriormente, as sequências foram alinhadas no MAFFT (Kuraku et al., 2013; Katoh et al., 2017) e editadas manualmente com auxílio do programa Aliview 3.0 (Larsson, 2014).

Após o tratamento, as sequências foram submetidas a busca por similaridade no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* – Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia) através de alinhamento múltiplo por Blastn (Johnson et al., 2008) para confirmação da similaridade das sequências analisadas com dados já publicados para *Dichotomius schiffleri*. Por fim, as sequências dos genes COI e 16S foram concatenadas para análise combinada.

3.3 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL POR ISSR

A diversidade genética foi estimada a partir do cálculo da heterozigosidade esperada (H_E) e a porcentagem de *loci* polimórficos por população (D_g), as quais foram realizadas no programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lisher, 2010). Além desses,

também foi calculado o índice de diversidade de Shannon no programa Popgene 1.31 (Yeh et al., 1999).

A diferenciação genética foi investigada por meio da análise de variância molecular (AMOVA), e o índice de diferenciação genética Φ_{ST} global e *pairwise* calculados no Arlequin 3.5 (Excoffier e Lisher, 2010). Além disso, também foi calculado o Φ_{ST} *pairwise*, e utilizados para testar a hipótese de isolamento por distância (Wright, 1965) pelo teste de Mantel (Sokal e Rohlf, 1995) conduzido com 10.000 permutações aleatórias.

O teste de modelo populacional com abordagem bayesiana foi realizado no programa Hickory 1.1 (Holsinger et al., 2002) para identificar qual modelo populacional mais se ajusta aos dados analisados, sendo estes os modelos testados: *full model*, no qual os valores de diferenciação genética populacional e endogamia diferem de zero; $f = 0$ que assume ausência de endogamia; $\theta = 0$ que indica ausência de diferenciação genética populacional; *free* que aceita valores aleatórios. A identificação do modelo mais adequado foi feita com base nos menores valores obtidos para os critérios DIC (*Deviance Information Criterion*; Critério de Informação de Desvio) e Dbar (média a posteriori do desvio).

A inferência de clusterização por abordagem bayesiana foi realizada no programa Structure 2.3.2 (Pritchard et al., 2000) para designar indivíduos em agrupamentos genéticos (K). A interação entre os indivíduos foi feita com base em 600.000 repetições (60.000 *burn-in*), utilizando o modelo *Admixture* (mistura com frequências alélicas relacionadas) e assumindo de um a 10 interações. O número de grupos genéticos foi inferido a partir do método proposto por Evanno et al. (2005) no Structure Harvester (*on line*) (Earl e Von-Dholt, 2012). Adicionalmente, foi realizada uma análise baseada no método de distância genética Neighbor-Net, no programa Splitstree 4.14.8 (Huson, 1998) no intuito de investigar a disposição dos indivíduos de acordo com suas dissimilaridades genéticas.

3.4 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL POR GENES COI E 16S

A diversidade genética foi estimada pelo cálculo dos índices de diversidade haplotípica (H_d), diversidade nucleotídica (π) e número de haplótipos no DnaSP 6.12

(Rozas et al., 2017). A estrutura genética foi analisada através da variância molecular (AMOVA) entre e dentro das populações, baseado no índice “ Φ ”. Foi realizado também o cálculo do índice de diferenciação Φ_{ST} *pairwise* e o teste de Mantel no Arlequin 3.5 para verificar se há correlação entre as distâncias genéticas e geográficas. A estruturação populacional foi inferida pela análise bayesiana através do BAPS 6 (Corander e Tang, 2007) utilizando módulo de mistura genética considerando *loci* ligados e testando 100 *clusters* para atribuição dos indivíduos analisados a diferentes agrupamentos genéticos.

A distância genética entre haplótipos foi medida pelo programa Network 5 com base no algoritmo de *median-joining* (Bandelt et al., 1999) para visualização das relações entre haplótipos com redes multifurcadas a partir de haplótipos comuns e com a representação de vetores médios, que significam uma sequência consenso de haplótipos não amostrados.

Os padrões demográficos foram analisados quanto ao desvio de neutralidade por meio dos testes D de Tajima (1989) e F_s de Fu (1997), com a utilização de 1000 simulações e assumindo a premissa de seleção neutra, no qual divergências entre diferentes estimativas de parâmetros θ indicam ação de seleção, sendo rejeitada a hipótese de neutralidade. Além destas, foi realizada análise de distribuição de incompatibilidades entre pares de haplótipos (*Mismatch distribution*), utilizada para testar a hipótese de expansão populacional, em que populações que apresentam distribuição unimodal é um indicativo de expansão populacional recente (Rogers e Harpending 1992). Estas análises foram realizadas através do programa Arlequin 3.5 e foram representadas graficamente com o programa R (R Core Team, 2019).

4 RESULTADOS

4.1 SELEÇÃO DE *PRIMERS* DE ISSR

O conjunto de 25 *primers* analisados na seleção apresentaram em média 22,56 *loci*, a quantidade de *loci* amplificados por *primer* variou de 10 a 42, o número total de *loci* polimórfico variou entre 7 e 42 e uma variação de apenas 1 a 3 *loci* monomórficos, ou seja, que apresentaram bandas amplificadas em todos os indivíduos analisados. A frequência polimórfica variou de 60 a 100% (Tabela 2).

Os índices de polimorfismo apresentaram correlação positiva para todas as combinações entre os índices PIC, MI e RP. Os valores médios de PIC e MI foram de 0,31 e 6,61, respectivamente, com variação de 0,0 a 0,43, para PIC e para MI de 0,0 a 10,03. Foram obtidos baixos valores para ambos os índices indicando maior nível de polimorfismo acessado pelo conjunto de *primers*. Adicionalmente, foi obtido o valor máximo de 16,42 para o índice de RP e mínimo de 3,10, sendo este parâmetro muito variável entre os *primers*, e assim menos informativo como critério classificatório.

Baseado nos valores apresentados por todos os parâmetros analisados foram selecionados os oito *primers* mais informativos quanto ao acesso à diversidade genética, para aplicação nas populações.

Tabela 2. Conjunto de 25 *primers* de ISSR testados quanto a diferentes parâmetros de polimorfismo.

<i>Primers</i>	Sequência (5'–3')	TL	TLP	TLM	FP (%)	PIC	MI	RP
ISSR827	(AC) ₈ G	10	7	3	70	0,28	4,37	4,00
ISSR826	(AC) ₈ C	12	10	2	82	0,31	5,79	5,56
ISSR873	(GACA) ₄	12	12	0	100	0,26	6,13	4,21
ISSR825	(AC) ₈ T	15	14	1	92	0,42	8,93	10,21
ISSR810	(GA)₈T	15	9	6	60	0,24	3,21	5,32
ISSR850	(GT) ₈ YC	17	15	2	87	0,27	5,61	6,43
ISSR856	(AC) ₈ YA	17	15	2	87	0,35	7,19	9,32
ISSR864	(ATG) ₆	19	19	0	100	0,38	8,55	10,43
ISSR868	(GAA) ₆	20	20	0	100	0,42	9,40	10,43
ISSR807	(AG) ₈ T	20	19	1	95	0,37	7,88	10,89
ISSR857	(AC) ₈ YG	21	20	1	94	0,41	9,08	10,89
ISSR859	(TG) ₈ RC	21	21	0	100	0,39	8,90	9,78
ISSR835	(AG) ₈ YC	22	21	1	94	0,36	7,71	6,67
ISSR876	(GATA)₂ (GACA)₂	22	22	0	100	0,43	10,03	7,10
ISSR878	(GGAT) ₄	22	22	0	100	0,40	9,33	10,67
ISSR828	(TG) ₈ A	24	24	0	100	0,42	9,41	15,32
ISSR834	(AG) ₈ YT	24	24	0	100	0,39	8,76	14,43
ISSR812	(GA)₈A	24	22	2	92	0,42	8,64	16,43
ISSR860	(TG) ₈ RA	24	24	0	100	0,35	8,15	8,43
ISSR842	(GA)₈YG	25	25	0	100	0,40	9,27	9,78
ISSR811	(GA)₈C	31	31	0	100	0,33	7,73	7,78
ISSR817	(CA)₈A	32	30	2	94	0,38	8,03	9,10
ISSR816	(CA) ₈ T	33	33	0	100	0,39	9,04	9,78
ISSR836	(AG)₈YA	40	37	3	92	0,29	6,04	3,10
ISSR879	(CTTCA)₄	42	42	0	100	0,00	0,00	15,56
Total	–	564	538	26	94	0,34	7,48	9,26

Número total de loci (TL), número de loci polimórficos (TLP), número de loci monomórficos (TLM), porcentagem da frequência polimórfica (FP) e os índices de polimorfismos *Polymorphism Information Content* (PIC), Marker Index (MI) e Resolution Power (RP). Os **primers** destacados em negrito foram selecionados para aplicação populacional.

4.2 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL POR ISSR

A partir da aplicação dos oito *primers* selecionados em toda amostragem, foram obtidos 252 *loci* com número de *loci* por *primer* variando entre 23 a 41. Os *primers* apresentaram reprodutibilidade média de 96%. Os níveis de polimorfismo em todas as populações foram inicialmente calculados a partir da estimativa de diversidade

genética global (DG %) de 87,5%, com variação de 82,9% na população MRU a 90,4% na população SCC. O índice de Shannon médio foi de 0,41 e a heterozigosidade esperada média (H_E) foi 0,28, apresentando pouca variação entre as populações (Tabela 3).

Tabela 3. Índices de diversidade genética por população baseados em ISSR.

Populações	DG (%)	IS	H_E
Ipojuca – IPJ	88,1	0,44	0,28
Maraú – MRU	82,9	0,37	0,27
Santa Cruz de Cabrália – SCC	90,4	0,42	0,28
Vila Velha – VLV	88,4	0,44	0,30
Média	87,5	0,41	0,28

Índice de diversidade genética (DG %); índice de Shannon (IS) e Heterozigosidade esperada (H_E).

Na análise de variância molecular (AMOVA) foi obtido um valor de 90,54% dentro das populações e apenas 9,46% entre as populações, indicando alta variabilidade genética dentro das populações. A análise de variância molecular realizada para marcadores dominantes considera cada *locus* como haplótipos diferentes, de modo que a distância genética para realizar a partição da variação molecular nos componentes (V_a e V_b) é calculada entre os *locus*. Além disso, os graus de liberdade utilizados na fonte de variação “dentro das populações” diferem entre as abordagens para dados haploides e diploides, onde para marcadores dominantes é utilizada a fórmula referente a dados haploides (Excoffier, et al., 1992; Michalakis e Excoffier et al., 1996).

Desse modo, as considerações na formulação da análise para dados haploides aplicados a marcadores dominantes podem superestimar a variância molecular “dentro das populações” e interferir na partição da variação molecular entre os componentes analisados. Assim, é possível que a alta variância molecular dentro das populações, obtido a partir dos dados do ISSR podem ter obscurecido sinais de diferenciação genética.

O índice de diferenciação genética (Φ_{ST}) foi de 0,09, isto é também devido à alta variabilidade molecular que aproxima os valores de Φ_{ST} a zero, sendo este significativo, indicando que as populações estão geneticamente estruturadas. Os

valores obtidos para os índices Φ_{ST} par a par variaram de 0,078 entre as populações SCC e VLV que apresentaram a menor distância geográfica, enquanto que para as populações IPJ e VLV, com maior distância em km, foi obtido valor de 0,113. Para todas as combinações par a par foram obtidos valores de Φ_{ST} par a par estatisticamente significativos ($p=0,00$) (Tabela 4).

Tabela 4. Distâncias genéticas do Φ_{ST} par a par (abaixo da diagonal) e distâncias geográficas em km (acima da diagonal) por pares de populações, com base em ISSR.

–	IPJ	MRU	SCC	VLV
Ipojuca – IPJ	–	1005	1352	1828
Maraú – MRU	0.084	–	350	840
Santa Cruz de Cabrália – SCC	0.095	0.096	–	580
Vila Velha – VLV	0.113	0.097	0.078	–

Todos os valores foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

O teste de mantel indicou ausência de correlação entre as distâncias geográficas e genéticas ($r=0,000$ $c=0,67/$ $p=0,05$), sugerindo que as populações estudadas não estão submetidas ao modelo de isolamento por distância (IBD).

O modelo populacional *full model* apresentou o menor valor de DIC e Dbar entre os quatro modelos analisados, sendo este o modelo mais provável para a amostragem analisada (Tabela 5). Este indica déficit de heterozigosidade dentro das subpopulações em relação à amostragem total, sugerindo subdivisão populacional.

Tabela 5. Parâmetros estatísticos para análise de adequabilidade dos quatro modelos populacionais, com base nos dados de ISSR.

Parâmetro	<i>full model</i>	<i>f=0</i>	<i>theta=0</i>	<i>f free</i>
DIC	4017.7	4027.47	5116.18	4190.4
Dbar	3429.68	3432.53	4884.86	3489.84

A análise de agrupamento genético apresentou maior probabilidade para quatro *clusters* genéticos ($K=4$) (Figura 4a). Cada *pool* gênico foi encontrado predominantemente dentro de cada uma das localidades analisadas, o que indica

diferenciação genética entre as localidades correspondendo a quatro populações: IPJ em Ipojuca–PE, MRU em Maraú–BA, SCC em Santa Cruz de Cabralia–BA e VLV em Vila Velha–ES. Embora cada *pool* gênico tenha sido predominante em distintas populações, também foi observado indivíduos em todas as populações com perfil genético formado por mais de um *pool* genético (Figura 4b).

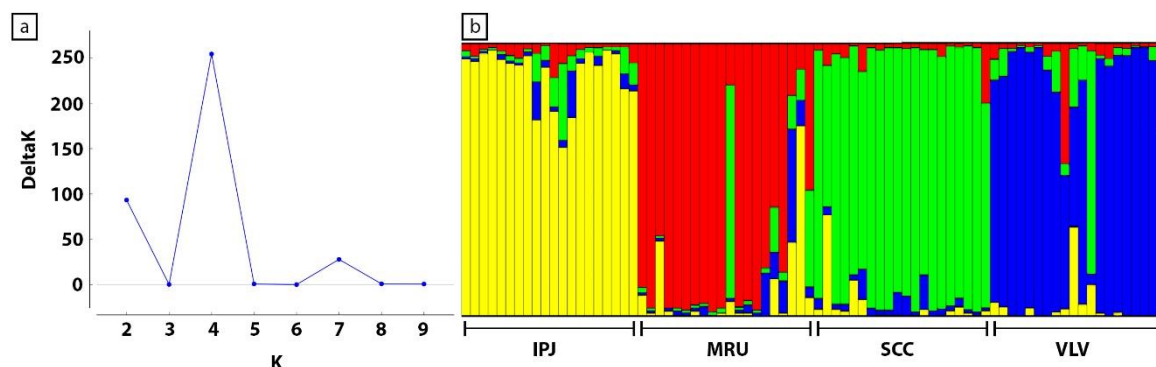


Figura 4. Inferência de clusterização bayesiana, com base em ISSR, nas populações de Ipojuca (IPJ), Maraú (MRU), Santa Cruz de Cabralia (SCC) e Vila Velha (VLV). a) Probabilidade de Delta K para K de 1 a 9; b) Representação de quatro clusters genéticos para os 80 indivíduos analisados representados em cada barra vertical, com a proporção da cor correspondendo ao valor inferido para cada *cluster*.

A árvore de distância genética obtida por método de Neighbor–Net particionou os indivíduos analisados em quatro grupos que correspondem às quatro populações analisadas. O grupo 1 foi composto na sua maioria por indivíduos da população MRU, exceto por dois indivíduos provenientes das populações IPJ e VLV. Os grupos 2 e 3 foram compostos pelas populações IPJ e VLV, respectivamente, com exceção de um indivíduo da população MRU no grupo 2 e um indivíduo de SCC no grupo 3. Por sua vez, o grupo 4 foi representado por indivíduos da população SCC e além de dois indivíduos provenientes das populações MRU e VLV (Figura 5).



Figura 5. Árvore de distância genética baseada em ISSR e método de Neighbor-Net, com representação dos 80 indivíduos das populações Ipojuca (IPJ), Maraú (MRU), Santa Cruz de Cabralia (SCC) e Vila Velha (VLV) distribuídos em quatro agrupamentos.

A disposição dos indivíduos na árvore indica que o maior distanciamento genético está entre as populações. Além disso, foi possível observar que os quatro grupos são proporcionalmente distantes geneticamente uns dos outros.

4.3 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL POR DNAMT

As sequências dos genes COI e 16S apresentaram 99% de similaridade quando comparadas às sequências dos mesmos genes depositadas no NCBI para a espécie

Dichotomius schiffleri (ID: NC_039689.1), confirmando a identidade das sequências utilizadas. As sequências dos genes COI e 16S amplificadas foram as posições 1454 a 2075pb e 12760 a 13220pb, respectivamente do genoma mitocondrial de *D. schiffleri*.

As sequências concatenadas dos genes COI e 16S de 37 indivíduos analisados apresentaram tamanho total de 1093 pb. Nesse conjunto de sequências, foram obtidos 67 sítios variáveis, sendo 14,9% de duplicações e 85,1% de substituições. Não foram identificadas inversões ou deleções.

A partir da análise das sequências concatenadas foi obtido número médio de haplótipos de 7,75. Por sua vez, a diversidade haplotípica média foi de 0,95, sendo considerada alta, enquanto que a diversidade nucleotídica foi baixa com valor de 0,0055. Esta diferença indica que os haplótipos amostrados apresentam baixa divergência de nucleotídeos entre si (Tabela 6).

Tabela 6. Índices de diversidade genética e testes de neutralidade por população, com base nas sequências concatenadas do DNAm (COI e 16S).

Populações	Nº de sequências	Nº Hap	Hd	Π	D de Tajima	F_s de Fu
Ipojuca – IPJ	7	7	1,00	0,004	-0.574	-3.341
Maraú – MRU	11	8	0,92	0,004	1.274	-1.792
Santa Cruz de Cabrália – SCC	9	9	1,00	0,005	-0.577	-4.063
Vila Velha – VLV	10	7	0,91	0,002	-0.008	-3.857
Média	9,25	7,75	0,95	0,003	–	–

Número de haplótipos (Nº Hap); Diversidade haplotípica (Hd); Diversidade nucleotídica (Π).

Os valores dos índices de diversidade genética obtidos na análise das sequências do COI e do 16S separadamente são apresentados na Tabela 7. A diversidade haplotípica variou de 0,79 a 0,93 para o COI, enquanto que os valores obtidos a partir do o 16S variaram de 0,37 a 0,94. A diversidade nucleotídica obtida a partir do COI variou de 0,0038 a 0,0063 e para o 16S os valores foram muito próximos de zero.

Tabela 7. Índices de diversidade genética e testes de neutralidade por população com base no DNAMt (COI e 16S).

Populações	Nº de sequências	Nº Hap	Hd	Π	Nº de sequências	Nº Hap	Hd	Π
	COI				16S			
Ipojuca – IPJ	9	7	0,93	0,0062	7	3	0,66	0,001
Maraú – MRU	11	6	0,79	0,0063	11	2	0,43	0,000
Santa Cruz de Cabralia – SCC	11	8	0,93	0,0056	9	7	0,94	0,000
Vila Velha – VLV	10	6	0,83	0,0038	10	3	0,37	0,000
Média	10,25	6,75	0,87	0,0055	9,25	3,75	0,60	0,000

Número de haplótipos (Nº Hap); Diversidade haplotípica (Hd); Diversidade nucleotídica (Π).

Na análise dos testes de neutralidade foi obtido valor de 1.1138 ($p= 0,91$) para o teste D de Tajima e $-12,4406$ ($p= 0,003$) para o teste de neutralidade F_s de Fu. O valor obtido para o D de Tajima indicou seleção estabilizadora, enquanto que o F_s de Fu indicou seleção purificadora, porém apenas o valor obtido para este último teste foi estatisticamente significativo, assim baseado nesse dado a hipótese de neutralidade foi rejeitada (Tabela 6). Por outro lado, a distribuição de incompatibilidades entre pares de haplótipos (*Mismatch distribution*) apresentou distribuição multimodal das frequências observadas, indicando equilíbrio demográfico, no entanto, sem significância estatística ($SSD= 0.005 / p= 0.89$) (Figura 6).

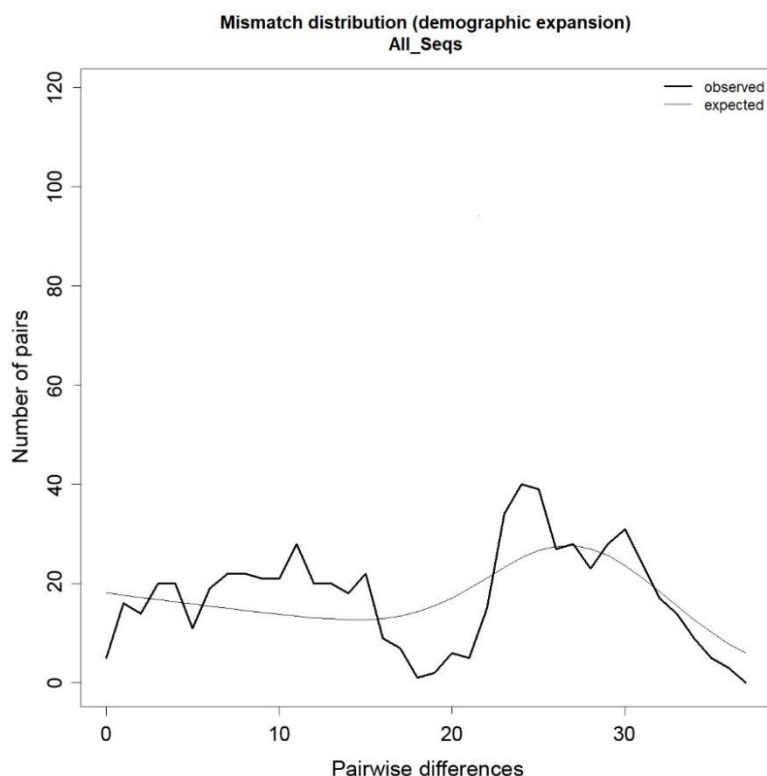


Figura 6. Distribuição de diferenças par a par das sequências concatenadas do DNAm (COI e 16S).

A análise de variância molecular (AMOVA), utilizando as sequências concatenadas (COI e 16S), apresentou 78.03% de variação molecular entre as populações, indicando alta diferenciação genética, semelhantes aos valores de variância molecular entre as populações obtidos com os dados do COI e do 16S separadamente (Tabela 8). O valor de Φ_{ST} obtido para as sequências concatenadas foi de 0,78, enquanto que para as sequências do COI foi de 0,79 e 0,76 para o 16S.

Tabela 8. Análise de Variância Molecular (AMOVA) não hierárquica com base nas sequências do DNAm.

–	Fonte da variação	Graus de liberdade	Componentes da variância	Variação (%)
COI e 16S	Dentro das populações	3	8,790 Va	78,03
	Entre as populações	33	2,475 Vb	21,97
COI	Dentro das populações	3	7,274 Va	79,06
	Entre as populações	37	1,927 Vb	20,94
16S	Dentro das populações	3	1,704 Va	76,31
	Entre as populações	33	0,529 Vb	23,69

Na análise de Φ_{ST} par a par foi obtido valor mais baixo entre IPJ e MRU e mais alto entre IPJ e SCC, com base nas sequências concatenadas (COI e 16S) (Figura 7a). Na análise de Φ_{ST} par a par baseada nas sequências do gene COI e 16S analisadas separadamente foram obtidos valores mais altos entre IPJ e SCC para os dados do gene COI e mais altos entre MRU e VLV para o 16S, enquanto que os valores mais baixos foram entre IPJ e MRU tanto para o COI, como para o 16S (Figura 7b, c).

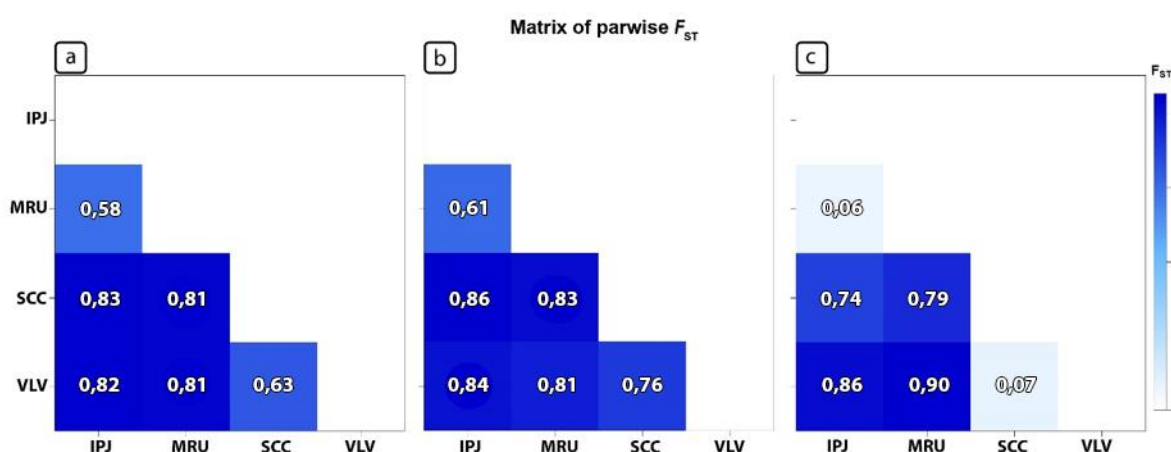


Figura 7. Distribuição dos valores de Φ_{ST} par a par entre as populações de Ipojuca-IPJ, Maraú-MRU, Santa Cruz de Cabralia-SCC e Vila Velha-VLV. a) Φ_{ST} par a par com base nas sequências do DNAm (COI e 16S); b) Sequências do COI; c) Sequências do 16S.

No teste de Mantel realizado com base nas sequências concatenadas (COI e 16S) não foi obtida correlação entre as distâncias genéticas e geográficas ($r=0,000059$; $c=0,281750$), indicando ausência de isolamento por distância (IBD) e

sem significância estatística ($p=0,25$). Com base nas sequências do COI ($r=0,000032$; $c=0,187784$; $p=0,33$) também não foi obtida correlação, assim como para o 16S ($r=0,000215$; $c=0,292002$; $p=0,16$)

Na rede de haplótipos feita com base nas sequências concatenadas do DNAm (COI e 16S) foram identificados 31 haplótipos distribuídos em quatro grupos haplotípicos, com cada haplogrupo encontrado separadamente em distintas populações, ou seja, nenhum dos haplótipos foi compartilhado entre populações. Desta forma, os haplótipos dos grupos I, II, III e IV foram observados nas populações Vila Velha – VLV, Santa Cruz de Cabralia – SCC, Maraú – MRU e Ipojuca – IPJ, respectivamente (Figura 8).

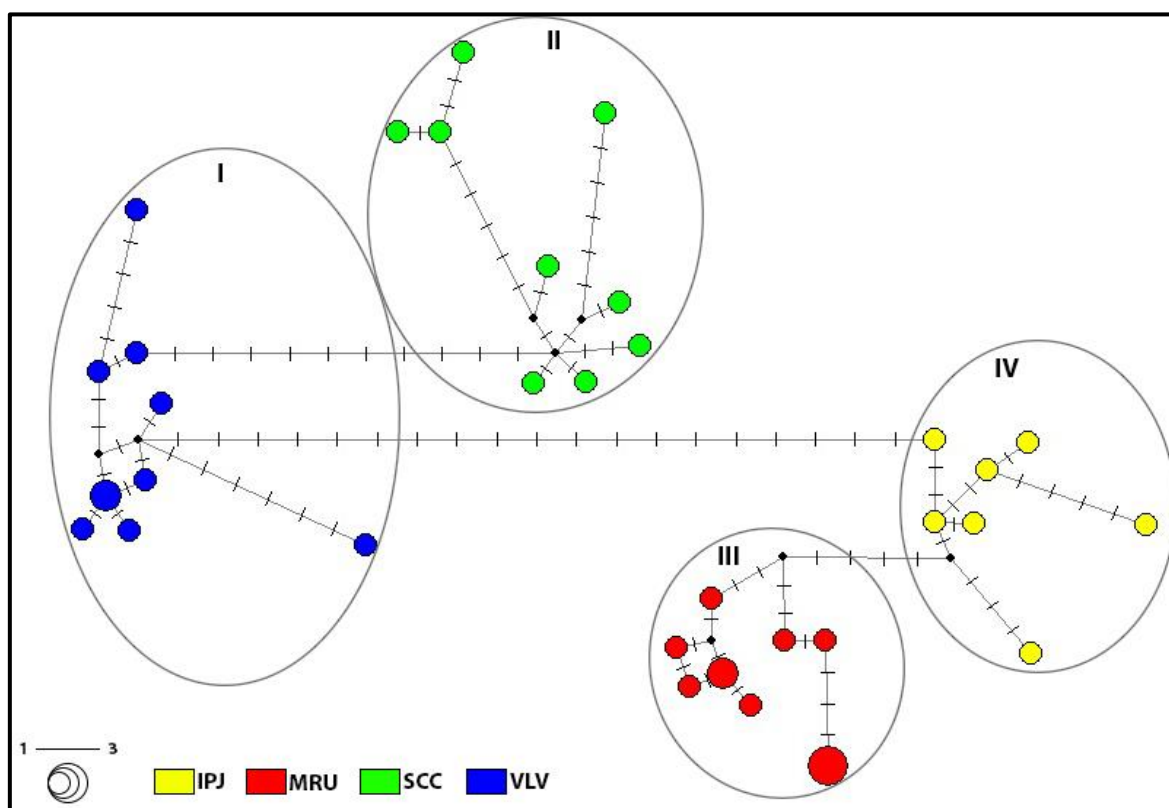


Figura 8. Rede de haplótipos com base no DNAm (COI e 16S), com quatro haplogrupos que correspondem a cada uma das quatro populações de Ipojuca–IPJ, Maraú–MRU, Santa Cruz de Cabralia–SCC e Vila Velha–VLV.

Todos os grupos haplotípicos apresentaram distanciamento genético entre si, sendo cada grupo separado por pelo menos nove passos mutacionais e estes haplogrupos estão geralmente conectados uns aos outros por meio de vetores médios que podem não refletir a real divergência genética entre eles. Este padrão pode estar

relacionado à grande divergência acumulada entre as populações ao longo de várias gerações após isolamento entre estas.

O padrão da rede de haplótipos para as sequências do gene COI foi similar a organização obtida para as sequências concatenadas, com quatro haplogrupos distribuídos em cada uma das quatro populações (Figura 9a). Enquanto que para o 16S, foi obtido compartilhamento de haplótipos entre as populações devido a maior conservação da região analisada, sendo este compartilhamento mais evidente entre as populações de IPJ e MRU e entre as populações de SCC e VLV (Figura 9b).

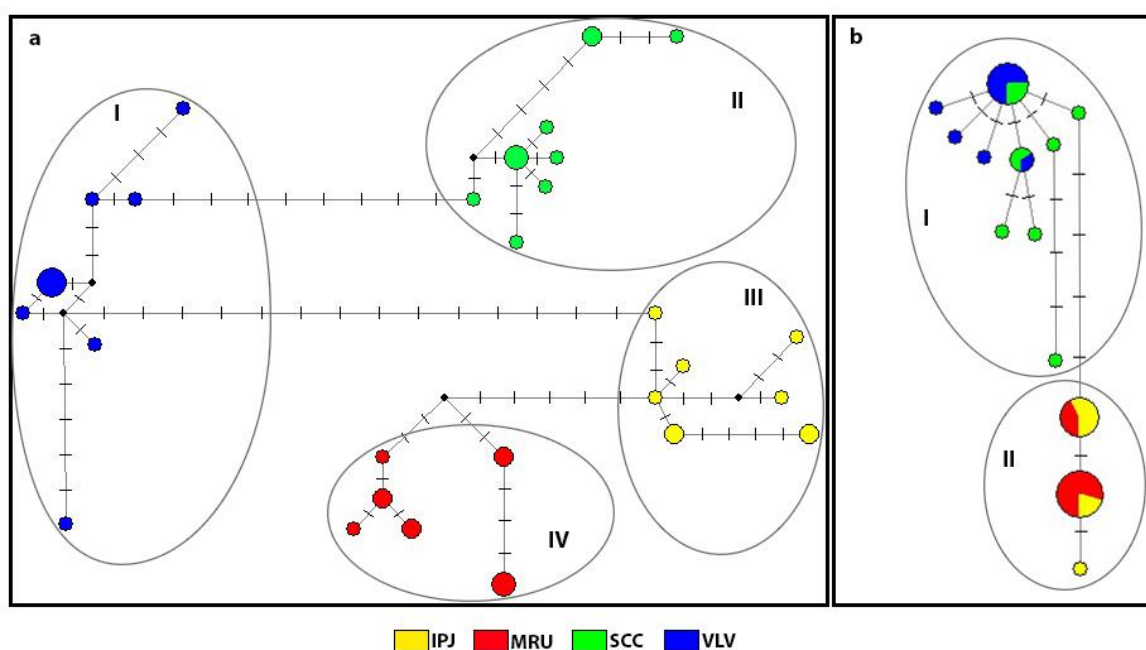


Figura 9. Rede de haplótipos para as populações de Ipojuca – IPJ, Maraú – MRU, Santa Cruz de Cabralia – SCC e Vila Velha – VLV, com base no DNAm. a) Rede baseada no gene COI com quatro haplogrupos, exclusivos de cada uma das quatro populações; b) Haplótipos distribuídos em dois grupos, com base nos dados do gene 16S.

A análise de estruturação populacional realizada no BAPS, baseada nas sequências do COI, apresentou maior probabilidade para quatro agrupamentos genéticos que correspondem a cada população analisada. Os grupos genéticos representados em amarelo e vermelho estão distribuídos exclusivamente nos indivíduos das populações IPJ e MRU, respectivamente, enquanto que os grupos genéticos representados em verde e azul encontram-se distribuídos nas populações SCC e VLV, esta distribuição indica correlação dos haplótipos à localização geográfica (Figura 10a).

Na estruturação genética a partir dos dados do 16S foram obtidos dois grupos, um com as populações de IPJ e MRU representado em vermelho e outro com as populações de SCC e VLV em verde (Figura 10b). Enquanto que a estruturação obtida a partir dos concatenados do DNAm (COI e 16S) apresentou três agrupamentos genéticos, um grupo composto pelas populações de IPJ e MRU representado em vermelho, o segundo grupo com a população de SCC em verde e o terceiro com a população de VLV em azul. Este dado sugere menor distanciamento entre as populações de IPJ e MRU (Figura 10c).

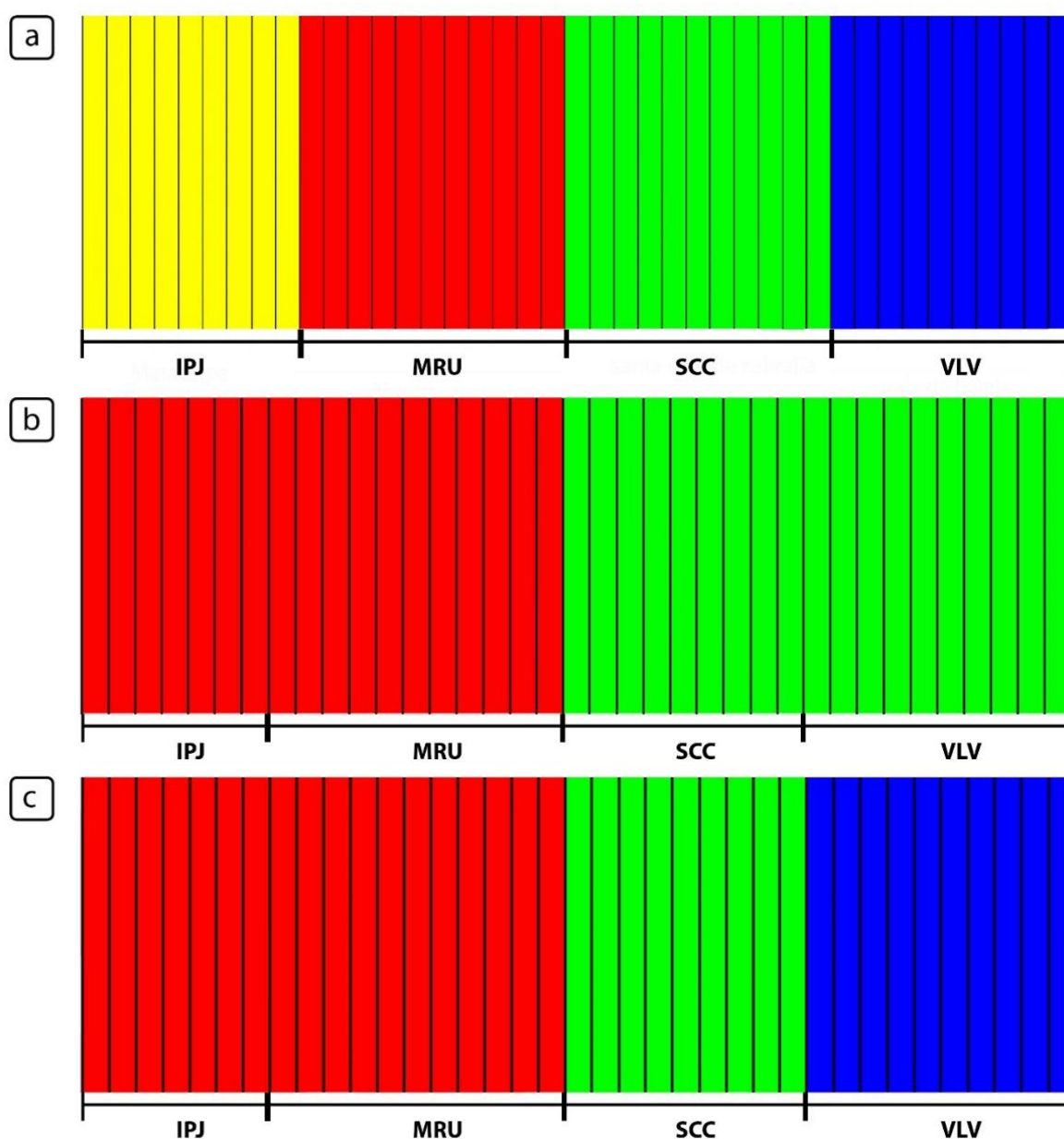


Figura 10. Atribuição de *clusters* genéticos nas populações de Ipojuca–IPJ, Maraú–MRU, Santa Cruz de Cabralia–SCC e Vila Velha–VLV, com base no DNAm. a) Representação de quatro *clusters* para 41 indivíduos com base nos dados do gene COI; b) Dois *clusters* para 37 indivíduos com base no gene 16S; c) Três *clusters* para 37 indivíduos com base nas sequências concatenadas (COI e 16S).

5 DISCUSSÃO

5.1 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL

O potencial evolutivo das espécies é mantido pela diversidade genética, e esta é mais facilmente retida em populações com alto censo populacional, pois teoricamente são populações com maior tamanho efetivo e sofrem menos os efeitos da deriva genética (Frankham, 1996; Mace et al., 2008; Frankham 2008; Vieira et al., 2011; Costa et al., 2014).

Na espécie *D. schiffleri* são observadas populações numerosas, no entanto, suas populações podem ser reduzidas devido a alterações no ambiente (Vieira et al., 2011). Estas alterações podem ser ocasionadas por ações antrópicas que ocorrem devido à urbanização das áreas costeiras e também, por modificações naturais caracterizadas por inundações subterrâneas periódicas que ocorrem desde a formação das restingas (Suguio e Tessler 1984; Suguio e Martin, 1987; Silva, 1999).

Desse modo, apesar de *Dichotomius schiffleri* apresentar populações com grande número de indivíduos, era esperado que ocorresse redução na diversidade genética de suas populações remanescentes. Contudo, foram obtidos altos valores para os índices de diversidade genética a partir do DNAmT similares aos mesmos índices em comparação com espécies próximas, como os besouros *Gymoplerus mopsus* Pallas, 1781 (Kang et al., 2018) e *Canthon cyanellus cyanellus* LeConte, 1859 (Nolasco et al., 2017).

Além destes, também encontramos altos valores do índice de Shannon e das porcentagens de diversidade genética observadas através do ISSR quando comparamos à estudos baseados nesse marcador em diferentes espécies de insetos, como na espécie de psocoptera, *Liposcelis bostrychophila* (Wang et al., 2016), na abelha *Apis mellifera meda* (Rahimi et al., 2016) e no besouro *Canthon staigi* (Ferreira–Neto et al., 2017).

A similaridade dos altos índices de diversidade genética encontrados em *D. schiffleri* em relação a populações de outras espécies de insetos que também estão diferenciadas geneticamente, possivelmente se deve à manutenção de grandes populações de *D. schiffleri*. Estas populações podem ser supridas pela geração de proles suficientemente numerosas, para compensar as reduções populacionais

provocadas pelas modificações na restinga e assim amortizar o impacto da perda de diversidade genética (Vieira et al., 2011; Favila, 1993; Didham et al., 1996).

O tamanho efetivo populacional está diretamente relacionado à influência dos fatores evolutivos sob as populações, assim o entendimento sobre possíveis eventos de expansão e retração populacional de *D. schiffleri*, é importante para direcionar o manejo e conservação dessa espécie. No entanto, o teste D de Tajima e a análise de *mismatch distribution* que revelam o padrão demográfico permanecem inconclusivos pois, não houve significância estatística (Templeton, 2011). Assim, através dessas análises não foi possível concluir sobre possíveis eventos de expansão populacional em *D. schiffleri* no Pleistoceno, como visto para outras espécies de besouros de distribuição Neotropical como *Canthon cyanellus cyanellus* e *Dendroctonus pseudotsugae* (Nolasco et al., 2017; Hanski e Cambefort 1991).

Por outro lado, o teste de neutralidade F_s de F_u indicou sinais de seleção purificadora sugerindo frequentes reduções populacionais balanceadas por expansões subsequentes. Isto pode ser resultado de reduções temporais no número de indivíduos das populações remanescentes de *D. schiffleri* em consequência da ação das enchentes periódicas que ocorrem desde a formação das restingas, seguidas pelo surgimento de grandes proles (Favila, 1993; Didham et al., 1996; Silva, 1999; Vieira et al., 2011). Evidências semelhantes de valores negativos para o F_s de F_u , foram também registradas para os besouros *Henosepilachna vigintioctopunctata* Fabricius (Karthika et al., 2016) e *Pteroptyx tener* Olivier, 1902 (Cheng et al., 2019) que apresentaram expansão após reduções populacionais.

A alta variância molecular dentro das populações, a partir dos dados do ISSR na análise de AMOVA, podem ter levado os valores de Φ_{ST} a serem estimados próximos de zero, ocultando a evidência de diferenciação genética das populações (Excoffier, 1992; Michalakis e Excoffier, 1996). Desse modo, os baixos valores de Φ_{ST} podem ser considerados representativos de diferenciação genética significativa, como visto nos estudos com os insetos *Bemisia tabaci* Gennadius, *Sogatella furcifera*, *Eyprepocnemis plorans plorans* e *Eccritotarsus catarinenses* Carvalho (Liu et al., 2009; Taylor et al., 2011; Templeton, 2011; Bouktila et al., 2013; Manrique–Poyato et al., 2013).

Na análise de variância molecular utilizando sequências do DNAm (COI e 16S) foi observada alta variância entre as populações, além de altos valores de Φ_{ST} , ambos com a indicação de diferenciação genética entre as populações. Os genes COI e 16S são frequentemente utilizados para análise da estrutura genética populacional de

insetos, como visto nos besouros *Crioceris quatuordecimpunctata* Scopoli, 1763 (Kubisz et al., 2012), *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier 1790 (Yasin et al., 2016) e *Pteroptyx tener* Olivier 1902 (Cheng et al., 2019).

A diferenciação genética observada entre as populações de *D. schiffleri* pode estar relacionada à configuração descontínua dos remanescentes de restinga (Toczydlowski e Waller, 2019). Esta configuração contribui para o isolamento dos remanescentes, e conseqüentemente para a formação de uma barreira ao fluxo gênico entre as populações de *D. schiffleri*, o que é reforçado pela sua especificidade à restinga (Shalene e Kremen, 2013).

A maior similaridade genética entre as populações de IPJ e MRU e entre SCC e VLV, sugere que a distribuição de variabilidade genética de *D. schiffleri* pode ter sido influenciada também por uma barreira ainda mais efetiva. Desse modo, é sugerido que a subdivisão da restinga em “nordeste” e “oriental”, que se dividem na Baía de todos os Santos e estão distintamente agrupadas principalmente devido à características do solo, pode representar uma barreira significativa (Silva, 1999; Suguio, 2010). Uma vez que, as características do solo da restinga como pH, salinidade, granulidade e entre outras, são importantes barreiras que influenciam na dispersão de diferentes espécies da fauna e flora, e portanto, tais diferenças na composição e dispersão de espécies, podem afetar também a distribuição de *D. schiffleri* (Bradshaw, 2006; Bello et al., 2011; Leps et al., 2011).

A subdivisão populacional devido a ausência de fluxo gênico leva a perda e/ou fixação de alelos pelo aumento da ação da deriva genética (Templenton, 2011). Cada subpopulação sofre os efeitos aleatórios da deriva, levando a desvios de heterozigosidade nas subpopulações em relação ao total, como sugerido pelo modelo *full model*, isto ocorre pela ação de fatores estocásticos que levam à redução do tamanho populacional em cada subpopulação e à conseqüente perda de diversidade genética (Nunney e Elam 1994).

Assim como visto em *Liposcelis bostrychophila* (Wang et al., 2016), as atividades antrópicas podem ter levado à redução do tamanho das populações de *D. schiffleri* e somado a ausência de fluxo gênico entre suas populações remanescentes, o efeito da deriva genética pode ser potencializado.

Apesar da evidente diferenciação genética, a análise de clusterização apresentou uma pequena proporção de mistura genética entre as populações, provavelmente isto pode ser devido à diferentes regiões acessadas pelo marcador

ISSR, podendo estas terem taxas evolutivas distintas, e assim esta mistura genética representar resquícios de uma ancestralidade comum, proveniente de *loci* mais conservados (Zietkiewicz et al., 1994).

5.2 IMPLICAÇÕES PARA CONSERVAÇÃO

Os parâmetros acerca da ecologia de *Dichotomius schiffleri*, como distribuição restrita e ocorrência preferencialmente em restinga são importantes fatores para conservação da espécie, e além destes, os aspectos genéticos também devem ser observados para melhor atribuição de medidas conservacionistas, uma vez que são fatores críticos para identificar vulnerabilidade populacional (Vieira et al., 2008; Vieira et al. 2011). Principalmente, por que apenas os critérios ecológicos são levados em consideração para a atual classificação do *status* de conservação da espécie (Mace et al., 2008; Vieira et al., 2011).

O sucesso na conservação de *D. schiffleri* está atrelado aos níveis de diversidade genética de suas populações, e todas as populações aqui analisadas, Ipojuca (IPJ), Maraú (MRU), Santa Cruz de Cabralia (SCC) e Vila velha (VLV), apresentaram níveis similares de diversidade genética. Apesar desta semelhança, estas populações têm diferentes níveis de alteração no ambiente, como o esperado nas populações de SCC e VLV que se encontram em remanescentes sem proteção legal, devido à maior facilidade de ocorrência da exploração de recursos naturais, poluição e desmatamento (ICMBio, 2019).

Dessa forma, não foi identificada vulnerabilidade genética entre as populações analisadas, no entanto, os eventos de alteração antrópica na restinga ainda podem ser recentes para que sejam observados impactos nos níveis de diversidade genética. O evento mais antigo registrado data de 1996 com a ocorrência de queimada na Ilha do Guriri–ES que levou à reduções drásticas das populações de *D. schiffleri* (Louzada et al., 1996).

Contudo, as modificações de habitat tendem à aumentar devido a tendência do desenvolvimento econômico no litoral, assim remanescentes da restinga sem proteção legal, como os locais das populações de SCC e VLV, são alvos para a ocorrência de tais modificações, sendo então necessário atenção especial quanto sua conservação, por meio de medidas como a proteção legal dos remanescentes, para

manutenção dos níveis de diversidade genética das populações de *D. schiffleri* (Frankham, 2005; Vieira et al., 2008; ICMBio, 2019).

Além das modificações antrópicas, as enchentes periódicas que ocorrem desde a formação das restingas, podem exercer influência sob a diversidade genética, uma vez que levam a reduções populacionais. No entanto, diferentes das modificações antrópicas, estas podem ter maior atuação na eliminação de ovos que não podem realocar-se, levando à perda de indivíduos aparentados e isso pode estar relacionado aos sinais de seleção purificadora, como visto em *D. schiffleri*, uma vez que há um considerável número de haplótipos e principalmente, haplótipos divergentes entre si. Esta seleção purificadora pode estar atuando através de flutuações populacionais nas populações isoladas, e contribuindo com o aumento da diferenciação genética entre as populações de *D. schiffleri* (Nunney e Elam 1994).

A diferenciação genética entre todas as populações é uma forte evidência para conferir à elas o termo “unidades significativamente evolutivas” (ESUS) (Moritz, 1994), devendo estas serem consideradas como unidades de manejo distintas, levando em consideração o isolamento genético ocorrido nessas populações, como resultado da estrutura descontínua das restingas e suas mudanças geomorfológicas (Silva, 1999; Suguio et al., 2010).

A evidente diferenciação genética entre as populações de *D. schiffleri* é um importante aspecto que induz ao questionamento sobre as consequências evolutivas para estas populações, mais precisamente a possibilidade de ocorrer especiação alopátrica devido ao isolamento geográfico, pressão de seleção local, mutações e efeito de deriva genética. Este é um cenário que pode levar ao acúmulo de diferenças entre os indivíduos destas populações ao longo das gerações e surgimento de um possível isolamento reprodutivo (Rundle e Nosil, 2005; Saphiro et al., 2016). Portanto, estes dados elucidam informações genéticas relevantes quanto ao efeito da estrutura e modificações no habitat, na genética e evolução da espécie, assim estas informações auxiliam o entendimento do seu atual status e devem ser considerados para fins de conservação da espécie.

6 CONCLUSÕES

- As reduções populacionais de *Dichotomius schiffleri* provocadas pelas modificações na restinga não afetaram os níveis de diversidade genética da espécie, não sendo observadas populações com maior fragilidade populacional.
- A distribuição descontínua da restinga e especificidade de habitat de *Dichotomius schiffleri* favoreceu o isolamento genético entre todas as populações, definindo unidades de manejo distintas para cada população.
- As enchentes periódicas nas restingas arbóreas, resultaram em seleção purificadora, aumentando a estruturação genética de *Dichotomius schiffleri*.

REFERÊNCIAS

- AMARAL ACZ, CORTE GN, ROSA-FILHO JS, DENADAI MR, COLLING LA, BORZONE C, VELOSO V, OMENA EP, ZALMON IR, ROCHA-BARREIRA CA, SOUZA JRB, ROSA LC E ALMEIDA TCM. Brazilian sandy beaches: characteristics, ecosystem services, impacts, knowledge and priorities. **Brazilian Journal of Oceanography** 64:5–16, 2016.
- AMORIM LLB. Construção de um mapa genético para feijão-caupi com marcadores moleculares ISSR, DAF e CAPS. 2009. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – CCB, Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2009.
- ARAÚJO DSD, PEREIRA MCA E PIMENTEL MCP. Flora e estrutura de comunidades na restinga de Jurubatiba – síntese dos conhecimentos com enfoque especial para a formação Aberta de Clusia. In: Rocha CFD, Esteves FA, Scarano FR (org) **Pesquisa de longa duração na restinga de Jurubatiba – ecologia, história natural e conservação**. São Carlos, Ed. Rima, pp. 59–76, 2004.
- AVISE JC, ARNOLD J, BALL RM, BERMINGHAM E, LAMB T, NEIGEL JE, REEB CA E SAUNDERS NC. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. **Annu Rev Ecol Syst** 18:489–522, 1987.
- AVTZIS DN, LAKATOS F, GALLEGGO D, PERNEK M, FACCOLI M, WEGENSTEINER R E STAUFFER C. Shallow Genetic Structure among the European Populations of the Six-Toothed Bark Beetle *Ips sexdentatus* (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae). **Forests** 10:136, 2019.
- AYRES, M. BIOESTAT – **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. 5. ed. Belém, 364p., 2007.
- BANDELT HJ, FORSTER P e ROHL A. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. **Mol Biol Evol** 16:37–48, 1999.
- BARBOSA NCCP, FREITAS S DE E MORALES AC Distinct genetic structure in populations of *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera, Chrysopidae) shown by genetic markers ISSR and COI gene. **Rev Bras Entomol** 58:203–211, 2014.
- BARRETTO JW, CULTID-MEDINA CA E ESCOBAR F. Annual Abundance and Population Structure of Two Dung Beetle Species in a Human-Modified Landscape. **Insects** 10, 2, 2019.
- BEHURA SK Molecular marker systems in insects: Current trends and future avenues. **Mol Ecol** 15:3087–3113, 2006
- BEIROZ W, VIEIRA L E LOUZADA J. Ecological similarity promotes coexistence between taxonomically related dung beetle's species. **Acta Oecologica** 96:29–34, 2019.

BELLO F, LAVOREL S, ALBERT CH, THUILLER W, GRIGULIS K, DOLEZAL J, JANEČEK S E LEPSŠ J. Quantifyin the relevance of intraspecific trait variability for functional diversity. **Methods in ecology and evolution** p 163–174, 2011.

BONFIELD JK, BEAL KF, BETTS MJ E STADEN R. Trev: a DNA trace editor and viewer. **Bioinformatics Applications Note** 18:194–195, 2002.

BORNET B E BRANCHARD M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. **Plant Mol Bio Rep** 19:209–215, 2001.

BOUKTILA D, EL-MNOUCHI-SKHIRI S, MEZGHANI-KHEMAKHEM M, MAKNI H E MAKNI M. Genetic Structure of The Whitefly Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) in Tunisia, Inferred from RAPD markers. **J. of Entomo. and Zoo Stud** 1: 10–15, 2013.

BRADSHAW AD. Unravelling phenotypic plasticity – why should we bother? **New Phytologist**. 170, pp 644–648, 2006.

BROWNE J E SCHOLTZ CH. A phylogeny of the families of Scarabaeoidea (Coleoptera). **Syst Entom** 24:51–84, 1999.

BUHROO ZI, BHAT MA, GANAI NA, KAMILI AS, BALI GK E AZIZ A. An efficient protocol for the inter-simple sequence repeat (ISSR) marker approach in population genetic studies. **Journal of Entomology and Zoology Studies** 6:597–600, 2018.

CABRAL-DE-MELLO DC, MOURA RC, MELO AS E MARTINS C. Evolutionary dynamics of heterochromatin in the genome of Dichotomius beetles based on chromosomal analysis. **Genetica** 139:315–325, 2011.

CARNAVAL, AC, HICKERSON MJ, HADDAD CFB, RODRIGUES MT E MORITZ C. Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. **Science** 323:785–789, 2009.

CHENG S, MUNIAN K, SEK-AUN T, FAIDI MA E ISHAK SF. Mitochondrial DNA diversity and gene flow in Southeast Asian populations of the synchronously flashing firefly, Pteroptyx tener Olivier (Coleoptera: Lampyridae). **Orient Insects** 00:1–22, 2019.

CORANDER J E TANG J. Bayesian analysis of population structure based on linkedmolecular information. **Mathematical Biosciences** 205:19–31, 2007.

CORRÊA BS, LOUZADA JNC E MOURA AS. Descrição de critérios utilizados atualmente para compor as listas de espécies ameaçadas e endêmicas. **Rev Agrogeoambiental** 3:105–117, 2011.

COSTA CMQ, BARRETO JW E MOURA RC. Changes in the dung beetle community in response to restinga forest degradation. **J Insect Conserv** 18:895–902, 2014.

DEAN W. A ferro e fogo: A história e devastação da Mata Atlântica brasileira. **Companhia das Letras**, São Paulo, 382 p., 1996.

DIDHAM RK, GHAZOUL J, STORK NE E DAVIS AJ. Insects in fragmented forests: a functional approach. **Tree** vol. II, no. 6 June 1996.

EARL DA, VONHOLDT BM. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. **Conserv. Genet. Resour** 4:359–361, 2012.

ELLEGREN H E GALTIER N. Determinants of genetic diversity. **Nat Ver Genet** 17:422–33, 2016.

EVANNO G, REGNAUT S E GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Mol Ecol** 14:2611–20, 2005.

EXCOFFIER L E LISCHER EL Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Mol Ecol Resour** 10:564–567, 2010.

EXCOFFIER L, SMOUSE PE E QUATTRO JM. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. **Genetics Society of America** 131: 479–491, 1992.

FAVILA ME. Some ecological factors affecting the life–style of *Canthon cyanellus cyanellus* (Coleoptera Scarabaeidae): an experimental approach. **Ethology Ecology & Evolution** 5: 319–328, 1992.

FERREIRA–NETO CA, CRUZ GAS, AMORIM IC, BALBINO VQ E MOURA RC. Effects of fragmentation and anthropic pressure on the genetic structure of *Canthon (Peltecanthon) staigi* (Coleoptera: Scarabaeidae) populations in the Atlantic Forest domain. **J Insect Conserv** 21:267–276, 2017.

FOLMER O, BLACK M, HOEH W, LUTZ R, E VRIJENHOEK R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology** 3: 294–299, 1994.

FRANKHAM R. Relationship of Genetic Variation to Population Size in Wildlife. **Conserv Biol** 10:1500–1508, 1996.

FRANKHAM R. Genetics and extinction. **Biol Conserv** 126:131–140, 2005.

FRANKHAM R, BALLOU JD E BRISCOE D. **Fundamentos de Genética da conservação**. São Paulo, SBG ,261 p., 2008.

FU YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics** 147:915–925, 1997.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, <http://www.sosmatatlantica.org.br/>, acessado em 22 de junho, 2019.

GUEDES D, BARBOSA LM, E MARTINS SE. Composição florística e estrutura fitossociológica de dois fragmentos de floresta de restinga no Município de Bertioga, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 20:299–311, 2006.

GÜLER A, KARAKOÇ E, GÖKDERE G, DOĞAÇ E E TASKIN V. Genetic structure of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) populations from Turkey revealed by mitochondrial DNA markers. **J Genet** 98:57, 2019.

HALFFTER G E MATTHEWS EG.) The natural history of dung beetles of the subfamily Scarabaeinae (Coleoptera, Scarabaeidae). **Folia Entomológica Mexicana** 12–14: 1–312, 1966.

HALFFTER G. Historical and ecological factors determining the geographical distribution of beetles (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae). **The Journal of Integrative Biogeography** 15:11–40, 1991.

HALFFTER G E EDMONDS WD. The Nesting Behavior of dung–Beetles Scarabaeinae. **Ecol. and Evol.** Apr. 91:512–515, 1982.

HANSKI I, CAMBEFORT Y. Dung Beetle Population Biology. In: Dung beetles ecology. New Jersey, **Princeton University** Press, pp 36–50, 1991.

HENDRY E KINNISON. The pace of modern life II: from rates of contemporary microevolution to pattern and process. **Genetica** 112–113:145–164, 2001.

HOLLAND BR, CLARKE AC E MEUDT HM. Optimizing automated AFLP scoring parameters to improve phylogenetic resolution. **Syst Biol** 57:347–366, 2008.

HOLSINGER KE E WEIR, BS. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . **Phylogenetics** 10: 639–650, 2009.

HOLSINGER KE, LEWIS PO E DEY DK. A Bayesian method for analysis of genetic population structure with dominant marker data. **Mol Ecol** 11:1157–1164, 2002.

HUSON DH. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. **Bioinformatics** 14:68–73, 1998.

INSTITUTO CHICO MENDES BIO, <http://www.icmbio.gov.br/portal/>, acessado em 9 de novembro de 2019.

JOHNSON M, ZARETSKAYA I, RAYTSELIS Y, MERZHUHUK Y, MCGINNIS S E MADDEN TL. NCBI BLAST: a better web interface. **NucleicAcids Research** 36: w5–w9, 2008.

KANG JH, LIM CS, PARK SH, SEOK SW, YOON TJ, BAYARTOGTOKH B E BAE YJ. Historical domestication–driven population expansion of the dung beetle *Gymnopleurus mopsus* (Coleoptera: Scarabaeidae) from its last refuge in Mongolia. **Sci Rep** 8:1–11, 2018.

KAR PK, VIJAYAN K, MOHANDAS TP, NAIR C V., SARATCHANDRA B E THANGAVELU K. Genetic variability and genetic structure of wild and semi-domestic populations of tasar silkworm (*Antheraea mylitta*) ecorace Daba as revealed through ISSR markers. **Genetica** 125:173–183, 2005.

KARTHIKA P, VADIVALAGAN C, KRISHNAVENI N, MURUGAN K, NICOLETTI M, CANALE A E BENELLI G. Contrasting genetic diversity and intra-population polymorphism of the invasive pest *Henosepilachna vigintioctopunctata* (Coleoptera, Coccinellidae): A DNA barcoding approach. **Journal of Asia-Pacific Entomology** 20:23–29, 2017.

KATOH K, ROZEWICKI J E YAMADA KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics** 1–7, 2017.

KUBISZ D, KAJTOCH L, MAZUR MA, LIS A E HOLECOVÁ M. Conservation genetics of highly isolated populations of the xerothermic beetle *Crioceris quatuordecimpunctata* (Chrysomelidae). **Invertebr Biol** 131:333–344, 2012.

KURAKU S, ZMASEK CM, NISHIMURA O E KATOH K. A Leaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. **Nucleic Acids Research** 41:22–28, 2013.

LARSSON A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. **Bioinformatics** 22: 3276–3278, 2014.

LEPŠ J, BELLO F, ŠMILAUER P E DOLEŽAL J. Community trait response to environment: disentangling species turnover vs intraspecific trait variability effects. **Ecography** 34, p 856–863, 2011.

LI G E QUIROS CF. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. **Theor Appl Genet** 103:455–461p, 2001.

LITT M E LUTY JA. A Hypervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene. **Am J Hum Genet** 44:397–401, 1989.

LIU JN, GUI FR E LI ZY. Genetic diversity of the planthopper, *Sogatella furcifera* in the Greater Mekong Subregion detected by inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. **Journal of Insect Science** 10:1–14, 2009.

LOUZADA JNC, SHIFFLER G, VAZ-DE-MELLO, FZ. Efeitos do fogo sobre a composição e estrutura da comunidade de Scarabaeinae (Insecta, Coleoptera) da restinga da ilha de Guriri, Norte do ES, p.161–169. In Miranda HS, Saito CH, Souza Dias BF (eds) Impactos de queimadas em áreas de cerrado e restinga. Brasília, **UnB**, 187p, 1996.

MACE GM, COLLAR NJ, GASTON KJ, HILTON-TAYLOR C, RESIT HAKC, AKAYA, LEADER-WILLIAMS N, MILNER-GULLAND EJ E STUART SN. Quantification of Extinction Risk: IUCN's System for Classifying Threatened Species GEORGINA M. MACE. **Conservation Biology**, 22: 1424–1442, 2008.

MALDANER ME, NUNES RV E VAZ-DE-MELLO FZ. Taxonomic revision of the *Dichotomius speciosus* (Waterhouse, 1891) species group (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae). **Zootaxa** 3986:549–560, 2015.

MANRIQUE-POYATO MI, LÓPEZ-LEON MD, GÓMEZ R, PERFECTTI F E CAMACHO JPM. Population Genetic Structure of the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in the South and East of the Iberian Peninsula. **Plos one** 10:1–10p, 2013.

MARINONI RC E GANHO NG. A diversidade diferencial beta de Coleoptera (Insecta) em uma paisagem antropizada do Bioma Araucária. **Rev. Bras. Entomo** 50: 64–71, 2006.

MEIRMANS PG E HEDRICK PW. Assessing population structure: F_{ST} and related measures. **Mol Ecol Res** 11:5–18, 2011.

MENG L, WANG Y, WEI WH E ZHANG H. Population genetic structure of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae): host-driven genetic differentiation in China. **Sci Rep** 8:1–15, 2018.

METZGER JP, MARTENSEN AC, DIXO M, BERNACCI LC, RIBEIRO MC, TEIXEIRA AMG E PARDINI R. Time-lag in biological responses to landscape changes in a highly dynamic Atlantic forest region. **Biol Conserv** 142:1166–1177, 2009.

MEYER W, MITCHELL TG, FREEDMAN EZ E VILGALYS R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Microbiol** 31: 2274–80, 1993.

MICHALAKIS Y E EXCOFFIER L. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference to microsatellite loci. **Genetics** 142:1061–1064, 1996.

MORAES RM, DELITTI WBC E STRUFFALDI-DE-VUONO Y. Litter fall and litter nureant content two Brazilian Tropical Forest. **Revista Brasileira de Botânica** 50:163–173, 1999.

MORELLATO LPC E HADDAD CFB. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 32:786, 2000.

MORITZ C, DOWLING TE E BROWN WM. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. **Annu Rev Ecol Syst** 18:269–292, 1987.

MYERS N, MITTERMEIER RA, MITTERMEIER CG, FONSECA GAB E KENT J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403:853:853–858, 2000.

NEI M. F–statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Ann Hum Genet** 41:225–233, 1977.

NICHOLS E, LARSEN T, SPECTOR S, DAVIS AL, ESCOBAR F, FAVILA M E VULINEC K. Global dung beetle response to tropical forest modification and fragmentation: A quantitative literature review and meta–analysis. **Biol Conserv** 137:1–19, 2007.

NICHOLS E, SPECTOR S, LOUZADA J, LARSEN T, AMEZQUITA S E FAVILA ME. Ecological functions and ecosystem services provided by Scarabaeinae dung beetles. **Biol Conserv** 141:1461–1474, 2008.

NOLASCO–SOTO J, GONZÁLEZ–ASTORGA J, MONTEROS AE, GALANTE–PATIÑO E E FAVILA ME. Phylogeographic structure of *Canthon cyanellus* (Coleoptera: Scarabaeidae), a Neotropical dung beetle in the Mexican Transition Zone: Insights on its origin and the impacts of Pleistocene climatic fluctuations on population dynamics. **Mol Phylogenet Evol** 109:180–190, 2017.

NUNES RV E VAZ–DE–MELLO FZ. New brachypterous species of *Dichotomius* Hope, with taxonomic notes in the subgenus *Luederwaldtinia* Martínez (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae). **Zootaxa** 3609:411–420, 2013.

NUNES R V E VAZ–DE–MELLO FZ. New brachypterous species of *Dichotomius* (Selenocopris) Burmeister (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) with the definition of species groups and taxonomic notes in the subgenus. **Zootaxa** 4139:76–92, 2016.

NUNES RV E VAZ–DE–MELLO FZ. Taxonomic revision of *Dichotomius* (Cephagonus) Luederwaldt 1929 and the taxonomic status of remaining *Dichotomius* Hope 1838 subgenera (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae: Dichotomiini). **Journal of natural history**, v.53, n.37–38, p. 2231–2351, 2019.

NUNNEY L E ELAM DR. Estimating the Effective Population Size of Conserved Populations. **Conservation Biology** p7–184 Vol 8, 1994.

PANTOJA–GOMEZ LM, CORRÊA AS, OLIVEIRA LO E GUEDES RNC. Common Origin of Brazilian and Colombian Populations of the Neotropical Coffee Leaf Miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **J Econ Entomol** 112:924–931, 2019.

PEROVANO TL E LIMA RN. Dinâmica de ocupação do solo na faixa de Reserva Ecológica de Vila Velha (ES). **Natureza Online**, 1:117–23, 2003.

PFEILER E, NAZARIO–YEPIZ NO, PÉREZ–GÁLVEZ F, CHÁVEZ–MORA CA, LACLETTE MRL, RENDÓN–SALINAS E, E MARKOW TA. Population Genetics of Overwintering Monarch Butterflies, *Danaus plexippus* (Linnaeus), from Central

Mexico Inferred from Mitochondrial DNA and Microsatellite Markers. **Journal of Heredity**, 108, 163–175, 2017.

PREVOST A E WILKINSON MJ. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theor Appl Genet** 98:107–112, 1999.

PRITCHARD JK, STEPHENS M E DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genet** 155: 945–959, 2000.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, <http://www.R-project.org/>. (22 de junho, 2019).

RAHIMI A, MIRMOAYEDI A, KAHRIZI D, ZAREI L E JAMALI S. Genetic diversity of Iranian honey bee (*Apis mellifera* meda Skorikow, 1829) populations based on ISSR markers. **Cell Mol Biol** 62:53–58, 2016.

RIBEIRO MC, METZGER JP, MARTENSEN AC, PONZONI FJ E HIROTA MM. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation** 142:1141–1153, 2009.

ROCHA CFD, VAN SLUYS M, BERGALLO HG E ALVES MAS. Endemic and threatened tetrapods in the restingas of the biodiversity corridors of Serra do Mar and of the central da Mata Atlântica in Eastern Brazil. **Brazilian J Biol** 65:159–168, 2005.

ROCHA CFD, BERGALLO HG, VAN SLUYS M, ALVES MAS E JAMEL CE. The remnants of restinga habitats in the Brazilian Atlantic Forest of Rio de Janeiro state, Brazil: habitat loss and risk of disappearance. **Brazilian J Biol** 67:263–273, 2007.

ROCHA CFD, HATANO FH, VRCIBRADIC D E VAN SLUYS M. Frog species richness, composition and beta-diversity in coastal Brazilian restinga habitats. **Brazilian J Biol** 68:101–107, 2008.

ROGERS AR, HARPENDING H. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. **Mol Biol Evol** 9:552–569, 1992.

ROLDÁN-RUIZ I, DENDAUW J, VAN BE, DEPICKER A E DE LOOSE M. AFLP markers reveals high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Mol Breed** 6:125–134, 2000.

ROUHANI M, VAHEDI HÁ E MAREFAT A. Genetic variation of yellow pistachio hard scale, *Lepidosaphes pistaciae* Archangelskaya (Hem.: Diaspididae) populations in Kerman province, Iran revealed by ISSR markers. **Horm Regul farm Anim growth** 13–36, 2018.

ROUX O, GEVREY M, ARVANITAKIS L, GERS C, BORDAT D E LEGAL L. ISSR-PCR: Tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. **Mol Phylogenet Evol** 43:240–250, 2007.

ROZAS J, FERRER-MATA A, SÁNCHEZ-DELBARRIO JC, GUIRAO-RICO S, LIBRADO P, RAMOS-ONSINS ES E SÁNCHEZ-GRACIA A. DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. **Mol Biol Evol** 34:3299–3302, 2017.

RUNDLE HD E NOSIL P. Ecological speciation. **Ecology Letters**, 8: 336–352, 2005.

SADDER M, AL-ANTARY T E AL-RAWAHI F. Genetic Diversity of Three Populations of Dubas Bugs *Ommatissus Lybicus* De Bergevin (Tropiduchidae: Homoptera). **Fresenius Environmental Bulletin** 28:1560–1568, 2019.

SAMBROOK J, RUSSEL DW. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SILVA SM. Diagnóstico das Restingas no Brasil. In: Fundação BIO RIO, Workshop Avaliação e Ações Prioritárias para a Conservação da Biodiversidade da Zona Costeira e Marinha. Porto Seguro, **Anais eletrônicos**, 1999. Disponível em: www.bdt.org.br/workshop/costa/Restinga.

SILVA JMC E CASTELETTI CHM. Estado da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira. in: C. Galindo-Leal & I.G. Câmara (eds.). The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, trends, and outlook. Island Press, Washington, p. 43–59, 2003.

SINGH, TY MAZUMDAR-LEIGHTON S, SAIKIA M, PANT P, KASHUNG S, NEOG K, CHAKRAVORTY R, NAIR S, NAGARAJU J E BABU CR. Genetic Variation within Native Populations of Endemic Silkmoth *Antheraea assamensis* (Helfer) from Northeast India Indicates Need for In Situ Conservation. *P one* 7:1–13, 2012

SOKAL RR E ROHLF FJ. Biometry (3rd ed.). New York, Freeman. p. 813–819.
Spector S (2006) Scarabaeine Dung Beetles (coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae): An Invertebrate Focal Taxon for Biodiversity Research and Conservation. **Coleopt Bull** 60:71–83, 1995.

STADEN R. The Staden Sequence Analysis Package. **Molecular Biotechnology** 5:233–241, 1996.

SUGUIO K E TESSLER MG. Planícies de cordões litorâneos do Brasil: origem e nomenclatura. In: Lacerda, L. D. de et al. (orgs.). **Restingas: origem estruturas e processos**. Niterói, CEUFF. p. 195–216, 1984.

SUGUIO K E MARTIN L. Classificação de costas e evolução geológica das planícies litorâneas quaternárias do sudeste e sul do Brasil. In: ACIESP (org.). **Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira**. Anais. v. 1. p. 1–28, 1987.

SUGUIO K. Geologia do quaternário e mudanças ambientais. São Paulo: **Oficina de Textos**, 2010.

SHALENE JHA E KREMEN C. Urban land use limits regional bumble bee gene flow. **Molecular Ecology** 22, 2483–2495, 2013.

SHAPIRO BJ, LEDUCQ JB E MALLET J. What Is Speciation? **PLoS Genet** 12(3): e1005860, 2016.

TAJIMA F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics** 123:585–595, 1989.

TAYLOR SJ, DOWNIE DA E PATERSON ID. Genetic diversity of introduced populations of the water hyacinth biological control agent *Eccritotarsus catarinensis* (Hemiptera: Miridae). **Biolog Control** 58:330–336, 2011.

TEMPLETON AR. Genética de populações e teoria microevolutiva. São Paulo, **SBG**, 705 p, 2011.

TOCZYDLOWSKI RH E WALLER DM. Drift happens: Molecular genetic diversity and differentiation among populations of jewelweed (*Impatiens capensis* Meerb) reflect fragmentation of floodplain forests. **Molecular Ecology** 28:2459–2475, 2019.

VALOIS MC, VAZ-DE-MELLO FZ E SILVA FAB. Taxonomic revision of the *Dichotomius sericeus* (Harold, 1867) species group (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae). **Zootaxa** 4277:503, 2017.

VARSHNEY RK CHABANE K, HENDRE PS, AGGARWAL RK E GRANER ANDREAS. Comparative assessment of EST–SSR, EST–SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. **P Science** 173:638–649, 2007.

VAZ-DE-MELLO FZ. Estado atual de conhecimento dos Scarabaeidae s. str (Coleoptera: Scarabaeoidea) do Brasil. **Proy Iberoam Biogeogr y Entomol Sist** 183–195, 2000.

VAZ-DE-MELLO FZ, LOUZADA JNC E GAVINO M. Nova espécie de *Dichotomius* Hope, 1838 (Coleoptera, Scarabaeidae) do Espírito Santo, Brasil. **Rev Bras Entomol** 45:99–102, 2001.

VAZ-DE-MELLO F, LARSEN T, SILVA F, FAVILA M, SPECTOR S E GILL B. (2013) <https://www.iucnredlist.org/species/137111/520080>, acessado em 10 de Junho, 2019.

VELOSO HP, RANGEL-FILHO ALR E LIMA JCA. Classificação da Vegetação Brasileira Adaptada a um Sistema Universal. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)**, CDDI, 124 p., 1991.

VIEIRA L, LOUZADA JNC E SPECTOR S. Effects of degradation and replacement of southern Brazilian Coastal sandy vegetation on the dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae). **Biotropica** 40:719–727, 2008.

VIEIRA L, LOUZADA J, VAZ-DE-MELLO FZ, LOPES PP E SILVA FAB. New Records, Threatens and Conservation Status for *Dichotomius schiffleri* Vaz-de-Mello, Louzada & Gavino (Coleoptera: Scarabaeidae): na Endangered Dung Beetle Species from Brazilian Atlantic Forest Ecosystems. **Neotrop Entomol** 40:282–284, 2011.

VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, REIJANS M, LEE TV, HOMES M, FRIJTERS A, POT J, PELEMAN J, KUIPER M E ZABEAU M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research** 23:4407–4414, 1995.

WANG Y, SUN E, WANG W, WANG K, WANG H E GE M. Effects of habitat fragmentation on genetic diversity and population differentiation of *Liposcelis bostrychophila badonnel* (Psocoptera: Liposcelididae) as revealed by ISSR markers. **J Stored Prod Res** 68:80–84, 2016.

WEBER JL, MAY PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am J Hum Genet** 44:388–96, 1989.

WRIGHT S. The genetical structure of populations. **Ann of Eug** 323–354, 1951.

WRIGHT S. The Interpretation of population structure by f–statistic with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395–420, 1965.

YANG J, TIAN L, XU B, XIE W, WANG S, ZHANG Y, WANG X E WU Q. Insight into the migration routes of *plutella xylostella* in China using mtCOI and ISSR markers. **PLoS One** 10:1–15, 2015.

YEH FC, YANG RC E BOYLE T. POPGENE Version 1.32: Microsoft Window–Based Freeware for Population Genetics Analysis. **University of Alberta**, Edmonton, 1999.

ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR) – Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. **Genom** 20:176–183, 1994.