



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RAFAEL ELIAS DA SILVA PENHA

**ESTRUTURA GENÉTICA DE *EUGLOSSA IOPOECILA*
(APIDAE, EUGLOSSINI) EM REMANESCENTES DE MATA
ATLÂNTICA**

Londrina
2013



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

RAFAEL ELIAS DA SILVA PENHA

**ESTRUTURA GENÉTICA DE *EUGLOSSA IOPOECILA*
(APIDAE, EUGLOSSINI) EM REMANESCENTES DE MATA
ATLÂNTICA**

RAFAEL ELIAS DA SILVA PENHA

**ESTRUTURA GENÉTICA DE *EUGLOSSA IOPOECILA*
(APIDAE, EUGLOSSINI) EM REMANESCENTES DE MATA
ATLÂNTICA**

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

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

Londrina
2013

**Catlogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P399e Penha, Rafael Elias da Silva.
Estrutura genética de *Euglossa iopocila* (Apidae, Euglossini) em remanescentes
de Mata Atlântica / Rafael Elias da Silva Penha. – Londrina, 2013.
73f. : il.

Orientador: Silvia Helena Sofia.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Abelha – Genética de populações – Teses. 2. Abelha – Mata Atlântica –
Teses. 3. Biodiversidade – Teses. 4. Marcadores biológicos – Teses. I. Sofia,
Silvia Helena. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto
Agrônômico do Paraná. IV. EMBRAPA . V. Título.

CDU 595.799

RAFAEL ELIAS DA SILVA PENHA

**ESTRUTURA GENÉTICA DE *EUGLOSSA IOPOECILA* (APIDAE,
EUGLOSSINI) EM REMANESCENTES DE MATA ATLÂNTICA**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Solange Cristina Augusto
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Prof^a. Dr^a. Fernanda S. de Almeida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 22 de Fevereiro de 2013.

Dedicação
Aos meus pais Itair e Silvia
Pelo amor e apoio incondicional

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, a Universidade Estadual de Londrina por toda formação acadêmica e pela estrutura para realização do trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado, ao CNPq, CAPES/Procad, Fundação Grupo Boticário de Proteção à Natureza e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro ao projeto.

À minha amiga e orientadora Dr^a. Silvia Helena Sofia, grande inspiradora pessoal e profissional, que mesmo com as adversidades enfrentadas nunca deixou seus alunos sem amparo. Agradeço pelas conversas, pelos ensinamentos, oportunidades, confiança, e até mesmo pelas broncas, quando merecidas, meu muito obrigado para a Silvia, para a Helena e para a Sofia.

À minha amiga (ainda considero como orientadora) Dr^a. Fernanda Simões de Almeida, pelos ensinamentos, amizade, conselhos, momentos de descontração, por aceitar fazer parte da banca do meu mestrado e principalmente pela confiança ao dar a oportunidade de entrar no LAGEA, muito obrigado Fer.

À professora Dr^a. Solange Cristina Augusto, por aceitar ser banca examinadora do mestrado, e pela disponibilidade em contribuir com esse trabalho.

À professora Dr^a. Maria Cristina Arias, por ceder o espaço físico e me acolher no seu laboratório, pela orientação na construção da biblioteca de microssatélites, agradeço também à Elaine Françoso que muito me ajudou na realização do experimento, indo no feriado e no sábado para me ajudar, valeu mesmo pela força.

À professora Dr^a. Maria Claudia Rúvulo-Takasusuki e ao professor Dr. Paulo Ruas por aceitarem o convite como suplentes para a banca examinadora da defesa da dissertação.

À professora Dr^a. Leda Maria K. Sodré pelos ensinamentos e conselhos.

À professora Dr^a. Maria Cristina Gaglianone, ao Guilherme e ao Bruno pela ajuda nas coletas na Rebio União.

Ao Dr. Samuel Boff, por ceder amostras de Ilhabela e São Sebastião.

Ao IBAMA pela licença permanente para coletas nas áreas de estudo, incluindo no Parque Nacional de Superagui;

Ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo por ceder a licença para as coletas e ao pessoal dos Parques Estaduais de São Sebastião, Ilhabela, Ilha do Cardoso, Ubatuba (Picinguaba) pela infraestrutura cedida e pela ajuda nas coletas.

A Professora Dr^a. Ana Lúcia Dias e à Sueli Miranda, pelo apoio incondicional e pela paciência.

Aos técnicos Dário e Melissa, pelo preparo dos materiais.

A todos os meus amigos e colegas do Laboratório, os atuais e os que já passaram por ele: Karen, Dhiego, Alessandra, Wilson, Midori, Camila, Lenice, Faustinho, Gabi, Bruna, Carol, Yuldi, Ceci e Henrique, pelos momentos de descontração, discussão sobre ciências e 'bobeiras'. Gostaria de agradecer em especial à Alessandra por ter me ajudado na construção de microssatélites em São Paulo, ao Douglas por ter ajudado nas coletas, cedidas amostras de Salto Morato e ter identificado as abelhas e, ao Dhiego que me ensinou muito sobre genética.

À Luana Rodrigues, a Katia e ao Eduardo, por todo auxílio para colocar as placas no sequenciador e pelas discussões.

Aos meus colegas e amigos da turma 54 de Ciências Biológicas da UEL, e aos colegas e amigos da minha turma de mestrado.

À minha família de Londrina, meus grandes irmãos, Vitor, André, Bruno, André Soldado, Rafaela, Gringo, Chuck, Foguinho, Tati, Fefu e Chocolate, por toda amizade, aventuras e parceria, os sete anos longe de casa seria muito triste se não fosse a presença e amizades de vocês na minha vida.

Aos meus grandes amigos de Caconde: Guga, Gustavo, Uti, Bigão, Sauva, João, pela amizade, e por fazerem parte da minha história.

À minha namorada Renata, por quase sempre aceitar minha ausência durante o mestrado, por todo apoio, pela ajuda na hora de escrever, por ser essa pessoa tão especial na minha vida, por suportar meu mau humor, por me fazer mais feliz; com certeza ela foi a que mais sofreu comigo nos momentos de desespero, onde os experimentos não davam certo. Te amo muito minha linda!

À minha família, meus irmãos Rodrigo e Raquel, aos meus avós e tios, por estarem sempre me apoiando.

Aos meus pais, Silvia e Itair, que sempre batalharam e se esforçaram para me ajudar, nunca abaixaram a cabeça para as adversidades, mesmo se apertando lá em Caconde para que eu pudesse vir para Londrina, tudo que sou e tenho é graças a eles, mesmos distante eles sempre estiveram presentes; Amo vocês e muito obrigado por tudo!

Muito Obrigado a todos.

PENHA, Rafael Elias da Silva. **Estrutura genética de *Euglossa iopoecila* (Apidae, Euglossini) em remanescentes de Mata Atlântica**. 73p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2014.

RESUMO

Euglossa iopoecila é uma das espécies de Euglossini com distribuição restrita à Mata Atlântica, sendo encontrada apenas em domínios de Floresta Ombrófila Densa. Esta espécie apresenta uma variação de cor ao longo de sua amplitude de ocorrência e tem sido foco de uma discussão sobre seu real *status* taxonômico. Levando em consideração a importância e a ausência de estudos genéticos de populações de *E. iopoecila*, este trabalho teve como objetivo obter informações sobre a estrutura genética de populações desta espécie, distribuídas ao longo de remanescentes de Mata Atlântica, onde são encontrados indivíduos apresentando coloração variando de azul-violeta a verde. Assim, foram analisadas amostras de cinco populações de *E. iopoecila*, distribuídas em remanescentes florestais entre os estados do Paraná e Rio de Janeiro. As cinco áreas de estudo foram: Reserva Natural Salto Morato – SM (PR), Ilhabela – IB, Ubatuba – UB e São Sebastião – SS (SP) e Reserva Biológica União – RJ, no estado do Rio de Janeiro. Nas análises foram empregados marcadores microssatélites e mitocondrial (segmento de 651 pb do *Cyt b*). Os resultados com marcadores mitocondriais revelaram níveis mais elevados de estruturação genética entre as populações estudadas do que os detectados pelos marcadores microssatélites, fato que pode estar refletindo, em parte, o comportamento filopátrico das fêmeas destas abelhas. Uma significativa correlação positiva foi encontrada entre distância genética e distância geográfica, sugerindo um maior fluxo gênico entre populações mais próximas geograficamente. Nossos resultados também sugerem que a forte estruturação revelada pelo marcador mitocondrial pode estar relacionada a processos evolutivos mais antigos, envolvendo eventos históricos ocorridos durante o Pleistoceno.

Palavras-Chave: Abelhas das orquídeas. Diversidade genética. Marcadores microssatélites. DNAm. *Cyt b*.

PENHA, Rafael Elias da Silva. **Genetic structure of *Euglossa iopoecila* (Apidae, Euglossini) from Atlantic Forest remnants**. 73p. Master Dissertation (Genetics and Molecular Biology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Euglossa iopoecila is a Euglossini species with restricted distribution to Atlantic Forest, found only in areas of Dense Ombrophylous Forest. This species has a color variation throughout its distributional range and it has been focus of debate regarding the real taxonomic status of this species. Considering the importance and the absence of genetic population studies on *E. iopoecila*, this study aimed to obtain information on the genetic structure of populations of this species distributed throughout Atlantic Forest remnants, where individuals show variations in their integument color, ranging from blue-violet to green. Thus, samples of five populations of *E. iopoecila* collected in forests Atlantic Forest remnants in the states of Paraná, São Paulo and Rio de Janeiro were analyzed. The five study areas were: Reserva Natural Salto Morato – SM (PR), Ilhabela – IB, Ubatuba – UB and São Sebastião – SS (SP) and Reserva Biológica União – RJ, in Rio de Janeiro state. In the analyzes were used microsatellite and mitochondrial markers (segment of 651 pb of *Cyt b*). The results with mitochondrial markers showed higher levels of genetic structure among the populations studied than those detected by microsatellite markers, which may reflect, in part, the filopatric behavior of the euglossine females. A significant positive correlation was found between genetic distance and geographic distance, suggesting higher gene flow between geographically closer populations. Our results also suggest that the strong genetic structure revealed by mitochondrial analysis may be related to older evolutionary processes, involving historical events occurred during the Pleistocene.

Keywords: Orchid bees. Genetic diversity. Microsatellite markers. mtDNA. *Cyt b*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVOS GERAIS	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	TRABALHO	23
3.1	INTRODUÇÃO	23
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.2.1	Áreas de Estudo	26
3.2.2	Coletas	30
3.2.3	Extração de DNA	32
3.2.4	Marcadores Mitocondriais	33
3.2.4.1	Amplificação	33
3.2.4.2	Sequenciamento	33
3.2.5	Marcadores Microsatélites	33
3.2.5.1	Construção e Seleção de Primers	33
3.2.5.2	Amplificação e Genotipagem dos Fragmentos	34
3.2.6	Análise dos Dados	35
3.2.6.1	DNAMT	35
3.2.6.2	Microsatélites	36
3.3	RESULTADOS	37
3.3.1	DNAMT (CYT B)	37
3.3.2	Marcadores Microsatélites	42
3.4	DISCUSSÃO	50
3.5	REFERÊNCIAS	57
4	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

As abelhas da tribo Euglossini constituem um grupo que reúne cerca de 200 espécies distribuídas em cinco gêneros: *Euglossa*, *Eufriesea*, *Eulaema*, *Exaerete* e *Aglae* (DRESSLER, 1982; ROUBIK; HANSON, 2004). São abelhas frequentemente de colorido metálico e voo rápido (DRESSLER, 1982), com ocorrência restrita às Américas, onde apresentam uma faixa de distribuição geográfica que abrange desde o sul dos Estados Unidos até a província de Córdoba na Argentina (ROUBIK; HANSON, 2004; NEMÉSIO, 2009).

Este grupo de abelhas passou a ser mais bem estudado a partir da década de 1960, com a utilização de iscas-odores para a atração dos machos (DODSON et al., 1969). Desde então, várias espécies foram e continuam a ser descritas, inclusive no Brasil (ANJOS-DA-SILVA; REBÊLO, 2006; NEMÉSIO, 2009; FARIA; MELO, 2011; NEMÉSIO, 2012, NEMÉSIO; SANTOS JR; SANTOS, 2013), onde a riqueza do grupo é uma das mais elevadas (REBÊLO, 2001).

A tribo Euglossini é considerada extremamente importante à polinização nos neotrópicos, devido à alta representatividade do grupo entre as comunidades de abelhas neotropicais (podendo chegar a constituir 25% da diversidade em algumas matas) (ROUBIK; HANSON, 2004), à grande capacidade de voo que muitas espécies possuem (JANZEN, 1971) e ao número expressivo de famílias vegetais popinizadas por tais abelhas (ROUBIK; HANSON, 2004).

Conhecidas popularmente como abelhas das orquídeas pela íntima associação que os machos destas abelhas têm com várias espécies de Orchidaceae (ACKERMAN, 1983), as abelhas Euglossini são consideradas também importantes polinizadores das orquídeas nos neotrópicos (DRESSLER, 1968, 1982; ACKERMAN, 1983; ROUBIK; HANSON, 2004). De fato, tais abelhas polinizam e coletam fragrâncias de pelo menos 650 espécies de orquídeas neotropicais (ACKERMAN, 1983). Para coletar compostos florais aromáticos, os machos escovam a fonte floral com os tarsos anteriores e transferem as substâncias coletadas para as tíbias posteriores que são modificadas para a deposição de fragrâncias (DODSON et al., 1969; WILLIAMS; WHITTEN, 1983; ROUBIK; HANSON, 2004). As substâncias aromáticas são coletadas em flores de orquídeas e outras fontes florais e extraflorais. Dentre as fontes de compostos aromáticos não-florais estão madeiras podres, frutos em decomposição, tronco de árvores e fezes

(ACKERMAN, 1983; ELTZ et al., 2007). Acredita-se que a coleta de fragrâncias pelos machos esteja relacionada com atividades de comunicação e reprodução, no entanto, não se sabe até o momento o verdadeiro papel dos compostos aromáticos nestas atividades (WILLIAMS; WHITTEN, 1983; ELTZ et al., 2007).

Do total de espécies conhecidas de Euglossini, aproximadamente 50 ocorrem na Mata Atlântica (NEMÉSIO, 2009), e metade deste total de espécies ocorre exclusivamente neste bioma. Constituindo um dos principais *hotspots* de biodiversidade do planeta, a Mata Atlântica é amplamente reconhecida pelo alto grau de endemismos de várias de suas espécies (MYERS et al., 2000; LAURANCE, 2009). *Euglossa iopoecila* Dressler é uma espécie de Euglossini com ocorrência restrita a áreas de Floresta Ombrófila Densa da Mata Atlântica, da costa litorânea brasileira (FARIA JR; MELO, 2007; NEMÉSIO, 2009). Esta espécie pertence ao subgênero *Glossura*, o qual caracteristicamente apresenta uma língua excepcionalmente longa, podendo ultrapassar o próprio tamanho do corpo da abelha (ROUBIK, 2004). Dentre as espécies deste subgênero estão *Euglossa imperialis* Cockerell, *Euglossa annectans* Dressler e *Euglossa stellfeldi* Moure (MOURE; MELO; FARIA JR., 2012).

A espécie *E. iopoecila* tem sido alvo de discussão taxonômica nos últimos anos (FARIA JR; MELO, 2007; NEMÉSIO, 2009). Segundo Faria Jr e Melo (2007), as populações desta espécie, ao longo de sua faixa de distribuição, apresentam variação na coloração do tegumento, sendo azul-violeta, nos limites mais ao sul de distribuição desta espécie (Santa Catarina e Paraná), e verde metálico, em direção aos limites mais ao norte de ocorrência desta abelha (ex. Espírito Santo e Bahia). Ainda segundo estes autores, tal variação parece ser gradual, mostrando tons intermediários entre azul-violeta e verde, nas populações com ocorrência em áreas intermediárias aos extremos de distribuição de *E. iopoecila*. Mais recentemente o limite de distribuição reconhecido para *E. iopoecila* passou a abranger os seguintes estados brasileiros: Pernambuco, Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (MOURE; MELO; FARIA JR., 2012). Contudo, Nemésio (2009) argumenta que as abelhas de coloração verde metálico, que ocorrem desde o estado do Rio de Janeiro até estados do nordeste brasileiro, constituem membros de uma espécie distinta de *E. iopoecila*, sendo tal espécie descrita, em 2009, como *Euglossa roubiki*. Em duas publicações recentes, este autor relata também a

ocorrência de *E. roubikipara* o estado de Alagoas (NEMÉSIO, 2010) e em uma região mais distante na costa leste brasileira (NEMÉSIO, 2012). Contudo, Suzuki et al. (2011), com base no sequenciamento da região *barcode* (segmento do gene mitocondrial da citocromo oxidase I ou *COI*), sugerem que *E. roubikie E. iopoecila* constituem, de fato, uma mesma espécie. Faria Jr e Melo (2007) atribuem à variação na coloração de *E. iopoecila* ao longo de sua área de distribuição à gradientes latitudinais.

De qualquer modo, as diferenças nos padrões de coloração de *E. iopoecila*, fazem desta espécie um objeto interessante para estudos genéticos, uma vez que tais diferenças de coloração podem estar representando populações ou subespécies distintas, justificando, assim, um estudo genético mais aprofundado envolvendo *E. iopoecila*.

Estudos genéticos envolvendo abelhas têm como peculiaridade o fato destes insetos, assim como os demais himenópteros, possuírem um sistema haplodiploide de determinação sexual. Neste grupo de insetos machos são organismos, usualmente, haploides, produzidos, a partir de ovos não fertilizados (por arrenotoquia) e, portanto hemizigotos, enquanto as fêmeas são indivíduos diploides, produzidas a partir de ovos fecundados. Contudo, machos diploides podem também ser produzidos, sendo estes em geral estéreis (UNRUH; MESSING, 1993; COOK; CROZIER, 1995). Neste caso, tais machos apresentam o loco de determinação sexual, o qual é de caráter multialélico, em homozigose (UNRUH; MESSING, 1993; COOK; CROZIER 1995; BEYE et al., 2003; HEIMPEL; DE BOER, 2008). Machos diploides são conhecidos para populações naturais de algumas espécies de Hymenoptera (UNRUH; MESSING, 1993), inclusive para várias espécies da tribo Euglossini (LÓPEZ-URIBE; ALMANZA; ORDOÑEZ, 2007; ZAYED; PACKER, 2005; SOUZA et al., 2010). As fêmeas são, como já destacado, produzidas de ovos fertilizados, nos quais o locode determinação sexual apresenta-se em heterozigose, ou seja, são heterozigotas neste loco (UNRUH; MESSING, 1993 BEYE et al., 2003 HEIMPEL; DE BOER, 2008).

Este sistema de determinação sexual, como ocorre em vários grupos de abelhas, é conhecido por *sl-CSD* (*Single-locus Complementary Sex Determination*) ou determinação sexual complementar em um único loco, sendo tal sistema uma característica ancestral dentro de Hymenoptera (ZAYED; PACKER, 2005; HEIMPEL; DE BOER 2008).

Alguns autores têm associado a maior probabilidade de ocorrência de machos diploides à redução dos tamanhos populacionais destes insetos, que resulta na perda da diversidade alélica no loco CSD(ZAYED; ROUBIK; PACKER, 2004; ZAYED, 2009). Entre as principais causas para os declínios populacionais de abelhas e outros hymenópteros estão a destruição de florestas, fragmentação e perda de habitats e uso indiscriminado de agroquímicos(BIESMEIJER et al., 2006; ZAYED, 2009; POTTS et al., 2010).

No Brasil, a Mata ou Floresta Atlântica, que no passado ocupava uma área de 1.315.460 km², compõe atualmente uma paisagem formada por um conjunto de fragmentos florestais, em diferentes estados de conservação, que ocupam uma área de apenas 10% aproximadamente da floresta original (MORELLATO; HADDAD, 2000; RIBEIRO et al., 2009; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2011). Localizada na região mais populosa do Brasil, a Mata Atlântica sofreu séculos de exploração de madeira, campos agrícolas, fazendas, plantações de árvores exóticas e caça. Apenas 1% da floresta original está hoje protegida em reservas e maior parte do restante foi destruída ou fragmentada em cerca de duzentos e cinquenta mil pedaços de floresta. Oito décimos destes fragmentos sobreviventes são muito pequenos (menos de 0,5 km² de área) e isolados, sendo assim altamente vulneráveis aos efeitos de borda. Praticamente não há grandes fragmentos protegidos de Mata Atlântica (> 1.000 km²), como consequência, neste cenário fragmentado, populações de muitas espécies animais encontram-se sob o risco de extinção(LAURANCE, 2009).

Reconhecida como um dos mais importantes e ameaçados *hotspots* de biodiversidade do planeta (MYERS et al., 2000; LAURENCE, 2009), no passado, a Mata Atlântica constituiu uma das maiores florestas das Américas, distribuindo-se em condições ambientais altamente heterogêneas (RIBEIRO et al., 2009). Abrangendo uma variação latitudinal de 29°, os domínios deste bioma avançam para dentro de regiões tropicais e subtropicais, ao longo de uma ampla faixa latitudinal longitudinal, e em diferentes altitudes, condições estas, que em conjunto, contribuem para a variedade da composição florística deste bioma. Além disto, todas estas características geográficas contribuem para os elevados graus de endemismo da fauna e flora da Mata Atlântica (RIBEIRO et al., 2009).

Em termos de composição florística diferentes tipos de ecossistemas vegetais fazem parte da Mata Atlântica, dentre os quais se destacam: Floresta

Ombrófila Densa, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila Mista (MORELATTO; HADDAD, 2000; GALINDO-LEAL et al., 2005).

Estudos têm mostrado que dentro da ampla faixa de variação latitudinal da Mata Atlântica, a diversidade de espécies da tribo Euglossini decresce do norte em direção ao sul da América do Sul (WITTMANN et al., 1988; REBÊLO, 2001; NEMÉSIO, 2010; MATTOZO; FARIA; MELO, 2011). Como mencionado anteriormente, *E. iopoecila* é uma espécie encontrada em uma extensa faixa de latitude ao longo da costa brasileira (FARIA JR; MELO, 2007). Apesar de ser esta, uma espécie endêmica à Mata Atlântica e de ocorrer apenas nos domínios de Floresta Ombrófila Densa (FARIA JR; MELO, 2007; NEMÉSIO, 2009), a qual representa uma das fitofisionomias mais severamente ameaçadas deste bioma, não se tem até o momento conhecimento das condições de preservação das populações desta espécie.

Alguns estudos envolvendo abelhas Euglossini têm indicado que tais abelhas, ou pelo menos algumas espécies, são sensíveis à fragmentação florestal (POWELL; POWELL, 1987; SOFIA; SUZUKI, 2004; BROSI, 2009; GIANGARELLI et al., 2009). Por exemplo, Brosi (2009) encontrou que a abundância destas abelhas se mostrou positivamente correlacionada ao tamanho dos fragmentos florestais que este autor amostrou. Por sua vez, Powell e Powell (1987) relatam que a fragmentação florestal pode comprometer o deslocamento de algumas espécies, as quais se mostraram incapazes de transpor áreas desmatadas.

Sabe-se que o declínio e isolamento de populações estão entre as principais causas de perda de diversidade genética (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Contudo, a variabilidade ou diversidade genética é uma condição necessária para evolução. As vantagens de um estoque de variação são evidentes: quanto maior o número de genótipos em uma população maior será sua possibilidade de suportar mudanças estacionais ou temporais (SODRÉ; ALMEIDA CHIARI, 2002). A habilidade de uma espécie em responder a seleção é dependente da presença de variações herdáveis. Se a variação genética estiver presente dentro de uma espécie, qualquer alteração nas pressões seletivas devido a mudanças ambientais aumentará a possibilidade de que alguns indivíduos possam sobreviver e se reproduzir (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004). Diante deste fato, a *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), a primeira organização internacional para

a conservação, reconhece a necessidade de conservar a diversidade genética como uma das três prioridades globais de conservação.

Uma etapa inicial importante para o desenvolvimento do manejo e conservação *in situ* diz também respeito ao conhecimento da distribuição da diversidade genética dentro e entre populações de uma espécie. Para isto, deve-se levar em conta se uma espécie está distribuída como apenas uma população, ou como populações geneticamente diferentes, e qual é o grau de interação entre elas (HILSDORF; PETRERE, 2002).

Muitas populações ao redor do mundo tornaram-se fragmentadas como resultado das atividades humanas. Os impactos da fragmentação das populações sobre a diversidade genética, diferenciação, endogamia e risco de extinção dependem do nível de fluxo gênico entre as populações fragmentadas. Ao mesmo tempo, particularmente, no que se refere a ambientes florestais que foram fragmentados, há que se levar em conta ainda outros fatores, como: o número de fragmentos ocupados por tais populações, distribuição dos tamanhos populacionais nos fragmentos e distribuição geográfica das populações, distância entre os fragmentos, habilidade de dispersão das espécies, ambiente da matriz entre os fragmentos e seu impacto sobre a dispersão, tempo desde a fragmentação e taxas de extinção e recolonização nos fragmentos (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

Além disto, analisar a estrutura da população e o fluxo gênico na natureza é imprescindível para a compreensão de uma variedade de fenômenos, como a especiação e processos biogeográficos (CRISPO; CHAPMAN, 2010). A estrutura genética populacional refere-se à distribuição heterogênea (não aleatória) dos alelos e genótipos no espaço e no tempo resultante da ação de forças evolutivas tais como: mutação, migração, seleção natural e deriva genética que atuam dentro do contexto de cada espécie e população (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

Mesmo diante de evidências do declínio nas populações de abelhas em todo mundo, os fatores genéticos relacionados a este declínio foram, no início, completamente negligenciados, apesar da reconhecida importância destes na extinção de populações e espécies (ZAYED, 2009). Particularmente, nos estudos com Euglossini, até o momento, ainda são poucos os trabalhos voltados ao conhecimento da diversidade e estrutura genética de populações destas abelhas, sendo estes limitados a um número restrito de espécies (SUZUKI et al.,

2010; CERÂNTOLA et al., 2011; ZIMMERMANN et al., 2011; FREIRIA et al., 2012). Zimmermann et al. (2011), analisando a estrutura genética de duas espécies de Euglossini no México, apontam que a diferenciação genética entre as populações estudadas parece estar relacionada ao tamanho das áreas estudadas. Dentre os trabalhos existentes alguns foram realizados com populações de algumas espécies de Euglossini presentes em remanescentes de Mata Atlântica brasileira (SUZUKI et al., 2010; ROCHA FILHO 2011; BOFF, 2012; FREIRIA et al., 2012). No caso de *E. iopoevila*, ainda não há trabalhos na literatura relacionados ao conhecimento da estrutura e diversidade genética populacional desta espécie.

Inferências sobre fluxo gênico, variabilidade e estrutura genética em populações naturais podem ser feitas por meio de diversas técnicas de biologia molecular disponíveis para a detecção de polimorfismos genéticos ao nível do DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Segundo estes autores, o desenvolvimento da tecnologia da reação de polimerase em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) causou uma revolução na biologia como ferramenta poderosa para estudos moleculares, envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo.

Variações da técnica de PCR passaram a ser usadas na obtenção de diferentes tipos de marcadores, sejam estes de origem nuclear ou mitocondrial (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Nas duas últimas décadas, os microssatélites, os quais são marcadores de origem nuclear, estão entre os mais usados em estudos populacionais (AVISE, 2004). Os marcadores microssatélites correspondem a sequências repetidas, de tamanho relativamente pequeno (1 a 6 pb), também conhecidos como sequências simples repetidas (SSRs - *Single Sequence Repeats*) ou repetições curtas em *tandem* (STRs - *Short Tandem Repeats*). Os microssatélites são marcadores codominantes, que constituem um tipo único de sequência genômica de DNA não codificante repetida em *tandem*, distribuídas abundantemente pelo genoma eucariótico e que demonstram altos níveis de polimorfismo alélico (AVISE, 2004; OLIVEIRA et al., 2006; SOLÉ-CAVA; CUNHA, 2012). Tais marcadores geralmente estendem-se de vinte a algumas centenas de bases (CHISTIYAKOV; HELLEMANS; VOLCKAERT, 2006). Dentro da classe de marcadores moleculares existentes, os microssatélites são os que ocorrem em maior frequência. As estimativas da taxa de mutação de microssatélites em *E. coli* em sistemas *in vivo* são elevadas (10^{-2}), quando comparadas à taxa de

mutação de ponto que ocorre na ordem de 10^{-9} e 10^{-10} (HANCOCK, 2000). Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar a alta taxa de mutação dos microssatélites gerando a variação no número de repetições em *tandem*: erros durante a recombinação, eventos de *crossing-over* desiguais e deslizamento da DNA polimerase durante a replicação ou reparo (OLIVEIRA et al., 2006).

A distribuição dos microssatélites no indivíduo é função da história de evolução do genoma e dos efeitos da pressão de seleção. Os locos SSR parecem ser geneticamente estáveis, possuem expressão codominante, são altamente multialélicos e apresentam segregação mendeliana. Em uma população, todos os alelos daquele loco podem ser detectados e discriminados, fazendo com que os microssatélites estejam entre os marcadores moleculares mais apropriados para mapeamento genético e físico de genomas, para a identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; FUNGARO; VIEIRA, 2001; OLIVEIRA et al., 2006).

Quando sequências únicas que flanqueiam um dado microssatélite são conhecidas, *primers* complementares podem ser sintetizados e utilizados como iniciadores loco-específico em reações de PCR. A detecção de sequências SSR via PCR é feita por meio das técnicas de eletroforese automática em sequenciador ou utilizando-se gel de poliacrilamida. Neste último caso, é necessária a adequação da concentração do gel para a separação de segmentos que diferem por poucos pares de bases. Os produtos de amplificação de diferentes indivíduos, visualizados após a eletroforese, geralmente diferem em tamanho, em função de serem frequentes na população, diferenças no número de unidades de repetições no loco de microssatélite. Cada unidade de microssatélite assim detectada é um loco polialélico e, em um indivíduo diploide, a amplificação de um loco resultará em uma ou duas bandas, respectivamente, dependendo se é um homozigoto ou heterozigoto (FUNGARO; VIEIRA, 2001).

Os microssatélites apresentam vantagens sobre os métodos clássicos na análise da estrutura genética de populações, tais como: a herança das características detectadas pode ser facilmente demonstrada, os locos são codominantes e as frequências alélicas podem ser calculadas diretamente sem a necessidade de delineamentos genéticos; as estimativas da variabilidade genética podem ser comparadas diretamente entre populações ou espécies e um conjunto de locos pode ser acessado usando-se uma pequena quantidade de material. A

utilização de microssatélite, pela sua neutralidade, apresenta como principal vantagem a possibilidade de caracterização de forças evolutivas sem a influência da seleção, permitindo maior compreensão do comportamento das populações naturais, em termos de deriva genética e migração (CHISTIAKOV; HELLEMANS; VOLCKAERT, 2006).

Apesar da importância dos microssatélites para estudos de evolução e conservação genética, relacionam-se três pontos que merecem ser levados em consideração: a heterozigosidade tende a ser alta dentro das populações, o que acaba produzindo baixa diferenciação entre elas; os locos são extremamente sensíveis à redução do tamanho populacional podendo gerar, portanto, elevadas distâncias genéticas; e, como os marcadores são neutros, as diferenças estatísticas significativas podem não estar correlacionadas com diferenças biológicas expressivas, tanto pela falta de correlação entre os locos adaptativos e os locos altamente variáveis, como também pelo poder estatístico intrínseco desses locos, que é bastante elevado (KARASAWA, 2005).

Um dos grandes problemas na utilização dos marcadores microssatélites é o grande volume de trabalho necessário e o alto custo para o desenvolvimento de *primers* específicos para um dado loco de uma espécie. Porém, tem sido observado que ocorre conservação de sítios de microssatélite entre espécies relacionadas. É possível, portanto, aproveitar *primers*, denominados heterólogos, que foram desenvolvidos para uma espécie e empregá-los no estudo das demais espécies do gênero ou gêneros da mesma família; este atributo dos microssatélites é conhecido como transferabilidade ou amplificação espécie cruzada (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; CHISTIAKOV; HELLEMANS; VOLCKAERT, 2006; OLIVEIRA et al., 2006).

No caso de abelhas Euglossini, alguns poucos *primers* de microssatélites foram descritos nos últimos anos para um número limitado de espécies destas abelhas (SOUZA et al., 2007; PAXTON et al., 2009; LÓPEZ-URIBE et al., 2011). Tais *primers* têm sido usados para o estudo de diferentes espécies de Euglossini, quer sejam estas espécies para os quais os *primers* foram descritos (CERÂNTOLA et al., 2011; BOFF, 2012) ou espécies distintas (ZIMMERMANN et al., 2011; FREIRIA et al., 2012). O desenvolvimento de *primers* de microssatélites é feito a partir da técnica conhecida como biblioteca enriquecida de microssatélites, que consiste na obtenção de sequências de *primers* para regiões flangeadoras de SSR

(ZANE et al., 2002). Em 2009, Paxton et al. descreveram *primers* de microssatélites para *Euglossa annectans*, uma espécie pertencente ao subgênero *Glossura*, o mesmo de *E. iopoecila*.

Outro marcador utilizado para estudos de populações e filogeográfico é o DNA mitocondrial (DNAMt), sendo que este marcador possui características genéticas e estruturais peculiares e únicas. De um modo geral, o DNAMt constitui um genoma pequeno (aproximadamente 16 Kb) e circular, de herança uniparental, geralmente materna, o qual possui poucos genes (cerca de 37 genes) e não sofre recombinação. É considerado um genoma compacto, pois raramente possui sequências espaçadoras, repetitivas, pseudogenes e íntrons. A ordem dos genes e o conteúdo gênico, geralmente, do DNAMt é bastante conservado, mas possui mutação por substituição de base muito alta, quando comparada ao genoma nuclear (ARIAS; FRANCISCO; SILVESTRE, 2003; AVISE, 2009; ARIAS; INFANTE-MALACHIAS 2012, CALCAGNOTTO, 2012). Segundo Perez-Sweeney, Rodrigues e Melnick (2004), a utilização de marcadores genéticos que são transmitidos por apenas um dos sexos é muito útil para a sistemática molecular e para a genética de populações, fornecendo dados sobre a evolução e dispersão dos organismos. O gene mitocondrial *Cyt b* tem sido usado em diferentes estudos com abelhas (LEYS; COOPER; SCHWARZ, 2000; SUZUKI et al., 2010; FRANCISCO, 2012), bem como em estudos populacionais com abordagens evolutivas. O *Cyt b*, por ser um gene codificador para o citocromo *b*, está entre os genes mitocondriais mais conservados entre os organismos (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2012).

Assim, enquanto a utilização de marcadores de microssatélites está geralmente relacionada com estudos de populações, os marcadores mitocondriais estão mais relacionados aos estudos de filogeografia (STORFER, 2007; AVISE, 2009). As diferenças nas suas taxas médias de mutação justificam as suas distintas aplicabilidades. Ou seja, enquanto a taxa média de mutação (μ) do DNAMt é de 6×10^{-8} , os marcadores de microssatélites apresentam uma taxa média de mutação de 5×10^{-4} (GOLDSTEIN; SCHOTTERER 2000; HAAG-LIAUTARD et al., 2008). Deste modo, em razão de tais diferenças entre ambos os marcadores, os microssatélites são mais informativos para processos microevolucionários recentes ou em curso, enquanto os marcadores mitocondriais são mais adequados para processos microevolutivos históricos (WANG, 2010). De acordo com Wang (2010), estudos que

utilizam os marcadores de microssatélites e DNAm_t podem investigar a distribuição da variação genética sobre diferentes escalas temporais e espaciais, a utilização de DNAm_t para examinar processos históricos e microssatélites para investigar processos contemporâneos, é importante para mostrar forças microevolutivas que influenciaram e continuam a influenciar na distribuição da variação genética.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo geral obter informações, com base em marcadores microssatélites e mitocondrial, sobre a diversidade e estrutura genética de populações de *E. iopoecila*, distribuídas ao longo da Serra do Mar, nas regiões sul e sudeste do Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a diversidade de alelos com *primers* heterólogos e específicos para regiões de microssatélites em cinco populações de *E. iopoecila* ao longo da Serra do Mar;
- Caracterizar a diversidade haplotípica de *E. iopoecila* com base em um marcador mitocondrial (segmento do gene *Cyt b*);
- Determinar a estrutura genética de populações de *E. iopoecila* presentes nos diferentes remanescentes estudados;
- Obter informações sobre a diversidade e estruturação genética de populações de *E. iopoecila* presentes em uma ilha próxima ao continente.

3 TRABALHO

Estrutura genética populacional da abelha *Euglossa iopoecila* (Apidae, Euglossini) de remanescentes de Mata Atlântica

Trabalho a ser submetido à Revista **Molecular Ecology**

Fator de Impacto: 5,522

RESUMO

Euglossa iopoecila é uma das espécies de Euglossini com distribuição restrita à Mata Atlântica, sendo encontrada apenas em domínios de Floresta Ombrófila Densa. Esta espécie apresenta uma variação de cor ao longo de sua amplitude de ocorrência e tem sido foco de uma discussão seu sobre real status taxonômico. Levando em consideração a importância e a ausência de estudos genéticos de populações de *E. iopoecila*, este trabalho teve como objetivo obter informações sobre a estrutura genética de populações desta espécie distribuídas ao longo de remanescentes de Mata Atlântica, onde são encontrados indivíduos apresentando coloração variando de azul-violeta a verde. Assim, foram analisadas amostras de cinco populações de *E. iopoecila*, distribuídas em remanescentes florestais entre os estados do Paraná e Rio de Janeiro. As cinco áreas de estudo foram: Reserva Natural Salto Morato – SM (PR), Ilhabela – IB, Ubatuba – UB e São Sebastião – SS (SP) e Reserva Biológica União – RJ, no estado do Rio de Janeiro. Nas análises foram empregados marcadores microssatélites e mitocondrial (segmento de 651 pb do *Cyt b*). Os resultados com marcadores mitocondriais revelaram níveis mais elevados de estruturação genética entre as populações estudadas do que os detectados pelos marcadores microssatélites, fato que pode estar refletindo, em parte, o comportamento filopátrico das fêmeas destas abelhas. Uma significativa correlação positiva foi encontrada entre distância genética e distância geográfica, sugerindo um maior fluxo gênico entre populações mais próximas geograficamente. Nossos resultados também sugerem que a forte estruturação revelada pelo marcador mitocondrial pode estar relacionada a processos evolutivos mais antigos, envolvendo eventos históricos ocorridos durante o Pleistoceno.

Palavras-chave: Abelhas das orquídeas. Diversidade genética. Marcadores microssatélites. mtDNA. *Cyt b*.

3.1 INTRODUÇÃO

As abelhas da tribo Euglossini (Hymenoptera, Apidae), conhecidas como abelhas das orquídeas, são encontradas primariamente nos neotrópicos, onde são responsáveis pela polinização de diversas espécies de Orchidaceae e dezenas de outras famílias de angiospermas (Roubik & Hanson 2004). O grupo possui cerca

de 200 espécies, distribuídas em cinco gêneros (*Euglossa*, *Eufriesea*, *Eulaema*, *Exaerete* e *Aglae*), e apresenta uma ampla faixa de distribuição, que abrange desde o sul dos Estados Unidos e Norte do México até a província de Córdoba na Argentina (Dressler 1982; Roubik & Hanson 2004; Nemésio 2009). Do conjunto de espécies da tribo, cerca de 50 ocorrem em áreas de Mata Atlântica (Nemésio & Silveira 2007; Nemésio 2009), sendo metade deste total, espécies endêmicas a este ameaçado bioma Neotropical. Dentre estas, *Euglossa iopoecila* Dressler é uma espécie com ocorrência restrita a áreas de Floresta Ombrófila Densa da Mata Atlântica da costa litorânea brasileira (Faria Jr & Melo 2007; Nemésio 2009).

Segundo Faria Jr & Melo (2007), as populações desta espécie, ao longo de sua faixa de distribuição, apresentam variação de coloração do tegumento, o qual varia de azul-violeta, mais ao sul (estados de Santa Catarina e Paraná), até verde (Espírito Santo e Bahia). Ainda segundo com estes autores, tal variação de coloração no tegumento parece ser gradual, mostrando tons intermediários entre azul-violeta e verde, nas populações com ocorrência em áreas intermediárias aos extremos de distribuição de *E. iopoecila*. Entretanto, tal variação na coloração de *E. iopoecila* levou Nemésio (2009) a descrever as abelhas com coloração verde como uma nova espécie, *Euglossa roubiki*. Em duas publicações recentes, este autor relata também a ocorrência de *E. roubiki* para o estado de Alagoas (Nemésio 2010) e para uma região mais distante na costa leste brasileira (Nemésio 2012). Dentro desta discussão sobre o status taxonômico das abelhas dos espécimes exibindo coloração verde do tegumento, Suzuki *et al.* (2011), com base no sequenciamento da região *barcode* (segmento do gene mitocondrial da citocromo oxidase I ou *COI*), sugerem que *E. roubiki* e *E. iopoecila* constituem de fato uma mesma espécie.

Outro aspecto interessante envolvendo *E. iopoecila* diz respeito ao fato desta espécie ter se mostrado abundante em uma área de continente no estado de São Paulo e a mesma não ter sido coletada em uma ilha localizada a cerca de 600m do ponto mais próximo do continente, na mesma região de estudo (Rocha Filho 2011). Embora não haja estudos sobre a capacidade de dispersão de *E. iopoecila*, estudos com outras espécies de Euglossini indicam que, de um modo geral, estas abelhas são dotadas de grande capacidade de voo e dispersão (Janzen 1971), sendo capazes, inclusive, de transpor corpos d'água (Dressler 1982; Murren 2002; Wikelski *et al.* 2010). Entretanto, se a transposição de corpos d'água, com consequente isolamento de algumas ilhas, constitui uma condição limitante para *E.*

iopoecila, espera-se para as populações insulares desta espécie maiores riscos de extinção resultantes de reduções nos tamanhos populacionais, perda de variabilidade genética, efeitos de endogamia entre outros fatores (Frankham *et al.* 2008). Neste contexto, abordagens genéticas voltadas ao maior conhecimento da diversidade genética de populações insulares desta espécie de Euglossini se tornam particularmente interessantes.

Até o momento são poucos os estudos voltados ao conhecimento da diversidade e estrutura genética de populações de abelhas Euglossini, sendo estes limitados a um número restrito de espécies (Suzuki *et al.* 2010; Cerântola *et al.* 2011; Zimmermann *et al.* 2011; Freiria *et al.* 2012). Zimmermann *et al.* (2011), analisando a estrutura genética de duas espécies de Euglossini no México, sugerem que a diferenciação genética entre as populações destas abelhas parece estar relacionada ao tamanho das áreas estudadas. Outros estudos têm mostrado evidências de que as abelhas Euglossini, ou pelo menos algumas espécies, são sensíveis ao impacto ambiental (Brosi 2009; Giangarelli *et al.* 2009). Particularmente no caso de *E. iopoecila*, até o momento, não há trabalhos na literatura relacionados a estudos de genética populacional com esta espécie.

Para os estudos populacionais os marcadores de microssatélites estão entre um dos mais utilizados, por serem marcadores altamente informativos para este tipo de estudo (Avisé 2004). Outro marcador utilizado para estudos de populações e filogeográficos é o DNA mitocondrial (DNAMt), sendo que este marcador possui características genéticas e estruturais peculiares e únicas. Dentre as características deste marcador, em um modo geral, podemos citar que é: genoma pequeno (aproximadamente 16Kb) e circular; é de herança uniparental, geralmente materna; não sofre recombinação; é considerado um genoma compacto, pois raramente possui sequências espaçadoras, repetitivas, pseudogenes e íntrons; o conteúdo gênico e a ordem dos genes geralmente é bastante conservado; possui mutação por substituição de base muito alta, quando comparada ao genoma nuclear (Arias *et al.* 2003; Avisé, 2009; Arias & Infante-Malachias 2012, Calcagnotto, 2012).

De acordo com Wang (2010), é interessante utilizar marcadores de microssatélites e DNAMt para investigar a distribuição da variação genética sobre diferentes escalas temporais e espaciais, a utilização de DNAMt para examinar processos históricos e microssatélites para investigar processos contemporâneos, é

importante para mostrar forças microevolutivas que influenciaram e continuam a influenciar na distribuição da variação genética

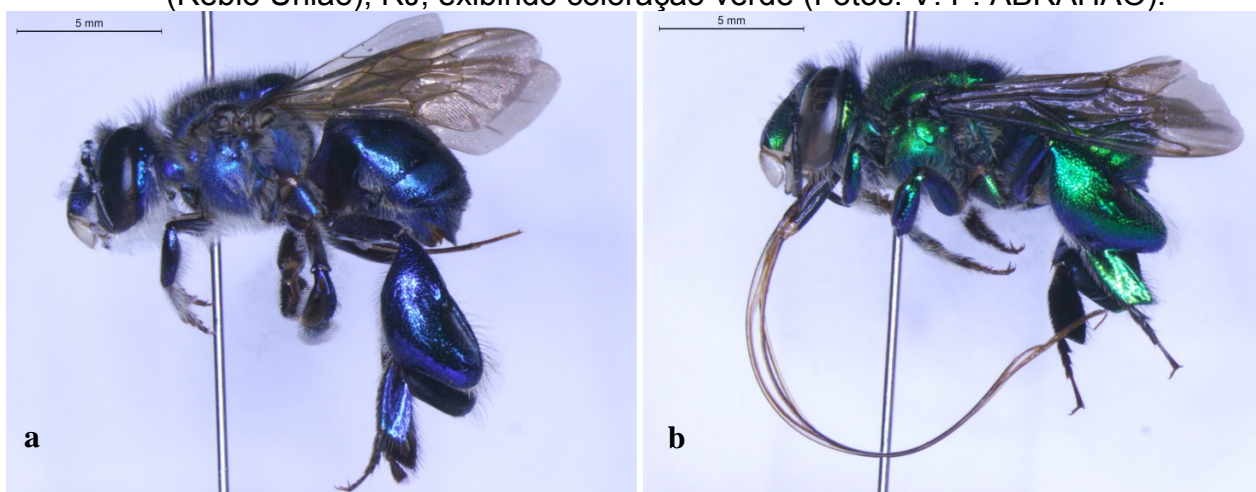
Assim, considerando o exposto, o presente trabalho teve como objetivo obter informações, com base em marcadores microssatélites e mitocondriais, sobre a diversidade e estrutura genética de populações de *E. iopoecila*, distribuídas em remanescente de Mata Atlântica das regiões sul e sudeste do Brasil. A escolha de tais marcadores se baseou no fato destes se mostrarem ferramentas eficientes em estudos populacionais de diferentes organismos (Avisé 2004; Solé-Cava & Cunha 2012), sendo os mesmos muito utilizados em estudos sobre a diversidade genética de populações, visando o manejo e conservação de recursos biológicos (Avisé, 2004).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

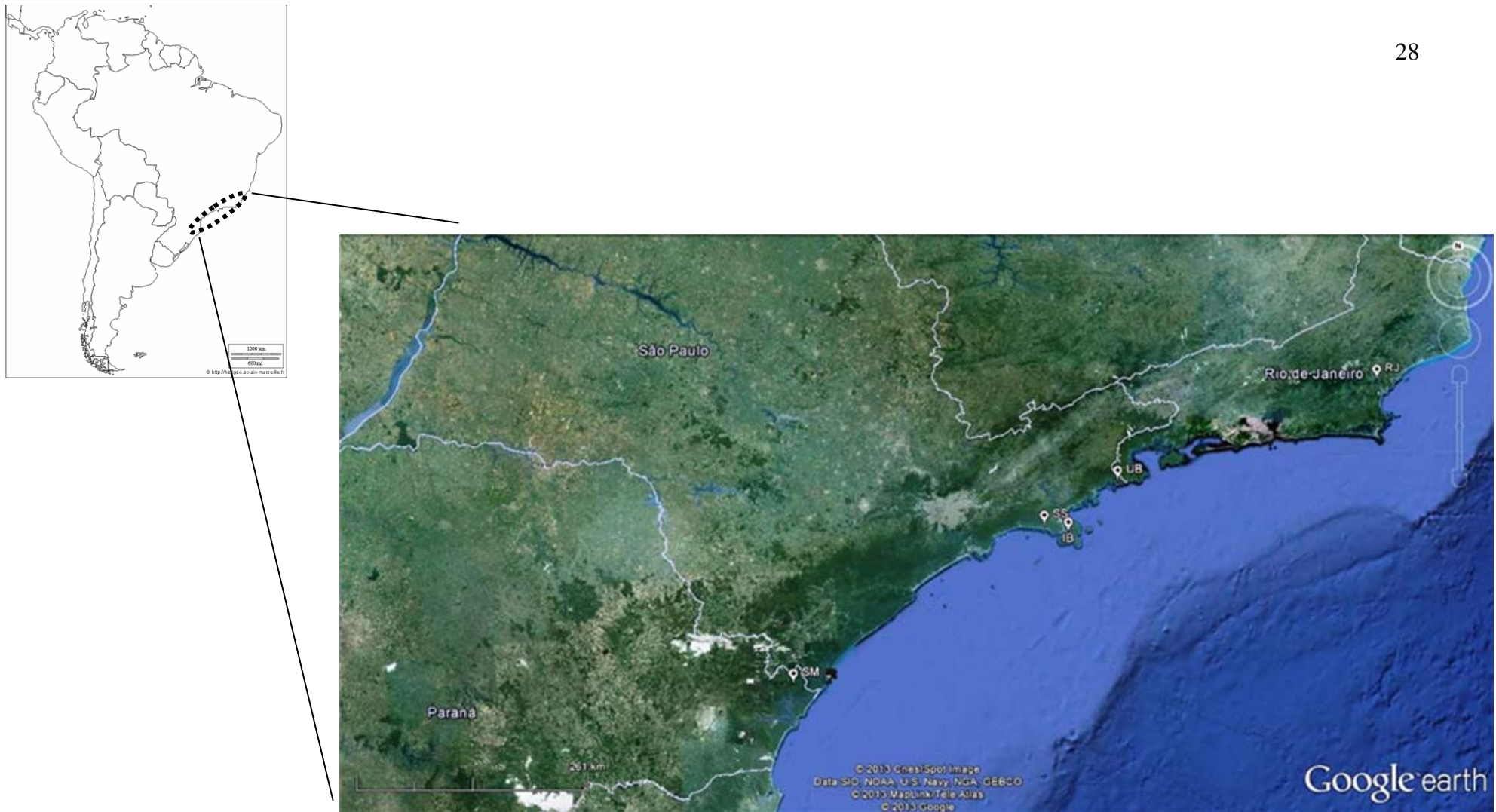
3.2.1 Áreas de Estudo

As coletas de machos de *Euglossa iopoecila* (Figura 1) foram realizadas em cinco remanescentes de Mata Atlântica, com vegetação do tipo floresta ombrófila densa, localizados nos estados do Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro (Figura 2).

Figura 1 - Machos de *Euglossa iopoecila* coletados: a) na Reserva Natural de Salto Morato, PR, exibindo coloração azul; b) na Reserva Biológica União (Rebio União), RJ, exibindo coloração verde (Fotos: V. P. ABRAHÃO).



No estado do Paraná as coletas foram realizadas na Reserva Natural de Salto Morato (RNSM) (25°10'S; 48°18'W) (SM), localizada no município de Guaraqueçaba, litoral norte do estado, nas encostas da Serra do Mar (Figura 2). A RNSM é uma Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN), possui uma área de 2.340 hectares e apresenta fitofisionomias variadas de Floresta Atlântica, predominando na área a formação do tipo Floresta Ombrófila Densa (FOD). As coletas em Salto Morato foram realizadas no período de abril de 2009 a maio de 2010.



- 1
- 2 **Figura 2:** Mapa da América do Sul com a indicação (pontilhado) da região incluindo os pontos de coleta nos estados do Paraná, São Paulo e Rio de
- 3 Janeiro. **SM** = Reserva Natural Salto Morato; **RJ** = Rebio União; **UB** = PESM Núcleo de Picinguaba; **SS** = PESM Núcleo de São Sebastião; **IB** = Parque
- 4 Estadual de Ilhabela. Imagens: Google Earth (02 de Fevereiro de 2013).

No estado de São Paulo as coletas foram realizadas em duas áreas inseridas no Parque Estadual Serra do Mar (PESM) e uma no Parque Estadual de Ilhabela (PEI). O PESM possui 315 mil hectares, em uma extensão que abrange desde a divisa de São Paulo com o Rio de Janeiro até o município de Itariri, no sul do estado, passando por toda a faixa litorânea do estado de São Paulo. O PESM representa a maior porção contínua preservada de Mata Atlântica do Brasil, devido ao seu tamanho, é administrado por oito núcleos distintos (Rocha Filho 2011). As coletas foram realizadas em áreas administradas pelos núcleos de São Sebastião (23°46'S; 45°36'W) - (SS) - no município de São Sebastião, e de Picinguaba (23°21'S; 44°49'W) - (UB) - no município de Ubatuba.

Representado por um conjunto de ilhas, o PEI localiza-se no município de Ilhabela e caracteriza-se por ser um parque arquipélago, apresentando uma área 27.025 hectares, incluindo um total de 12 ilhas, dois ilhotes e duas lajes. No PEI as coletas foram realizadas na maior ilha do arquipélago, a Ilha de São Sebastião (23°50'S; 45°21'W) (IB), com 33.593 ha de área, sendo 85% deste total, áreas protegidas pelo PEI (Francisco 2012). A Ilha de São Sebastião fica a aproximadamente 2.000 metros de distância do continente.

No estado do Rio de Janeiro as coletas foram realizadas na Reserva Biológica União (Rebio União) (22°26'S; 42°01'W) (RJ), a qual é administrada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio. A Rebio União está localizada na baixada litorânea do estado do Rio de Janeiro, abrangendo os municípios de Rio das Ostras, Casemiro de Abreu e Macaé. Na representatividade da Mata Atlântica, a Rebio União protege amostras de Floresta Ombrófila Densa, sendo uma das áreas mais bem preservadas da baixada litorânea do estado, apesar de existirem áreas na Rebio União em regeneração, que foram alteradas no passado.

As coletas foram feitas ao longo de 707 km do Corredor de Mata Atlântica da Serra do Mar, sendo que a menor distância está entre os pontos de São Sebastião (SS) e Ilhabela (IB) (30 km), (Tabela 1).

Tabela 1 - Distância geográfica em quilômetros (km) entre as áreas onde as populações de *E. iopoecila* foram amostradas (**SM** = Reserva Natural Salto Morato; **RJ** = Rebio União; **UB** = PESM Núcleo de Picinguaba; **SS** = PESM Núcleo de São Sebastião; **IB** = Parque Estadual de Ilhabela).

Entre remanescentes	Distância Geográfica (km)
SM x RJ	707
SM x UB	405
SM x SS	313
SM x IB	332
RJ x UB	305
RJ x SS	395
RJ x IB	375
UB x SS	68
UB x IB	76
SS x IB	30

3.2.2 Coletas

As metodologias de amostragem dos machos de abelhas foram baseadas em Sofia & Suzuki (2004) e Aguiar & Gaglianone (2008). Todas as coletas (exceto da Reserva Natural Salto Morato) foram realizadas em março de 2012. Os esforços de coleta nos seguintes remanescentes foram: 18 horas tanto para os remanescentes de São Sebastião, quanto de Ilhabela, 21 horas para o remanescente de Ubatuba e 25 horas no remanescente do Rio de Janeiro. As coletas, usualmente, ocorreram no período entre 9h00 e 14h00 horas. Entretanto, no Rio de Janeiro (Rebio União) as amostragens foram realizadas no período das 8h00 às 16h00, durante quatro dias consecutivos.

Para as coletas de machos de Euglossini foram utilizadas iscas-odores de oito essências químicas diferentes: eucaliptol, eugenol, beta-ionona, vanilina, salicilato de metila, cinamato de metila, benzoato de benzila e acetato de benzila. Estas iscas ficavam dispostas em um cordão amarrado à vegetação local, a aproximadamente 1,5 m do solo, e cerca de 1 m entre si (Figura 3a). Adicionalmente, na tentativa de incrementar o esforço de coleta foram também usadas, para a coleta dos machos, armadilhas de garrafas PET (Figura 3b), contendo uma das seguintes essências químicas: eucaliptol, eugenol e beta-ionona, as quais mostraram mais atrativas para *E. iopoecila* (Giangarelli & Sofia 2011).

Figura 3 - Iscas-Odores. a) Disposição das iscas-odores em um dos pontos de amostragem. b) Armadilha de garrafa PET, suspensa na vegetação da área de amostragem (Fotos: R.E.S. Penha).



Os machos atraídos às iscas expostas livremente na vegetação foram capturados com uma rede entomológica, armazenados em frascos individuais e acondicionados em freezer -20°C . De forma similar, os machos capturados nas armadilhas PET foram também armazenados em freezer -20°C . As espécies coletadas foram identificadas e separadas no Laboratório de Genética e Ecologia Animal (LAGEA) da Universidade Estadual de Londrina. Nas localidades onde a coleta de *E. iopoecilafoi* maior que 60 indivíduos, número que tem se mostrado informativo para estudos de Euglossini (Boff 2012; Freiria *et al.* 2012), foi feita a seleção aleatória de 60 machos, que foram utilizados nas análises moleculares. Quando amostrado um número inferior a 60 abelhas, foram utilizados todos os espécimes coletados, uma vez que foi amostrado um número inferior a 60 abelhas. Particularmente, nos casos de Ilhabela (IB) e São Sebastião (SS), em razão de um número bastante reduzido de machos terem sido coletado durante as amostragens, foram acrescentados às amostras destes dois locais, outros machos desta espécie coletados em SS ($n = 37$) e em IB ($n = 47$), os quais foram cedidos pelo Dr. Samuel Boff. Embora estes indivíduos tenham sido amostrados em outros pontos de coleta nestes dois municípios, eles foram considerados como amostra de uma única população em cada uma destas duas localidades de estudo. Na Tabela 2 está totalizado o número de indivíduos utilizados para no presente estudo.

Tabela 2 - Número de machos amostrados por localidade e siglas das áreas de estudo usadas na identificação das cinco áreas

Localidade	Número de Indivíduos
Salto Morato (SM)*	60
São Sebastião (SS)**	57
Ilhabela (IB)**	57
Ubatuba (UB)	37
Rebio União (RJ)*	60
Total	271

* Áreas onde foram coletados mais de 60 indivíduos. **Amostras que incluíram machos de abelhas doados.

3.2.3 Extração de DNA

Para a extração de DNA foi retirada a terceira perna do lado esquerdo dos indivíduos. A fim de manter alguns indivíduos íntegros, para depósito em coleção entomológica, amostras de DNA destes indivíduos foram obtidas a partir da musculatura do tórax destes, a qual foi removida com auxílio de um pinça. Posteriormente, a cabeça da abelha foi colada na sua posição de origem. A extração de DNA total foi feita por meio do método fenol-clorofórmio, seguindo os protocolos de Almeida *et al.* (2001), com pequenas modificações. A musculatura ou a perna da abelha foram colocadas em microtubos, contendo 300 μ L de tampão de extração (Tris-HCl 500 mm, EDTA 20 mm, NaCl 10 mm pH 8.0e 1% SDS) e 5 μ L de proteinase K (20 μ g/ μ L), sendo estes dilacerados com o auxílio de uma pequena tesoura. Em seguida, este material foi mantido em banho-maria a 64°C por duas horas. Após este período foi feito as lavagens em fenol clorofórmio. O DNA obtido foi ressuspendido em 30 μ L de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e armazenado em freezer a -20°C. A concentração de DNA foi mensurada utilizando um fluorímetro DyNA Quant 200 (Hoefer), seguindo-se a metodologia de quantificação proposta pelo fabricante. Após a leitura, as amostras de DNA foram diluídas em água para uma concentração de 5 ng/ μ L, adequada para o processo de amplificação via PCR.

3.2.4 Marcadores Mitocondriais

3.2.4.1 Amplificação

Os *primers* CB-J-10612 (Simon *et al.*1994) e AMB16 (Arias *et al.*2008) foram utilizados para amplificar um segmento de cerca de 651 pb do gene mitocondrial *Cyt b*. Para montagem da reação para PCR foram utilizados 10 ng de DNA, tampão 1x, 3 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada *primer*, 200µM de dNTP, 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), em uma reação de 20 µL. As amplificações foram feitas em termocicladores (PCT-100 Peltier Thermal Cycler MJ Research Inc.e Multigen LabNetBios), de acordo com o seguinte protocolo: uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos (desnaturação a 94°C por 60 segundos, hibridação a 48°C por 80 segundos e extensão a 72°C) ao final uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para checagem da amplificação os produtos da PCR foram, então, submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR[®] *green* (Life Technologies) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

3.2.4.2 Sequenciamento

As amostras que amplificaram foram subsequentemente purificadas com o kit illustra ExoStar PCR (GE[®]Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante e submetidas à reação de sequenciamento com o kit BigDye[®] Terminator v3.1 (Applied Biosystems[®]). Em seguida, o produto da reação de PCR foi purificado e precipitado com álcool e EDTA, o DNA resuspendido em 10 µL de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems[®]) e sequenciado em sequenciador automático, modelo Applied Biosystems[®] 3500 XL Genetic Analyzer.

3.2.5 Marcadores Microsatélites

3.2.5.1 Construção e seleção de *primers*

Para as amplificações dos locos de microsatélites foram selecionados quatro pares de *primers* heterólogos, descritos para outras espécies de

Euglossa (Souza *et al.* 2007; Paxton *et al.* 2009), e que no presente trabalho revelaram polimorfismos para *E. iopoecila*. Adicionalmente, outros *primers* específicos para *E. iopoecila* foram construídos a partir de uma biblioteca enriquecida de microssatélites seguindo o protocolo descrito por Billotte *et al.* (1999), com modificações proposta por Brito *et al.* (2009). A biblioteca foi construída no Laboratório de Genética e Evolução de Abelhas da Universidade de São Paulo.

Um total de 80 clones recombinantes foi sequenciado na empresa Macrogen (Coreia do Sul). As sequências foram analisadas no *software* BioEdit v.7.0 (Hall 1999) e os *primers* desenhados utilizando o *software* Primer 3 (Rozen & Skaletsky 2000). O *software* Autodimer (Vallone & Butler 2004) foi utilizado para identificar possíveis problemas com *hairpinedímeros* entre os *primers*. Do total de *primers* obtidos, seis foram selecionados (iop1, iop2, iop3, iop4, iop13 e iop16) para as análises populacionais no presente trabalho.

Os *primers* foram modificados para que os fragmentos gerados pudessem ser analisados em sequenciador automático. Para tal técnica, os *primers forward* foram modificados na sua extremidade 5', na qual foi adicionada uma sequência "Tag" (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'). Nesta sequência se liga o *primer* M13 marcado com fluoróforos 6-FAM (azul), NED (amarelo) ou HEX (verde). Esta metodologia elimina a necessidade da marcação dos *primers forward* em todos os locos (Schuelke 2000).

3.2.5.2 Amplificação e Genotipagem dos Fragmentos

As reações de PCR ocorreram da seguinte forma: 2,5 µL de *GoTaq® Colorless Master Mix 2X* (Promega) 0,125 µL de um *mix* composto do *primer forward Tag* (0,5µM) + *primer reverse* (5 µM); 0,125 µL do *primer* M13 (5 µM) marcado com fluorocromo; 0,1µL de glicerol 50% e 1µL do DNA molde a 5 ng/µL e 1,15 µL de água *Nuclease Free* (Promega), totalizando uma reação de 5 µL. As amostras foram amplificadas em termocicladores (PCT-100 Peltier Thermal Cycler MJ Research Inc.e Multigen LabNetBios), de acordo com o seguinte protocolo: 94°C por 4 minutos, seguido por 10 ciclos de 94°C/30 s, 56°C/1 min, 72°C/1 min; seguido por 25 ciclos de 89°C/30 s, 56°C/1 min, 72°C/1 min, com uma extensão final de 72°C por 30 minutos.

Posteriormente, os produtos de PCR foram diluídos na proporção de 1:10 em H₂O a 2 µL; desta diluição foram acrescentados 0,15 µL do marcador de peso molecular GeneScan LIZ600 (Applied Biosystems) e 7,85 µL de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems). As genotipagens dos fragmentos foram realizadas em sequenciador automático, modelo Applied Biosystems® 3500 xL Genetic Analyzer.

3.2.6 Análise dos dados

3.2.6.1 DNAMt

As sequências foram visualizadas, alinhadas e editadas no *software* Bioedit v7.1.7 (Hall 1999). Os *contigs* foram desenhados com o programa DNA Baser Sequence Assembler v3.x (2012). Posteriormente, o programa DnaSP v. 5 (Librado & Rozas, 2009) foi utilizado para gerar os dados para os programas ARLEQUIN 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010) e NETWORK v. 4.6 (Polsin & Daneshmand 2003).

Para as análises dos dados foram utilizadas somente as amostras que amplificaram e apresentaram boa qualidade no sequenciamento. O número de indivíduos analisados para a região mitocondrial está sumarizado na Tabela 3.

Tabela 3 - Número de machos que amplificaram e apresentam boa qualidade no sequenciamento.

Localidade	Número de Indivíduos
Salto Morato (SM)	50
São Sebastião (SS)	18
Ilhabela (IB)	10
Ubatuba (UB)	28
Rebio União (RJ)	48
Total	154

O programa NETWORK v. 4.6 (Polsin & Daneshmand, 2003) foi utilizado para construir uma rede de relações haplotípicas através do método “median-joining” (Bandelt *et al.* 1999).

O programa ARLEQUIN 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010) foi utilizado para identificar e calcular a frequência de haplótipos, e para calcular a diversidade haplotípica e nucleotídica de acordo com Nei (1987), neste programa foi feita a análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992); esta análise

serviu para gerar estimativas da variância genética (Φ_{ST}) entre os pares de populações, o qual pode ser usado como uma estimativa da distância genética entre estas (Excoffier & Lischer 2010). A significância de Φ_{ST} foi estimada por meio de 1000 aleatorizações e foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi utilizado para estimar a existência de possíveis correlações entre distância geográfica em quilômetros e os valores de distância genética (Φ_{ST}). Para esta análise foi utilizado o programa BioEstat 5.3.

3.2.6.2 Microssatélites

Os dados de genotipagem gerados pelo sequenciador automático foram visualizados e analisados pelo programa GeneMarker V2.2.0 (*SoftGenetics, State College, PA*).

A diversidade genética foi estimada a partir do número médio de alelos por loco (N_a) e do número efetivo de alelos (N_e) (Kimura & Crow 1964; Jost 2008), utilizando-se o programa computacional GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse 2012). Este programa foi usado para calcular a frequência dos alelos nas populações. Para medida de diversidade foi utilizado o valor de heterozigosidade média esperada (\bar{H}) calculada pelo programa computacional ARLEQUIN 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer. 2010).

Para a análise da estrutura genética das populações foi utilizado a estatística F (Wright 1951). Para esta análise foi empregado o programa computacional ARLEQUIN 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010), o qual por meio da análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992), estima os valores de Φ_{ST} (um análogo ao F_{ST}). Esta análise gerou estimativas da variância genética em diferentes níveis hierárquicos (dentro e entre as populações) e do índice Φ_{ST} global e também entre pares de populações, o qual pode ser usado como uma estimativa da distância genética entre estas (Excoffier & Lischer 2010). A significância de Φ_{ST} foi estimada por meio de 1000 aleatorizações e foram considerados significativos valores de $P < 0,05$. Existe uma preocupação com o uso do Φ_{ST} e seus análogos. Alguns autores apontam que estas estimativas podem subestimar a diferenciação genética quando aplicadas a locos muito polimórficos, como os de microssatélite (Hedrick 2005; Meirmans 2006; Jost 2008). Este problema pode ser contornado

utilizando algumas estimativas que fazem correções nos valores de Φ_{ST} e seus análogos (Hedrick 2005; Jost 2008). Uma destas estimativas (D_{est}) foi proposta por Jost (2008). Levando em consideração esta preocupação, no caso dos marcadores microsatélites foram realizadas estimativas de D_{est} , além das estimativas de Φ_{ST} . As estimativas de D_{est} foram realizadas utilizando-se o programa computacional *online* SMOGD (Crawford 2010). Os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram estimados por meio de 1.000 repetições de “*bootstrap*”.

O programa STRUCTURE versão 2.3 foi utilizado para a determinação da estrutura genética dos grupos amostrados, a partir de análise bayesiana. Este programa define se os grupos analisados estão ou não estruturados em K populações. Foram testadas as possibilidades da existência de uma a 15 populações, e a análise de cada K foi repetida 20 vezes, com 10.000 interações no “*burn-in*” e 100.000 interações na Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC). O STRUCTURE HARVESTER 0.6.93 (Earl&vonHoldt2012) foi utilizado para ordenar os resultados e inferir estatisticamente qual o K mais provável da análise usando a estatística ΔK (Evanno *et al.* 2005).

O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi utilizado para estimar a existência de possíveis correlações entre distância geográfica em quilômetros e os valores de distância genética, aqui expressos por: Φ_{ST} e D_{est} . Para esta análise foi utilizado o programa BioEstat 5.3. Neste estudo, foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 DNAmT (*Cyt b*)

Para todos os indivíduos analisados, foi obtida uma sequência de 651 pb, correspondendo a um segmento do gene *Cyt b*, a qual apresentou 22 sítios variáveis e um total de 26 haplótipos diferentes (Tabela 4). Os valores globais de diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π) encontrados foram 0,773 e 0,0036, respectivamente.

Tabela 4 - Número de sítios polimórficos, número de haplótipos, diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica de machos *E. iopoecila* sequenciadas com o marcador mitocondrial (*Cyt b*) de todos os remanescentes de Mata Atlântica juntos.

	<i>Cyt b</i>
Número de indivíduos analisados	154
Número de sítios polimórficos	22
Número de haplótipos	26
Diversidade haplotípica	0,773
Diversidade nucleotídica	0,0036

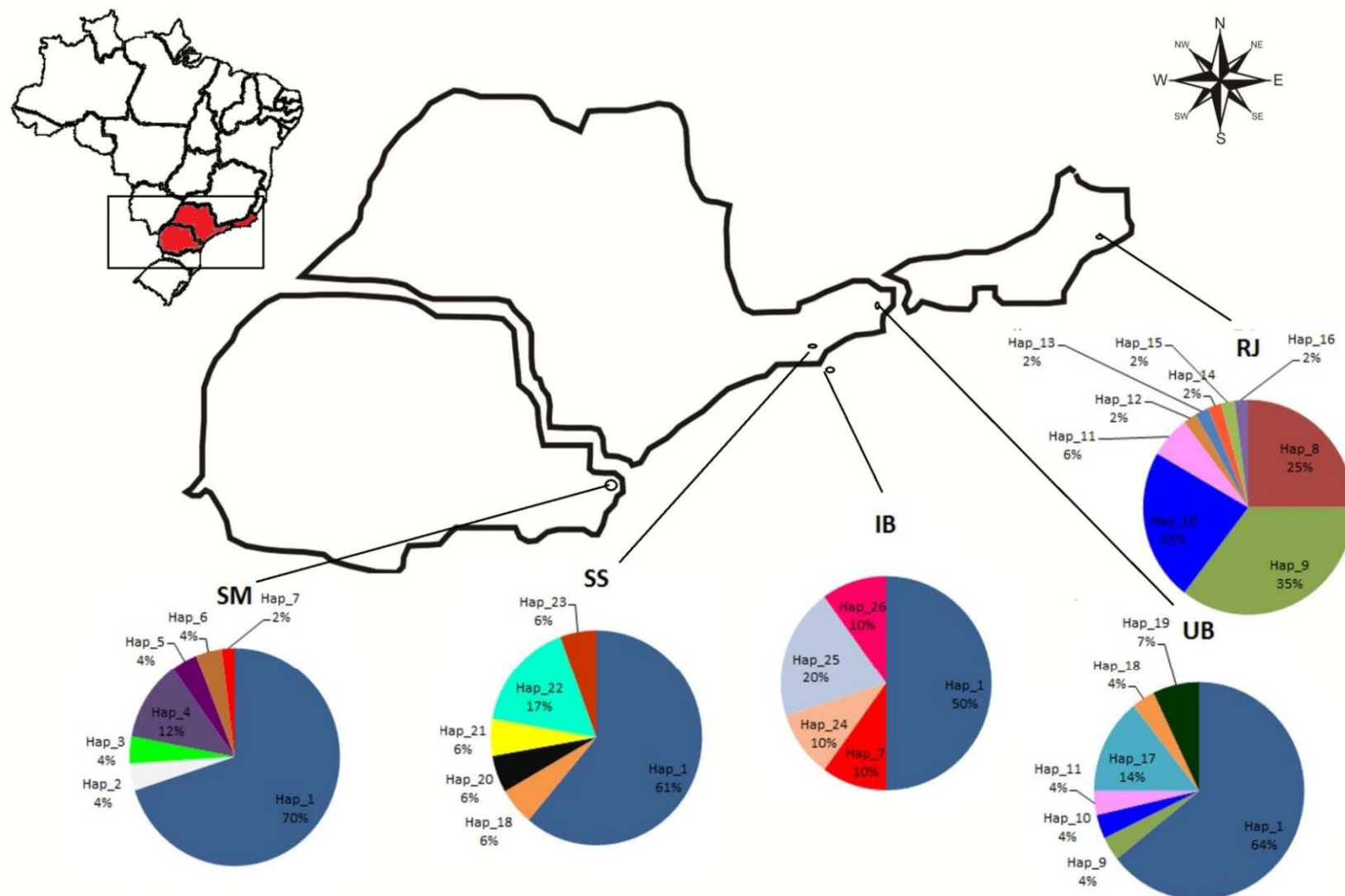
Na análise de diversidade genética por população, o número de haplótipos variou de cinco no remanescentes IB a nove no remanescentes RJ, enquanto as diversidades haplotípica (*h*) e nucleotídica variaram de 0,499 (SM) a 0,77 (RJ) e de 0,0022 (IB) a 0,0087 (SM), respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 - Número de sítios polimórficos, número de haplótipos, diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica de machos *E. iopoecila* sequenciadas com o marcador mitocondrial (*Cyt b*) de todos os remanescentes de Mata Atlântica separados (**SM** = Reserva Natural Salto Morato; **RJ** = Rebio União; **UB** = PESM Núcleo de Picinguaba; **SS** = PESM Núcleo de São Sebastião; **IB** = Parque Estadual de Ilhabela).

	Populações				
	SM	SS	IB	UB	RJ
Número de indivíduos analisados	50	18	10	28	48
Número de sítios polimórficos	6	10	6	7	7
Número de haplótipos	7	6	5	7	9
Diversidade haplotípica	0,499	0,621	0,756	0,577	0,770
Diversidade nucleotídica	0,0087	0,0036	0,0026	0,0022	0,0024

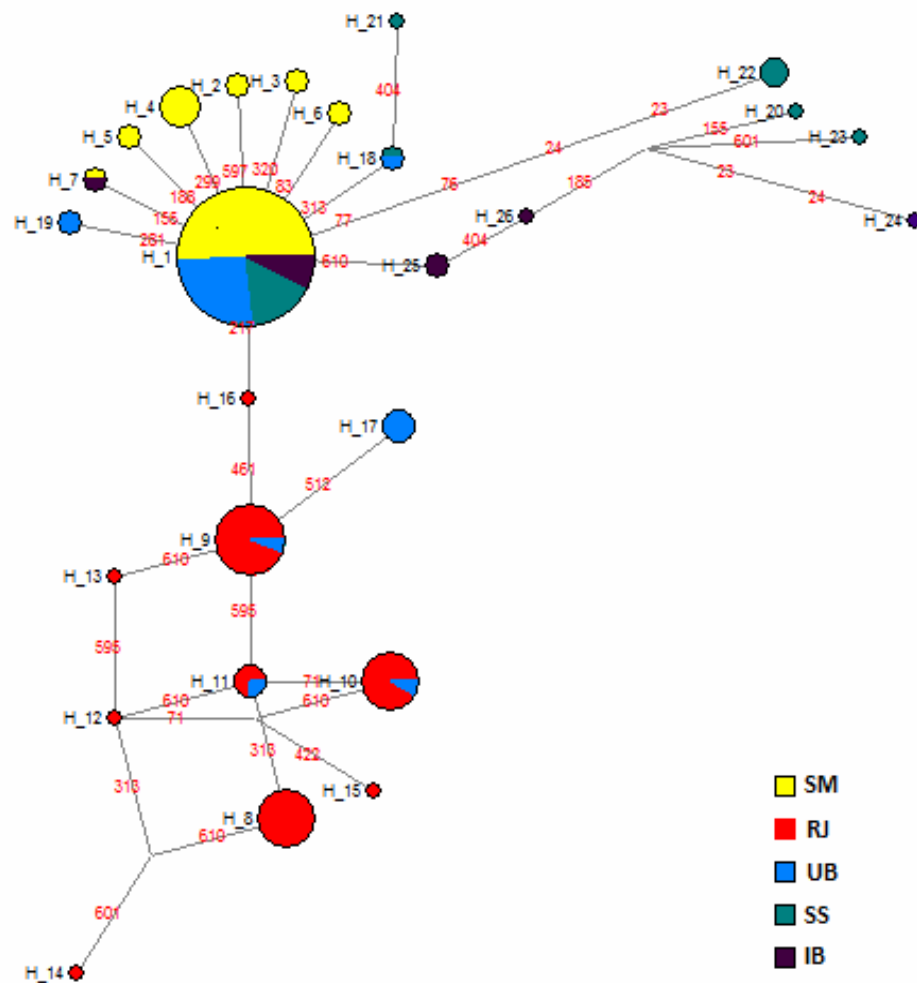
Dos haplótipos encontrados, o haplótipo Hap_1 foi o mais comum, sendo apresentado por 70 indivíduos do total de 154 analisados, e uma frequência de ocorrência variando de 50% (IB) a 70% (SM). Contudo, interessante, este haplótipo mostrou-se ausente da amostra de *E. iopoecila* coletada em RJ. Vale destacar ainda que, a amostra do RJ compartilhou haplótipos somente com UB. Neste caso, os três haplótipos compartilhados entre RJ e UB foram: Hap_9, Hap_10 e Hap_11 (Figura 4).

Figura 4 - Frequências de Haplótipos nos remanescentes amostrados para *E. iopoecila* (**SM** = Reserva Natural Salto Morato; **RJ** = Rebio União; **UB** = PESM Núcleo de Picinguaba; **SS** = PESM Núcleo de São Sebastião; **IB** = Parque Estadual de Ilhabela).



A rede de inter-relações haplotípicas, demonstra que 19 haplótipos foram exclusivos, sendo: quatro com ocorrência apenas no remanescente SM, quatro em SS, três em IB, dois em UB e seis em RJ. Dos 26 haplótipos encontrados, 17 (65,38%) ocorreram em frequências acima de 5%, apresentando, usualmente, frequências de ocorrência variáveis entre as diferentes amostras. Dentro da população de SM os indivíduos variaram somente em 1 pb entre os haplótipos, dentre da população do RJ houve uma variação de até 9 pb entre os haplótipos. (Figura 5).

Figura 5 - Rede de haplótipos observados em *E. iopoecila* nos remanescentes analisados. O tamanho dos círculos refere-se à frequência de cada haplótipo. Linhas entre haplótipos indicam apenas um passo mutacional. Números em vermelho a posição da mutação. (**SM** = Reserva Natural Salto Morato; **RJ** = Rebio União; **UB** = PESM Núcleo de Picinguaba; **SS** = PESM Núcleo de São Sebastião; **IB** = Parque Estadual de Ilhabela).



A análise da variância molecular (AMOVA) aplicada aos resultados obtidos no sequenciamento do segmento de 651 pb do *Cyt b* (DNAm) revelou que 50,8% da variação genética encontrada está presente entre as populações e 49,20% dentro destas. O valor global de Φ_{ST} encontrado foi de 0,508 ($P < 0,00001$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise da variância molecular (AMOVA) e variância da frequência gênica (Φ_{ST}) aplicado ao marcador mitocondrial (*Cyt b*) para as populações de *E. iopoecila* coletadas nos cinco remanescentes de Mata Atlântica estudados.

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação	Φ_{ST}
Entre as populações	4	80,273	0,67552	50,82	0,508*
Dentro das populações	149	97,396	0,65367	49,18	
Total	153	177,669	1,32918		

* $P < 0,00001$

Nas comparações entre os pares de populações os valores de Φ_{ST} , com exceção do comparativo SS - IB, mostraram valores de Φ_{ST} significativamente diferente de zero ($P < 0,00001$). O maior valor de Φ_{ST} foi observado entre o par SM e RJ ($\Phi_{ST} = 0,70$), enquanto o menor valor foi obtido para o par UB - SS (0,12) (Tabela 7).

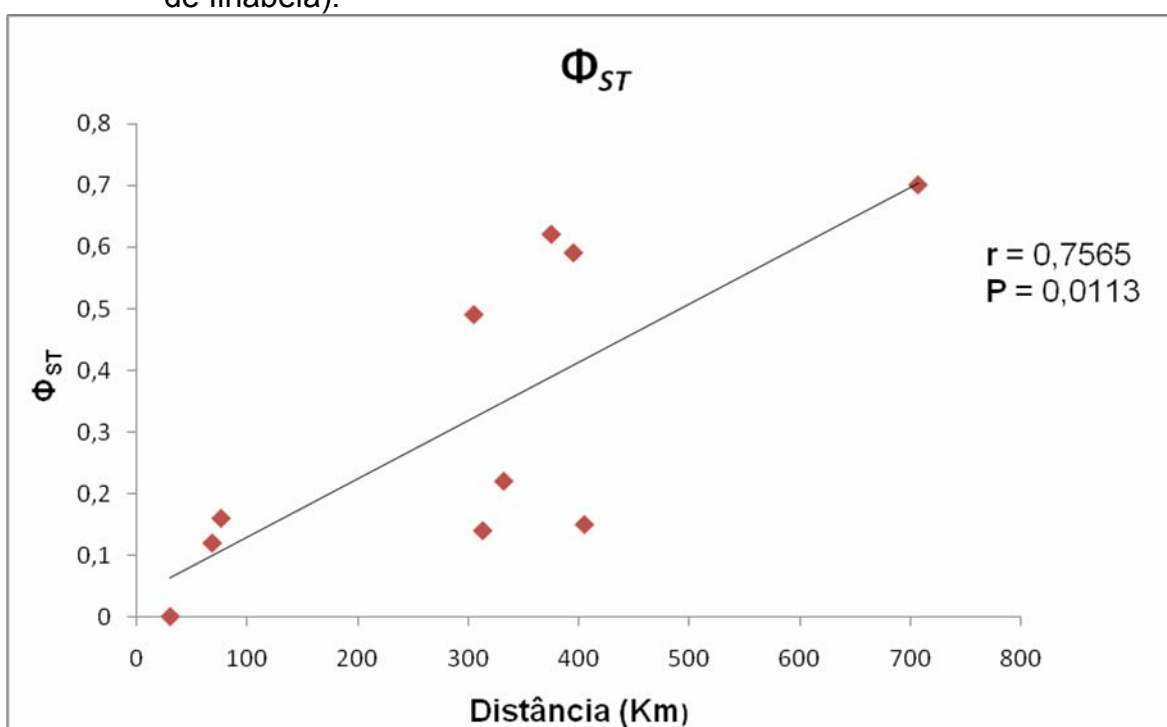
Tabela 7 - Valores de Φ_{ST} obtidos, por meio da AMOVA, aplicada aos marcadores mitocondriais (*Cyt b*), em comparativos envolvendo populações de *E. iopoecila* coletadas nos cinco remanescente de Mata Atlântica estudados (**SM** = Reserva Natural Salto Morato; **RJ** = Rebio União; **UB** = PESM Núcleo de Picinguaba; **SS** = PESM Núcleo de São Sebastião; **IB** = Parque Estadual de Ilhabela).

Entre remanescentes	Φ_{ST}
SM x RJ	0,70*
SM x UB	0,15*
SM x SS	0,14*
SM x IB	0,22*
RJ x UB	0,49*
RJ x SS	0,59*
RJ x IB	0,62*
UB x SS	0,12*
UB x IB	0,16*
SS x IB	0,001

* $P < 0,00001$

Na análise de correlação de Pearson entre a distância geográfica (km) e a distância genética (Φ_{ST}) das áreas estudadas, para a região mitocondrial (*Cyt b*) foi encontrada uma forte correlação positiva significativa ($r = 0,7565$; $P < 0,05$) (Figura 6).

Figura 6 - Correlação linear de Pearson entre distância geográfica (km) e distância genética Φ_{ST} estimada a partir da análise mitocondrial (*Cyt b*), entre os pares de populações estudadas. (SM X RJ; SM X UB; SM X SS; SM X IB; RJ X UB; RJ X SS; RJ X IB; UB X SS; UB X IB; SS X IB) (SM = Reserva Natural Salto Morato; RJ = Rebio União; UB = PESM Núcleo de Picinguaba; SS = PESM Núcleo de São Sebastião; IB = Parque Estadual de Ilhabela).



3.3.2 Marcadores Microssatélites

As análises envolvendo os dez locos de microssatélites revelaram um total de 134 alelos distintos. O número de alelos encontrados por loco variou de quatro (iop16) a 33 (iop3) (Tabela 8) e o tamanho dos alelos amplificados variou de 161 a 287 pb.

Tabela 8 - Sequência do *primers*, número de alelos (Na) e o tamanho dos alelos em pares de base observados para todas as amostras analisadas de *E. iopoecila*.

Loco	Sequência (5' - 3')	Na	Tamanho (pb)
ann24	F: GTCGGACATTAGGGTGATGG R: TCCGTTTGAATCTGTGGTCTC	12	173 – 205
ann37	F: CGTTCGAAGGAGAGAACGAC R: CGGGATACAGGAAAGGAGAG	15	168 – 199
Egc18	F: TGATACAGGTCCGGCGTAAAA R: GGTA ACTCCGTCCGCGAACTA	6	188 – 204
Egc26	F: GCCGAACAAACATCTCGTCT R: CGGA ACTTTGATATCGTCGAG	9	161 – 196
iop1	F: TCTCCCGTAAAATGCTCTCG R: CCCGGTAGACGTTTGCTCG	21	195 – 248
iop2	F: CGTCTCCTTTCACCACCTTC R: GGAAGAAGAGACGCACAAGG	7	195 – 212
iop3	F: CGCGAACATTGGAACGAATC R: CGCAGGCTCTTAGGAGGTAA	33	228 – 287
iop4	F: AGAATAAGCCGACGGAAACC R: AGCTGTGTTTCCGCTTTGAC	17	207 – 258
iop13	F: ACGGGACAACCCCGTATAAT R: AGGGATTTCTCTCTCTCG	10	161 – 180
iop16	F: CCACGACTTAACGAGCCTTC R: GTGAAGGAGTGGGACCTCTG	4	203 – 212

Na Tabela 9 são apresentados os números de alelos de microssatélites encontrados para os diferentes locos e populações de *E. iopoecila*.

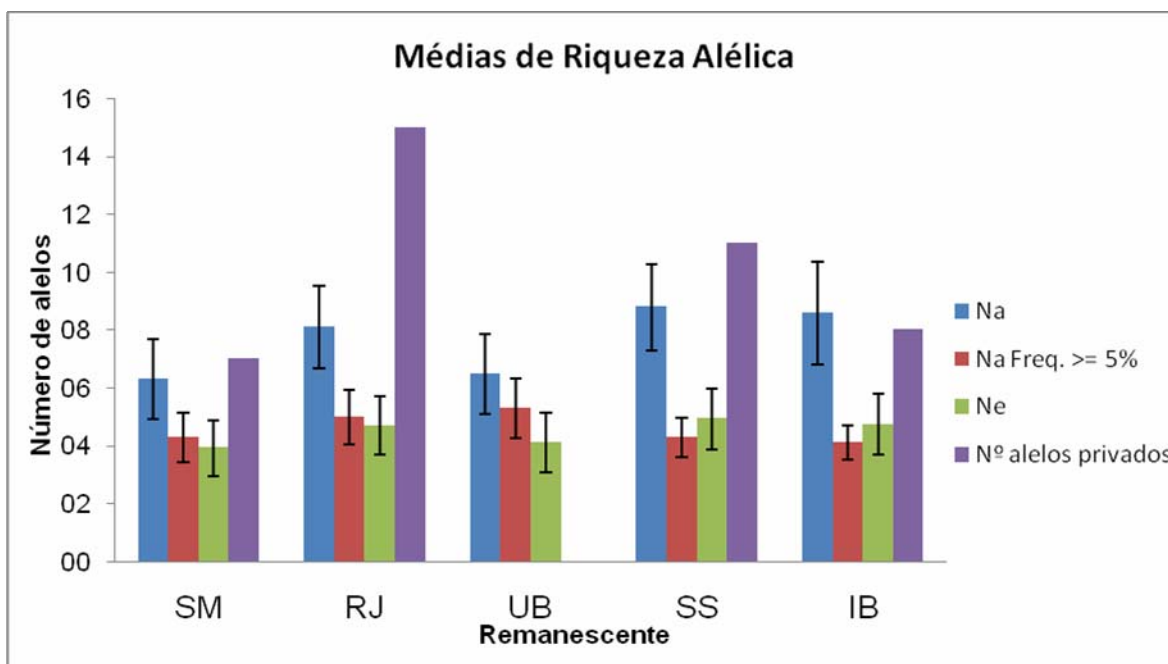
Tabela 9 - Número de alelos encontrados por remanescente para os locos de microssatélites em *E. iopocilanos* cinco remanescentes estudados (**SM** = Reserva Natural Salto Morato; **RJ** = Rebio União; **UB** = PESM Núcleo de Picinguaba; **SS** = PESM Núcleo de São Sebastião; **IB** = Parque Estadual de Ilhabela).

	SM	SS	IB	UB	RJ
ann24	4	6	8	6	9
ann37	8	13	10	11	12
Egc18	3	4	3	2	4
Egc26	4	7	4	3	5
iop1	16	16	18	14	14
iop2	4	7	7	4	5
iop3	9	16	18	10	16
iop4	10	10	10	10	7
iop13	3	6	6	3	6
iop16	2	3	2	2	3
Total	63	88	86	65	81

Os resultados referentes à frequência de alelos encontrados nas diferentes populações mostraram que, dos 134 alelos amostrados, 93 foram compartilhados por duas ou mais populações, enquanto 41 foram alelos exclusivos; o remanescente UB foi o único que não teve alelo exclusivo.

Em relação à diversidade genética das populações estudadas, foi observado que as médias dos valores de riqueza alélica (N_a) para todos os locos analisados foi maior no remanescente SS (8,8), sendo também neste remanescente a maior média de alelos efetivos (N_e) (4,9). Em contrapartida, a população do remanescente SM (PR) foi a que apresentou os menores valores para N_a e N_e , sendo estes 6,3 e 3,9, respectivamente (Figura 7).

Figura 7 - Médias da riqueza alélica de todos os locos por remanescente estudado indicando o desvio padrão e o número de alelos privados. **Na**= Riqueza Alélica **Na Freq. \geq 5%** = Alelos com frequência maior ou igual a 5% **Ne**= Número Efetivo de Alelos. (**SM** = Reserva Natural Salto Morato; **RJ** = Rebio União; **UB** = PESM Núcleo de Picinguaba; **SS** = PESM Núcleo de São Sebastião; **IB** = Parque Estadual de Ilhabela).



Os valores de heterozigosidade média esperada em todas as populações variaram pouco: de 0,65 no remanescente SM (PR) a 0,72 no remanescente SS (SP). A heterozigosidade média obtida pSCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments A poor man ' s approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics .**Nature Biotechnology**, v. 18, p. 232 - 234, 2000.ara o total de indivíduos analisados foi de 0,72 (Tabela 10).

Tabela 10 - Heterozigosidade média esperada (\bar{H}), e heterozigosidade total esperada (\bar{H}_T) e desvio padrão (**dp**) para as populações de *E. iopoecila* dos cinco remanescentes estudados (**SM** = Reserva Natural Salto Morato; **RJ** = Rebio União; **UB** = PESM Núcleo de Picinguaba; **SS** = PESM Núcleo de São Sebastião; **IB** = Parque Estadual de Ilhabela). Os números entre parênteses correspondem ao total de indivíduos analisados por área de estudo

	Remanescentes					\bar{H}	dp	\bar{H}_T
	SM (60)	SS (57)	IB (57)	UB (37)	RJ (60)			
ann24	0,69	0,75	0,71	0,71	0,74	0,72	0,03	0,75
ann37	0,74	0,84	0,79	0,81	0,88	0,81	0,06	0,84
Egc18	0,45	0,53	0,51	0,46	0,59	0,51	0,06	0,53
Egc26	0,51	0,52	0,53	0,53	0,60	0,54	0,04	0,54
iop1	0,93	0,92	0,91	0,93	0,91	0,92	0,01	0,93
iop2	0,61	0,72	0,76	0,60	0,68	0,67	0,07	0,72
iop3	0,76	0,89	0,90	0,81	0,90	0,85	0,06	0,91
iop4	0,88	0,82	0,81	0,80	0,79	0,82	0,03	0,86
iop13	0,46	0,69	0,62	0,47	0,28	0,51	0,16	0,63
iop16	0,49	0,52	0,49	0,49	0,46	0,49	0,02	0,51
\bar{H}	0,65	0,72	0,70	0,66	0,68	0,68	0,03	0,72
dp	0,16	0,15	0,15	0,16	0,20	0,16	0,02	0,15

Para as amostras dos cinco remanescentes amostrados, a análise de variância molecular (AMOVA) revelou que a maior parte (94,6%) da variação genética se encontra dentro das populações. A diferenciação genética global obtida para o ϕ_{ST} foi de 0,054 ($P < 0,00001$) (Tabela 11).

Tabela 11 - Análise da variância molecular (AMOVA) e variância da frequência gênica (Φ_{ST}) das populações de *E. iopoecila* dos cinco remanescentes estudados.

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação	ϕ_{ST}
Entre as populações	4	111,122	0,16563	5,38	0,054*
Dentro das populações	799	2325,433	2,91043	94,62	
Total	803	2436,555	3,07606		

* $P < 0,00001$

O valor global estimado de D_{est} foi de 0,106 ($P < 0,00001$), indicando que há uma estruturação genética moderada entre as populações amostradas.

Nas comparações entre os pares de populações para os estimadores D_{est} e Φ_{ST} , os maiores valores foram observados entre os remanescentes RJ e IB (Tabela 12).

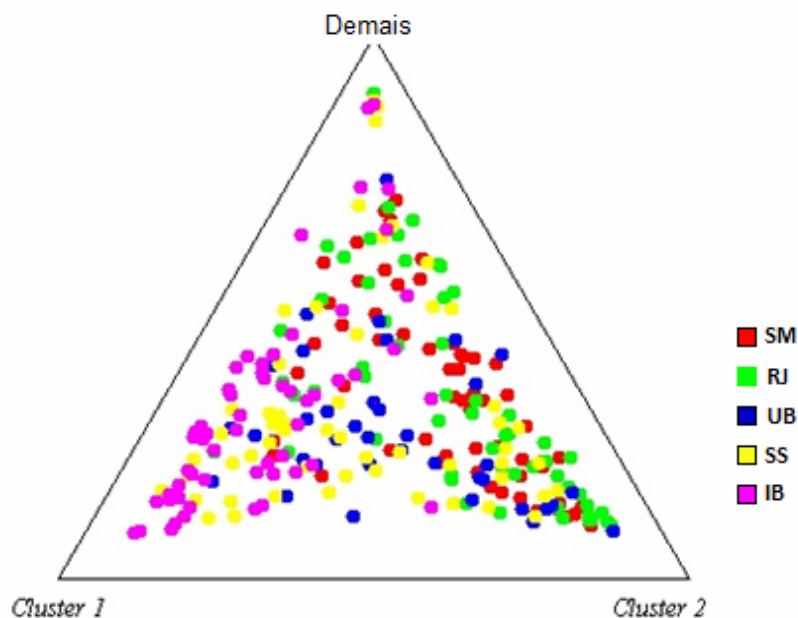
Tabela 12 - Valores de D_{est} e Φ_{ST} , para *E. iopoecila* entre os cinco remanescentes estudados (**SM** = Reserva Natural Salto Morato; **RJ** = Rebio União; **UB** = PESM Núcleo de Picinguaba; **SS** = PESM Núcleo de São Sebastião; **IB** = Parque Estadual de Ilhabela).

Entre remanescentes	D_{est}	Φ_{ST}
SM X RJ	0,15*	0,08*
SM X UB	0,11*	0,07*
SM X SS	0,11*	0,05*
SM X IB	0,15*	0,07*
RJ X UB	0,05*	0,04*
RJ X SS	0,10*	0,05*
RJ X IB	0,18*	0,09*
UB X SS	0,06*	0,04*
UB X IB	0,10*	0,06*
SS X IB	0,03*	0,03*

* $P < 0,01$

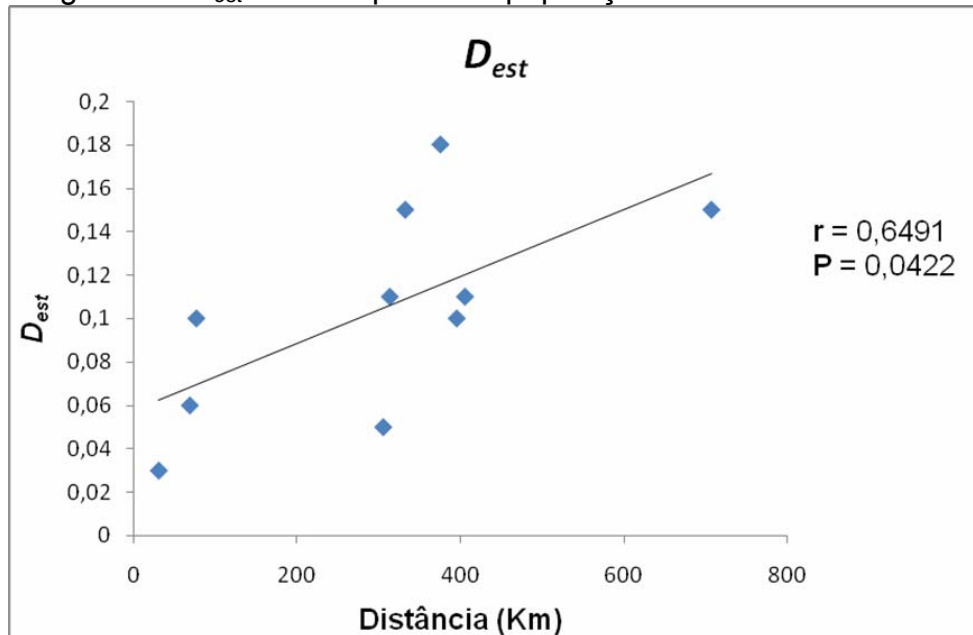
A análise bayesiana revelou a presença de três grupos ($K=3$), com uma mistura entre as populações dos cinco remanescentes analisados (Figura 8). Houve, contudo, uma tendência a formação de um agrupamento (*Cluster1*) entre os indivíduos de IB (cor rosa, Figura 8) com os de SS (em amarelo). Por outro lado no grupo 2 (*Cluster 2*) foi observado um agrupamento de abelhas de várias localidades, sem uma clara definição de grupos de populações.

Figura 8 - Representação gráfica dos agrupamentos Bayesianos (*cluster*) formados a partir de $K = 3$ para as amostras de *E. iopoecila*. Vermelho. (SM = Reserva Natural Salto Morato; RJ = Rebio União; UB = PESM Núcleo de Picinguaba; SS = PESM Núcleo de São Sebastião; IB = Parque Estadual de Ilhabela).



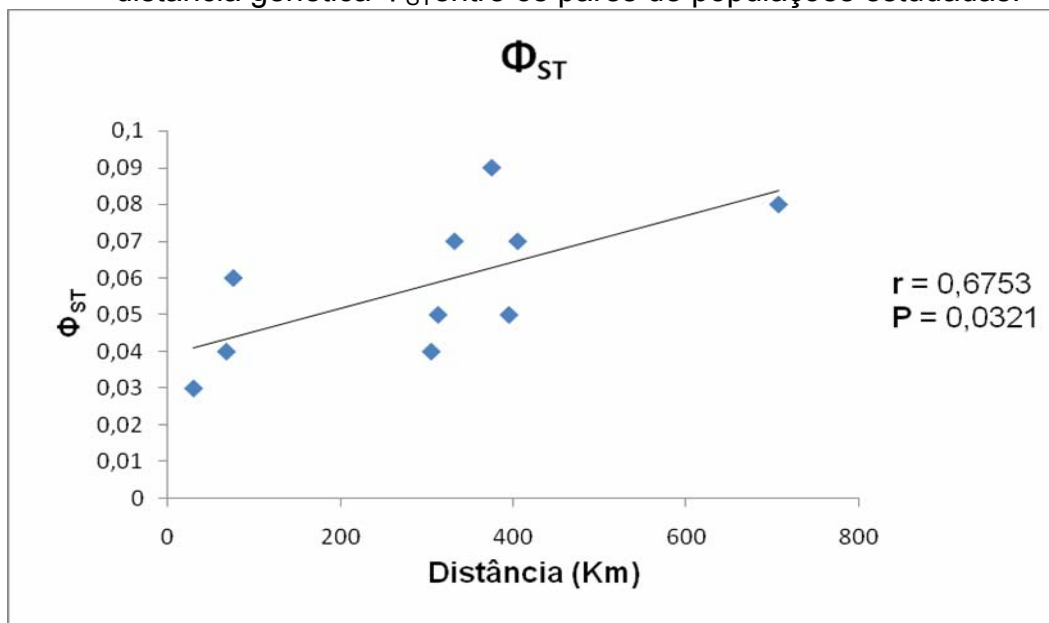
Na análise de correlação de Pearson entre a distância geográfica (km) e a distância genética das áreas estudadas, foi encontrada uma correlação positiva moderada significativa para os estimadores D_{est} ($r = 0,6491$; $P < 0,05$) (Figura 9) e Φ_{ST} ($r = 0,675$; $P < 0,05$) (Figura 10).

Figura 9 - Correlação linear de Pearson entre distância geográfica (km) e distância genética D_{est} entre os pares de populações estudadas.



(SM X RJ; SM X UB; SM X SS; SM X IB; RJ X UB; RJ X SS; RJ X IB; UB X SS; UB X IB; SS X IB)
 (SM = Reserva Natural Salto Morato; RJ = Rebio União; UB = PESM Núcleo de Picinguaba; SS = PESM Núcleo de São Sebastião; IB = Parque Estadual de Ilhabela).

Figura 10 - Correlação linear de Pearson entre distância geográfica (km) e distância genética Φ_{ST} entre os pares de populações estudadas.



(SM X RJ; SM X UB; SM X SS; SM X IB; RJ X UB; RJ X SS; RJ X IB; UB X SS; UB X IB; SS X IB)
 (SM = Reserva Natural Salto Morato; RJ = Rebio União; UB = PESM Núcleo de Picinguaba; SS = PESM Núcleo de São Sebastião; IB = Parque Estadual de Ilhabela).

3.4 DISCUSSÃO

Conhecer o grau de estruturação genética de uma população é essencial para a tomada de decisões envolvendo medidas de manejo e conservação de populações sob ameaças antrópicas (Solé-Cava & Cunha 2012), a exemplo do que acontece atualmente com populações de animais e plantas presentes em remanescentes de Mata Atlântica. Em populações nas quais altos níveis de estruturação são detectados as medidas de manejo e conservação serão distintas daquelas nas quais a ausência de estruturação ou níveis baixos e intermediários estão presentes (Solé-Cava & Cunha 2012).

Neste contexto, ao se considerar os níveis de estruturação genética revelados, no presente trabalho, por marcadores microssatélites e mitocondriais para *E. iopoecila*, medidas de manejo e conservação distintas envolvendo as populações desta espécie devem ser empregadas, especialmente quando a população de Rebio (RJ) é considerada. Embora níveis altos de estruturação genética tenham sido revelados pelos marcadores microssatélites para todos os comparativos envolvendo a população de *E. iopoecila* amostrada na Rebio (RJ), quando marcadores mitocondriais são considerados, o grau de estruturação é acentuadamente maior, indicando níveis muito altos de diferenciação genética para todos os comparativos considerados.

Até o momento, a maior parte dos estudos de genética de populações envolvendo diferentes espécies de Euglossini revelou ou ausência de diferenciação genética para as populações das espécies estudadas (Rocha Filho 2011; Souza *et al.* 2010; Cerântola *et al.* 2011) ou níveis de diferenciação variando, frequentemente, de baixo até moderado (Suzuki *et al.* 2010; Zimmermann *et al.* 2011; Freiria *et al.* 2012). Níveis mais elevados de estruturação genética foram observados apenas em alguns casos por Suzuki *et al.*(2010), Zimmermann *et al.*(2011) e Freiria *et al.*(2012). A maior parte destes estudos baseou suas análises em marcadores microssatélites (Rocha Filho 2011; Souza *et al.* 2010; Cerântola *et al.* 2011; Zimmermann *et al.* 2011; Freiria *et al.* 2012), embora Cerântola *et al.* (2011) tenham também empregado marcadores isoenzimáticos em suas análises. Além disto, em vários destes estudos o estimador F_{ST} (e seus análogos) foi empregado nas análises de diferenciação genética, enquanto o estimador D_{est} de Jost (2008) foi utilizado apenas em um dos casos (Freiria *et al.* 2012).

Ao se comparar os resultados de diferenciação genética encontrados para *E. iopoecila*, obtidos por meio das análises de microssatélites, com os relatados nestes trabalhos, verifica-se que os níveis estimados de estruturação genética são comparáveis aos encontrados por Freiria *et al.* (2012) para *Eufriesea violacea*, com relação aos estimadores D_{est} e Φ_{ST} (análogo de F_{ST}) são utilizados nas análises. Contudo, como destacado, as análises do DNAm (Cyt *b*) mostraram que as populações de *E. iopoecila* são mais fortemente estruturadas do que indicado pelos marcadores microssatélites. Tal diferença entre os dois tipos de marcadores parece estar, pelo menos em parte, relacionada à origem materna do DNA mitocondrial, o qual pode estar relacionado ao comportamento filopátrico das fêmeas (Dodson *et al.* 1969). Contudo, as próprias características intrínsecas do DNAm, como: DNA de caráter mais conservado (quando comparado às regiões de microssatélites do genoma nuclear), com menores taxas de mutação, constituído em quase sua totalidade por genes em animais (Arias *et al.* 2006; Frankham *et al.* 2008); ausência de recombinação no DNAm e, menor taxa de mutação por loco do DNAm ($\mu = 6 \times 10^{-8}$) quando comparado aos marcadores microssatélites ($\mu = 5 \times 10^{-4}$) (Goldstein & Schotterer 2000; Haag-Liautard *et al.* 2008), podem estar relacionadas às diferenças encontradas no nível de diferenciação detectado pelos dois tipos de marcadores empregados. Em razão de tais diferenças entre ambos os marcadores, os microssatélites são mais informativos para processos microevolucionários recentes ou em curso, enquanto os marcadores mitocondriais são mais adequados para processos microevolutivos históricos (Wang 2010).

Assim, o menor nível de estruturação genética encontrada com os marcadores microssatélites pode estar associado a um passado evolutivo recente, como por exemplo, a um cenário onde Mata Atlântica não se encontrava ainda em um estado tão fragmentado como o atual, apresentando, assim, uma maior continuidade entre as áreas de Floresta Ombrófila Densa (FOD). Situação esta encontrada antes do intenso processo de desmatamento, ocasionado pelo homem, que se abateu sobre a Mata Atlântica (Morellato & Haddad 2000). Nesta condição, seria esperado um maior grau de fluxo gênico entre as populações dos diferentes remanescentes estudados. Em outro cenário, entre 21.000 e 12.000 anos antes do presente, estudos indicam que durante o Quaternário, estabeleceu-se uma vegetação de mosaico floresta-savana, com este último tipo de formação vegetal atingindo regiões na costa leste do Brasil, que em tempos mais recentes foi

substituída por vegetação de FOD. Exatamente entre os estados de São Paulo e Rio de Janeiro, áreas de savana se estenderam até o litoral (Oliveira *et al.* 2005), enquanto domínios de FOD encontravam-se presentes no litoral brasileiro, abrangendo áreas litorâneas de Santa Catarina, Paraná e São Paulo. Tais áreas constituem na atualidade áreas de endemismo para diferentes grupos de animais (DaSilva & Pinto-Rocha 2011).

A literatura atual propõe que a transição entre Pleistoceno e Holoceno foi marcada por uma instabilidade climática e vegetacional, evidenciando um ambiente aberto entre a divisa dos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (Oliveira *et al.* 2005). Segundo a teoria de refúgios florestais, devido à instabilidade climática durante o pleistoceno terminal, as florestas tropicais ficaram retraídas às exíguas áreas de permanência da umidade, a constituir os refúgios e a sofrer, portanto, diferenciação resultante deste isolamento (Viadana & Cavalcanti 2007). Embora ainda falte suporte empírico à teoria dos refúgios do Pleistoceno (Moritz *et al.* 2000), esta tem encontrado forte aceitação por diferentes autores (Ab Sáber 1992; Viadana & Cavalcanti 2007). No presente estudo, não há dúvidas de que a teoria de refúgios florestais (associada às áreas de ambiente aberto, com vegetação de savana e caatinga), parece explicar de forma adequada a grande diferenciação genética encontrada para o marcador mitocondrial, principalmente entre a população do Rio de Janeiro e as demais populações. Tal argumentação se apoia no fato de que a população de *E. iopoecila* coletada no RJ (Rebio União) compartilha haplótipos somente com a população desta espécie amostrada em Ubatuba; mesmo assim, apenas três haplótipos, os quais estão presentes em uma frequência menor na população de *E. iopoecila* de Ubatuba. De modo diverso, o haplótipo Hap_1, que foi o mais frequente nas populações dos estados de São Paulo e Paraná, não ocorreu na população do Rio de Janeiro. Interessantemente, Faria Jr & Melo (2007) relatam que quando se analisa a variação na coloração do tegumento de populações desta espécie, que mostra uma coloração de azul-violeta mais ao sul (SC e PR) até verde nas populações de latitudes menores (estados do ES e BA), padrões intermediários de cor são encontrados em indivíduos amostrados em Ubatuba (SP) e norte do Rio de Janeiro. Exatamente as duas regiões que mostraram haplótipos compartilhados. A rede de haplótipos ilustra como está estruturada as populações, mostrando a diferenciação, entre os haplótipos encontrados na população RJ

poucos são compartilhados com UB e o Haplótipo mais frequente nas demais populações analisadas não ocorre na população RJ

As diferenças reveladas pela análise do segmento de 651 pb do *Cyt b*, para as cinco populações de *E. iopoecila* amostradas ao longo de uma faixa de 700 km no litoral dos três estados brasileiros, indicam que esta região do DNAm_t se mostrou muito informativa para possíveis inferências biogeográficas e evolutivas envolvendo esta espécie de Euglossini. Dick *et al.* (2004), em uma abordagem filogeográfica com várias espécies de Euglossini, ao analisar uma sequência de 550 pb de um segmento da região CO1 do DNAm_t, encontraram baixíssima divergência genética entre espécies distribuídas em uma ampla faixa geográfica. Estes autores atribuíram estes resultados a uma possível origem recente dos Euglossini e uma alta capacidade de dispersão destas abelhas. Além disto, Dick *et al.* (2004) argumentam que seus resultados fornecem outra linha de evidência contra os refúgios do Pleistoceno, para a região Amazônica, e sugerem que estudos de genética de populações com Euglossini são importantes para auxiliar na compreensão do papel da geografia na gênese da especiação e estrutura populacional deste grupo de abelhas. Neste contexto, os resultados aqui obtidos com a análise mitocondrial de populações de *E. iopoecila* certamente contribuem para um maior entendimento da estrutura populacional de uma espécie de Euglossini, que é endêmica à Mata Atlântica. Além disto, por ser esta uma espécie que apresenta variação morfológica (coloração do tegumento) ao longo de sua área de ocorrência, sendo foco de intenso debate taxonômico (Faria Jr & Melo 2007; Nemésio 2009), os resultados revelados pela análise do DNAm_t de *E. iopoecila* sugerem que a variação morfológica pode não ser resultante apenas de influências abióticas (ex. variação latitudinal), mas sim de um possível isolamento geográfico ocorrido em tempos pretéritos. Neste caso, se de fato, as populações do RJ e estados mais ao norte (ex. ES, BA e AL), que apresentam o tegumento de cor verde, estiveram no passado isoladas das populações de *E. iopoecila* distribuídas mais ao sul da Mata Atlântica, da costa leste brasileira, tal diferença morfológica poderia ser decorrente deste isolamento.

Em relação aos marcadores microssatélites, embora as estimativas de estruturação genética revelada pelos estimadores D_{est} e Φ_{ST} tenham sido inferiores à revelada pela análise mitocondrial, todos os pares de populações analisados mostraram valores significativos de diferenciação genética, a qual variou de baixa a alta (Wright 1951). Tais resultados poderiam ser interpretados como uma restrição

variável no fluxo gênico entre as populações das diferentes áreas. Esta menor diferenciação genética indicada pelos marcadores microssatélites quando comparada aos mitocondriais pode ser atribuída à alta capacidade de voo de abelhas Euglossini (Janzen 1971; Dressler 1982; Raw 1989) e ao comportamento dos machos de se dispersarem mais do que as fêmeas, as quais têm comportamento mais filopátrico (Dodson *et al.* 1969).

Além disto, ao se considerar que o nível de diferenciação genética mostrou-se positivamente correlacionado com o aumento da distância geográfica entre as áreas estudadas, não se pode descartar que algum fluxo gênico, mantido provavelmente pela dispersão de machos ao longo dos remanescentes estudados possa estar ocorrendo. Vários dos remanescentes estudados estão dentro do corredor de Mata Atlântica da Serra do Mar, havendo possibilidade de fluxo gênico entre todas as populações através de *stepping stones*, este modelo assume que a dispersão ocorre preferencialmente entre populações vizinhas, sendo considerada rara entre populações mais distantes, o que produz uma correlação de frequências gênicas que diminui à medida que o número de passos entre as populações aumentam (Kimura & Weiss 1964). Os dados de estruturação genética e a correlação com a distância geográfica pode demonstrar que há padrão gerado por isolamento por distância entre as populações (Wright 1943).

Embora não se tenha informação sobre a capacidade de dispersão de machos de *E. iopoecila*, Raw (1989), estudando a dispersão de machos de *E. cordata*, uma espécie de tamanho corpóreo similar ou até inferior ao de *E. iopoecila*, registrou que machos de *E. cordata* se deslocaram entre remanescentes florestais separados por distâncias de 4 km. Para espécies de tamanho maior, como no caso de abelhas do gênero *Eufriesea*, deslocamentos de mais de 20 km para fêmeas são conhecidos na literatura (Janzen 1971). Dick *et al.* (2004) atribuíram também seus resultados à elevada capacidade de voo das abelhas das orquídeas.

Interessantemente, as diversas análises empregadas envolvendo as populações de *E. iopoecila* de Ilhabela (IB) e São Sebastião (SS) revelaram ou ausência (DNAmt) ou uma baixa diferenciação genética entre tais populações. Neste caso, parece que a distância de 2 km entre a ilha e o continente não está constituindo uma barreira ao fluxo gênico entre as populações destes dois locais. Na literatura existem alguns registros que indicam que algumas espécies de Euglossini são capazes de transpor corpos d'água (Dressler 1982; Murren 2002; Wikelski *et al.*

2010). Os resultados das análises bayesianas, apesar de não mostrar uma divisão nítida entre os grupos de abelhas das cinco áreas estudadas demonstrou que não há uma diferenciação entre a população de Ilhabela e São Sebastião, corroborando as demais análises de diferenciação genética, obtida pelos estimadores D_{est} e Φ_{ST} . De qualquer modo, ao se considerar que Rocha Filho (2011), ao comparar as comunidades de Euglossini de uma área no continente e uma ilha, localizada a 600 metros de distância deste, observou que enquanto *E. iopoecila* foi uma das espécies mais abundantes em número de indivíduos no continente, esta não foi coletada na ilha, maiores estudos sobre a estrutura genética desta espécie em ambientes insulares e continentais devem ser realizados na busca de maiores informações sobre *E. iopoecila*.

De modo diverso, os resultados revelados pela análise bayesiana não identificaram padrões nítidos de estruturação ou diferenciação entre grupos. De modo similar, Davis *et al.* (2010), em um trabalho realizado com a espécie de abelha *Colletes floralis*, encontraram um altos valores de estruturação genética com estimadores F_{ST} e ainda maior com o estimador D_{est} , mas um menor grau de diferenciação quando utilizaram as análises bayesianas.

Os valores de D_{est} (Jost 2008) observados nas análises comparativas entre os diferentes pares de populações de *E. iopoecila* demonstram uma tendência a valores maiores do que os de Φ_{ST} . Alguns autores (Hedrick 2005; Jost 2008) têm argumentado que marcadores altamente polimórficos e com alta taxa de mutação, a exemplo dos microssatélites, quando são analisados com base em estimadores de diferenciação obtidos a partir dos modelos matemáticos propostos por Wright (1951) e Nei (1978), podem resultar em uma análise enviesada para baixo nos níveis de diferenciação genética, ou seja, podem produzir estimativas errôneas e subestimadas de diferenciação. De acordo com alguns autores a estimativa de D_{est} (Jost 2008) foi desenvolvida visando corrigir alguns problemas existentes nas estimativas de F_{ST} e seus análogos (Jost 2008; Heller & Siegismund 2009). Estes autores argumentam que o estimador D_{est} pode contornar o problema da não detecção de diferenciação genética e fornecer níveis de diferenciação mais compatíveis com a realidade.

De um modo geral, embora níveis elevados de estruturação genética tenham sido observados para diferentes pares de população, as medidas de diversidade genética reveladas pelos diferentes marcadores e estimadores não

indicam que as cinco populações estudadas estejam sob risco de extinção devido à baixa diversidade genética destas. Pelo contrário, as medidas de diversidade genética revelada pelos marcadores de microssatélites foram similares nas cinco populações analisadas, se mostrando também similares às descritas em outros estudos com Euglossini (Souza *et al.* 2010; Cerântola *et al.* 2011; Rocha Filho 2011; Zimmermann *et al.* 2011; Freiria *et al.* 2012).

Dos quatro pares de *primers* heterólogos de microssatélites utilizados no presente estudo, os que apresentaram maior número de alelos foram os *primers* descritos para *E. annectans* (Paxton *et al.* 2009), uma espécie filogeneticamente mais relacionada à *E. iopoecilado* que *Euglossa cordata*, uma vez que esta pertence ao subgênero *Euglossa*, enquanto *E. annectanse E. iopoecila* pertencem aos subgênero *Glossura* (Cameron 2004). Quanto mais relacionados filogeneticamente estão os organismos maior o sucesso esperado na transferabilidade de *primers* e no polimorfismo revelado por estes (Oliveira *et al.* 2006; Barbará *et al.* 2007). Os seis *primers* específicos para *E. iopoecila* apresentaram um número médio maior de alelos, a construção de *primers* espécie específico pode ser mais informativa e confiável (Francisco *et al.* 2011).

De um modo geral, os resultados obtidos no presente trabalho trazem uma nova perspectiva para o estudo genético de populações de Euglossini com vistas à conservação destas abelhas, uma vez que pela primeira vez um estudo mostra níveis tão expressivos de estruturação genética em populações de uma espécie deste grupo de abelhas. Nossos resultados sugerem que uma maior atenção seja dada à análise de marcadores mitocondriais para se ter uma ideia mais precisa de como as populações destas abelhas estão de fato estruturadas. Embora os marcadores microssatélites não possam ser desconsiderados de análises futuras, a inclusão de marcadores mitocondriais obtidos a partir de regiões potencialmente mais variáveis devem ser consideradas. Por serem as fêmeas destas abelhas, assim como de outros grupos, filopátricas, o DNAmt pode responder melhor à algumas questões relacionadas à conservação manejo de populações de Euglossini em ambientes sob pressão antrópica, a exemplo do que acontece com a Mata Atlântica.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES/Procad e Fundação Grupo o Boticário (FGBPN) pelo apoio financeiro. A CAPES pela bolsa de R.E.S. Penha. Ao IBAMA/Sisbio e IAP e pelas autorizações para coletas de abelhas e também ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo por ceder a licença para as coletas e ao pessoal dos Parques Estaduais de São Sebastião, Ilhabela, Ilha do Cardoso, Ubatuba (Picinguaba) pela infraestrutura cedida e pela ajuda nas coletas.

3.5 REFERÊNCIAS

- Ab Sáber AN (1992) A teoria dos refúgios: Origem e significado. *Revista do Instituto Florestal*.
- Aguiar WM, Gaglianone MC (2008) Comunidade de Abelhas Euglossina (Hymenoptera : Apidae) em Remanescentes de Mata Estacional Semidecidual sobre Tabuleiro no Estado do Rio de Janeiro. *Neotropical Entomology*, **32**, 118–125.
- Almeida FS, Fungaro MHP, Sodr e LMK (2001) RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi River , Brazil. *Journal of Zoology*, **253**, 113 – 120.
- Arias MC, Brito RM, Francisco FO *et al.* (2006) Review article Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. *Apidologie*, **37**, 259–274.
- Arias MC, Francisco FO, Silvestre D (2003) O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. In: *Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure* (eds Melo GAR, Alves-dos-Santos I), pp. 305–309. UNESCO, Crici ma.
- Arias MC, Infante-Malachias ME (2012) RFLP: O emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismos no DNA. In: *Biologia Molecular e Evolu o* (eds Mاتيoli SR, Fernandes FMC), pp. 171 – 180. Ribeir o Preto.
- Arias MC, Silvestre D, Francisco FO, Weinlich R, Sheppard WS (2008) An oligonucleotide primer set for PCR amplification of the complete honey bee mitochondrial genome. *Apidologie*, **39**, 475–480.
- Avise JC (2004) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Sunderland.
- Bandelt H-J, Forster P, R ohl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37–48.
- Avise JC (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, **36**, 3–15.

- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, **16**, 37–48.
- Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM *et al.* (2007) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*, **16**, 3759–67.
- Billotte N, Lagoda P, Risterucci AM, *et al.* (1999) Microsatellite-enriched libraries : applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, **54**, 277–288.
- Boff SV (2012) Detecção de machos diploides, estrutura genética populacional e organização social em abelhas do gênero Euglossa (Apidae: Euglossini). Tese (doutorado) Universidade de São Paulo.
- Brito RM, Francisco FO, Domingues-Yamada a. MT *et al.* (2009) Characterization of microsatellite loci of *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera , Apidae , Meliponini). *Conservation Genetics Resources*, **1**, 183–187.
- Brosi BJ (2009) The effects of forest fragmentation on euglossine bee communities (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Biological Conservation*, **142**, 414–423.
- Calcagnotto D (2012) Taxas de evolução e relógios moleculares. In: *Biologia Molecular e Evolução* (eds Matioli SR, Fernandes FMC), pp. 61 – 74. Ribeirão Preto.
- Cameron SA (2004) Phylogeny and biology of Neotropical orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Entomology*, **49**, 377–404.
- Cerântola NDCM, Oi CA, Cervini M, Del Lama MA (2011) Genetic differentiation of urban populations of *Euglossa cordata* from the state of São Paulo, Brazil. *Apidologie*, **42**, 214–222.
- Crawford N. (2010) SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 556 – 557.
- DaSilva MB, Pinto-da-Rocha R (2011) História Biogeográfica da Mata Atlântica: Opiliões (Arachnida) como Modelo para sua Inferência. In: *Biogeografia da America do Sul Padrões & Processos* (eds Carvalho CJB, Almeida EAB), pp. 221–238. São Paulo.
- Davis ES, Murray TE, Fitzpatrick U, Brown MJF, Paxton RJ (2010) Landscape effects on extremely fragmented populations of a rare solitary bee, *Colletes floralis*. *Molecular Ecology*, **19**, 4922–35.
- Dick CW, Roubik DW, Gruber KF, Bermingham E (2004) Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. *Molecular Ecology*, **13**, 3775–85.
- Dodson CH, Dressler RL, Hills HG, Adams RM, Williams NH (1969) Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science*, **164**, 1243–9.
- Dressler RL (1982) Biology of the orchid bees (Euglossini), **13**, 373–394.

Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, **4**, 359 – 361.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611 – 2621.

Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 564–7.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: *Application*, **491**, 479–491.

Faria Jr LRR, Melo GAR (2007) Species of *Euglossa* (Glossura) in the Brazilian Atlantic forest, with taxonomic notes on *Euglossa stellfeldi* Moure (Hymenoptera, Apidae, Euglossina). , **51**, 275–284.

Francisco FO (2012) *Estrutura e diversidade genética de populações insulares e continentais de abelhas da Mata Atlântica*. Universidade de São Paulo.

Francisco FO, Brito RM, Santiago LR *etal.*(2011) Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in the stingless bee *Plebeia remota* (Apidae: Meliponini). *Conservation Genetics Resources*, **3**, 417–419.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2008) *Genética da Conservação*. Editora SBG, Ribeirão Preto

Freiria GA, Ruim JB, Souza RF, Sofia SH (2012) Population structure and genetic diversity of the orchid bee *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) from Atlantic Forest remnants in southern and southeastern Brazil. *Apidologie*, **43**, 392–402.

Giangarelli DC, Freiria G a, Collatreli OP, Suzuki KM, Sofia SH (2009) *Eufriesea violacea* (Blanchard) (Hymenoptera: Apidae): an orchid bee apparently sensitive to size reduction in forest patches. *Neotropical Entomology*, **38**, 610–5.

Giangarelli DC, Sofia SH (2011) First record of a gynandromorph orchid bee, *Euglossa iopoecila* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Annals of the Entomological Society of America*, **104**, 229–232.

Goldstein DB, Schlötterer C (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, New York.

Haag-Liautard C, Coffey N, Houle D *et al.* (2008) Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology*, **6**, e204.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95 – 98.

- Hedrick PW (2005) A standardized genetic differentiation measure. *Evolution International Journal of Organic Evolution*, **59**, 1633–8.
- Heller R, Siegismund HR (2009) Relationship between three measures of genetic differentiation $G_{(ST)}$, $D(EST)$ and $G'_{(ST)}$: how wrong have we been? *Molecular Ecology*, **18**, 2080–3; discussion 2088–91.
- Janzen DH (1971) Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants, *Science*, **171**, 203–205.
- Jost L (2008) G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, **17**, 4015–4026.
- Kimura M, Crow JF (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, **49**, 725–738.
- Kimura M, Weiss GH (1964) The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, **49**, 561–576.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451–2.
- Meirmans PG (2006) Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, **60**, 2399–2402.
- Morellato LPC, Haddad CFB (2000). Introduction: The Brazilian Atlantic Forest, *Biotropica*, **32**, 786–792.
- Moritz C, Patton JL, Schneider CJ, Smith TB (2000) Diversification of Rainforest Faunas: An Integrated Molecular Approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **31**, 533–563.
- Murren CJ (2002) Effects of habitat fragmentation on pollination: pollinators, pollinia viability and reproductive success. *Journal of Ecology*, **90**, 100–107.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583–590.
- Nei M (1987) Genetics Distance and Molecular Phylogeny. *Population Genetics and Fishery Management*. Columbia University Press, New York.
- Nemésio A (2009) Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of the Brazilian Atlantic Forest. *Zootaxa*, **2041**, 1–242.
- Nemésio A (2010) *Eulaema* (*Apeulaema*) *felipei* sp. n. (Hymenoptera: Apidae: Euglossina): a new forest-dependent orchid bee found at the brink of extinction in northeastern Brazil. *Zootaxa*, **62**, 51–62.
- Nemésio A (2012) The western limits of the “Hileia Baiana” for orchid bees, including seven new records for the state of Minas Gerais, eastern Brazil. *Spixiana*, **35**, 109–116.

- Nemésio A, Silveira FA (2007) Diversity and distribution of orchid bees (Hymenoptera: Apidae) with a revised checklist of species. *Neotropical Entomology*, **36**, 874–888.
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI *et al.* (2006) Origin , evolution and genome distribution of microsatellites, *Genetics and Molecular Biology*, **307**, 294–307.
- Oliveira PE, Behling H, Ledru M-P, Barberi M, Bush M (2005) Paleovegetação e Paleoclimas do Quaternário do Brasil. In: *Quaternário do Brasil* (eds Souza CRG, Suguio K, Santos AM, Oliveira PE), pp. 52 –74. Ribeirão Preto.
- Paxton RJ, Zobel MU, Steiner J, Zillikens A (2009) Microsatellite loci for *Euglossa annectans* (Hymenoptera: Apidae) and their variability in other orchid bees. *Molecular Ecology Resources*, **9**, 1221–3.
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics*, **28**, 2537–9.
- Polzin T, Daneshmand SV (2003) On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters*, **31**, 12–20.
- Raw A (1989) The dispersal of euglossine bees between isolated patches of eastern Brazilian wet forest. *Revista Brasileira de Entomologia*, **33**, 103 – 107.
- Rocha Filho LC (2011) *Estrutura genética e ecologia de comunidades das abelhas Euglossini (Hymenoptera; Apidae) do Parque Estadual da Serra do Mar e Parque Estadual da Ilha Anchieta*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Roubik DW, Hanson P. (2004) *Abejas de orquídeas de la América tropical. Biología y guía de campo (Orchid bees of Tropical América) Biology and field guide*. INBio Press, Costa Rica.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (eds Krawetz S, Misener S), pp. 361 – 386. Totowa, NJ.
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments A poor man ' s approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics . *Nature Biotechnology*, **18**, 232 – 234.
- Simons C, Frati F, Beckenbach A *et al.* (1994) Evolution , Weighting , and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Entomological Society of America*, **87**, 652 – 701.
- Sofia SH, Suzuki KM (2004) Comunidades de machos de abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em fragmentos florestais no sul do Brasil. *Neotropical Entomology*, **33**, 693–702.
- Solé-Cava AM, Cunha HA (2012) A Genética e a Conservação da Natureza. In: *Biologia Molecular e Evolução* (eds Matioli SR, Fernandes FMC), pp. 217 – 238. Ribeirão Preto.

Souza RO, Cervini M, Del Lama M a., Paxton RJ (2007) Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology Notes*, **7**, 1352–1356.

Souza RO, Del Lama M a, Cervini M *et al.*(2010) Conservation genetics of neotropical pollinators revisited: microsatellite analysis suggests that diploid males are rare in orchid bees. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, **64**, 3318–26.

Suzuki KM, Arias MC, Giangarelli DC, Freiria G a, Sofia SH (2010) Mitochondrial DNA diversity of orchid bee *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera: Apidae) populations assessed by PCR-RFLP. *Biochemical Genetics*, **48**, 326–41.

Suzuki KM, Vilas-Boas LA, Sofia SH (2011) DNA barcoding of *Euglossa iopoecila* and *Euglossa roubiki* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) and the problem of *Euglossa* coloration in taxonomic analysis. In: *Resumos do 57o Congresso Brasileiro de Genética*, p. 165. Ribeirão Preto.

Vallone PM, Butler JM (2004) AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *BioTechniques*, **37**, 226–31.

Viadana AG, Cavalcanti APB (2007) A Teoria dos Refúgios Florestais aplicada ao estado de São Paulo. *Revista da Casa da Geografia de Sobral*, **8/9**, 61–80.

Wang IJ (2010) Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography. *Molecular Ecology*, **19**, 2605–8.

Wikelski M, Moxley J, Eaton-Mordas A *et al.* (2010) Large-range movements of neotropical orchid bees observed via radio telemetry. *PloS one*, **5**, 1 – 6.

Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics*, **28**, 114 – 138.

Wright S (1951) The genetical structure of population. *Annals of Eugenics*, **15**, 323 – 324.

Zimmermann Y, Schorkopf DLP, Moritz RF a. *et al.* (2011) Population genetic structure of orchid bees (Euglossini) in anthropogenically altered landscapes. *Conservation Genetics*, **12**, 1183–1194.

4 CONCLUSÕES

- A estruturação genética revelada pelo marcador mitocondrial deve estar relacionada ao comportamento filopátrico das fêmeas e processos evolutivos e eventos climáticos/geológicos (provavelmente do Quaternário) mais antigos;
- Os menores índices de diferenciação genética revelados pelos marcadores microsatélites parecem estar refletindo também o fluxo gênico via dispersão dos machos de *E. iopoecila*;

4. Os resultados obtidos indicam a importância de utilizar em estudos de Euglossini relacionados à conservação e caracterização genética de populações destas abelhas, de forma combinada, marcadores nucleares e mitocondriais.

REFERÊNCIAS

- AB SÁBER, A.N. A teoria dos refúgios: Origem e significado. **Revista do Instituto Florestal**, v. Edição Esp, 1992.
- ACKERMAN, J.D. Euglossine bee pollination of the orchid, *Cochleanthes lipscombiae*: a food source mimic. **American Journal of Botany**, v. 70, p. 830-834. 1983.
- AGUIAR, W.M.; GAGLIANONE, M.C. Comunidade de Abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em Remanescentes de Mata Estacional Semidecidual sobre Tabuleiro no Estado do Rio de Janeiro. **Neotropical entomology**, v. 32, n. 2, p. 118-125, 2008.
- ALMEIDA, F.S.; FUNGARO, M.H.P.; SODRÉ, L.M.K. RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi River , Brazil. **Journal of Zoology**, v. 253, p. 113 - 120, 2001.
- ANJOS-SILVA, E.J.; REBÊLO, J.M.M. A new species of *Exaerete* Hoffmannsegg (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) from Brazil. **Zootaxa**, v. 1105, p. 27–35. 2006.
- ARIAS, M.C.; BRITO, R.M.; FRANCISCO, F.O. et al. Review article Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. **Apidologie**, v. 37, p. 259-274, 2006.
- ARIAS, M.C.; FRANCISCO, F.O.; SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. In: MELO, G.A.R.; ALVES-DOS-SANTOS, I.(Eds.). **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. p.305 -309, 2003.
- ARIAS, M.C.; SILVESTRE, D.; FRANCISCO, F.O.; WEINLICH, R.; SHEPPARD, W.S. An oligonucleotide primer set for PCR amplification of the complete honey bee mitochondrial genome. **Apidologie**, v. 39, p. 475-480, 2008.
- ARIAS, M.C.; INFANTE-MALACHIAS, M.E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismo no DNA. In: MATIOLI, S.R. FERNANDES, F.M.C. (Ed.) **Biologia Molecular e Evolução**. 2^o ed. Editora Holos, Ribeirão Preto, p.171-179. 2012.
- AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. 2^a edição, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 2004.
- AVISE, J.C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, p. 3-15. 2009.
- BANDEL, H.-J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.

BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G.M. et al. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 18, p. 3759-67, 2007.

BEYE, M.; HASSELMANN, M.; FONDRK, M.K.; PAGE, R.E.; OMHOLT, S.W. The *enecsd* locus is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. **Cell**, v. 114, p. 419-429, 2003.

BIESMEIJER, J.C.; ROBERTS, S.P.M.; REEMER, M.; OHLEMÜLLER, R.; EDWARDS, M.; PEETERS, T.; SCHAFFERS, A.P.; POTTS, S.G.; KLEUKERS, R.; THOMAS, C.D.; SETTELE, J.; KUNIN, W.E. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science**, v. 313, n. 5785, p. 351-4, 2006.

BILLOTTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.-M.; BAURENS, F.-C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, v. 54, n. 4, p. 277-288, 1999.

BOFF, S.V. **Detecção de machos diploides, estrutura genética populacional e organização social em abelhas do gênero *Euglossa* (Apidae: Euglossini)**, Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, 106 pp. 2012.

BRITO, R.M.; FRANCISCO, F.O.; DOMINGUES-YAMADA, A.M.T. et al. Characterization of microsatellite loci of *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Conservation Genetics Resources**, v. 1, p. 183-187, 2009.

BROSI, B.J. The effects of forest fragmentation on Euglossini bee communities (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Conservation Biology**, v. 142, p. 414-423. 2009.

CALCAGNOTTO, D. Taxas de evolução e relógios moleculares. In: MATIOLI, S.R. FERNANDES, F.M.C. (Ed.) **Biologia Molecular e Evolução**. 2ª ed. Editora Holos, Ribeirão Preto, p. 61-74. 2012.

CAMERON, S.A. Phylogeny and biology of neotropical orchid bees (Euglossini). **Annual Review of Entomology**, v. 49, p. 377-404, 2004.

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

CHISTIYAKOV, D.A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F.A.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, n. 1-4, p. 1-29, 2006.

COOK, J. M.; CROZIER, R. H. Sex determination and population biology in the Hymenoptera. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 10, n. 7, p. 281-6, 1995.

CRAWFORD, N.G. SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 556-557. 2010.

CRISPO, E.; CHAPMAN, L.J. Temporal variation in population genetic structure of a riverine African cichlid fish. **The Journal of Heredity**, v. 101, n. 1, p. 97-106, 2010.

- DASILVA, M.B.; PINTO-DA-ROCHA, R. História Biogeográfica da Mata Atlântica: Opiliões (Arachnida) como Modelo para sua Inferência. In: CARVALHO, C.J.B.; ALMEIDA, E.A.B. (Eds.). **Biogeografia da América do Sul Padrões & Processos**. p.221-238, 2011. São Paulo.
- DAVIS, E.S.; MURRAY, T.E.; FITZPATRICK, U.; BROWN, M.J.F.; PAXTON, R.J. Landscape effects on extremely fragmented populations of a rare solitary bee, *Colletes floralis*. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 22, p. 4922-35, 2010.
- DICK, C.W.; ROUBIK, D.W.; GRUBER, K.F.; BERMINGHAM, E. Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 12, p. 3775-85, 2004.
- DODSON, C. H.; DRESSLER, R. L.; HILLS, H. G.; ADAMS, R. M.; WILLIAMS, N. H. BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS IN ORCHID FRAGRANCES. **SCIENCE (NEW YORK, N.Y.)**, V. 164, N. 3885, P. 1243-9, 1969.
- DRESSLER, R. Pollination by Euglossine bee. **Evolution**.v. 22, p. 202-210. 1968.
- DRESSLER, R.L. Biology of orchid bees (Euglossini). **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 13, p. 373-394. 1982.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359 - 361, 2012.
- ELTZ, T.; ZIMMERMANN, Y.; HAFTMANN, J.; TWELE, R.; FRANCKE, W.; QUEZADA-EUAN, J J. G.; LUNAU, K. Enfleurage, lipid recycling and the origin of perfume collection in orchid bees. **Proceedings B of the Royal Society**, v. 274, n. 1627, p. 2843-8, 2007.
- EXCOFFIER L.; SMOUSE P.E.; QUATTRO J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data, **Genetics**, v. 131, p. 479-491. 1992.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564-567. 2010.
- FARIA JR., L.R.R.; MELO, G.A.R. Species of *Euglossa* (*Glossura*) in the Brazilian Atlantic forest, with taxonomic notes on *Euglossa stellfeldi* Moure (Hymenoptera, Apidae, Euglossina). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 51, p. 275–284. 2007.
- FARIA, L.R.R., MELO, G.A.R. A new species of *Eufriesea* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossina) from northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 55, p. 35–39, 2011.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA. D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3^a ed. Embrapa, Brasília. 1998.

FRANCISCO, F. O.; BRITO, R. M.; SANTIAGO, L. R. GONÇALVES, P.H.P.; PIOKER, F.C.; DOMINGUES - YAMADA, A.M.T.; ARIAS, M.C. Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in the stingless bee *Plebeia remota* (Apidae: Meliponini). **Conservation Genetics Resources**, v. 3, n. 3, p. 417-419, 2010.

FRANCISCO, F.O. **Estrutura e diversidade genética de populações insulares e continentais de abelhas da Mata Atlântica**. São Paulo, Tese de Doutorado (Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo Departamento de Genética e Biologia Evolutiva) – Doutorado em Ciências Biologia/ Genética. 2012.

FRANKHAM, F.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008.

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

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica no período de 2008-2010**: relatório final. Fundação SOS Mata Atlântica/INPE, São Paulo. 2011

FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores Moleculares. 153-200 pp. In: AZEVEDO, J.L.; BARROS, N.M.; SERAFINI, L.A. (orgs) **Biociência na Agricultura e na Agroindústria**. Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba. 2001.

GALINDO-LEAL, C.; JACOBSEN, T.R.; LANGHAMMER, P.F.; OLIVIERI, S. Estado dos hotspots: a dinâmica da perda de diversidade. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (Eds.). **Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, p.12-23. 2005.

GIANGARELLI, D. C.; SOFIA, S. H. First Record of a Gynandromorph Orchid Bee, *Euglossa iopoecila* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, n. 2, p. 229-232, 2011.

GIANGARELLI, D.C., FREIRIA, G.A., COLATRELI, O.P.; SUZUKI, K.M.; SOFIA, S.H. *Eufriesea violacea* (Blanchard): a euglossine species potentially sensitive to forest patch deterioration in Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 610-615. 2009.

GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites: Evolution and Applications**. 1999.

HAAG-LIAUTARD, C.; COFFEY, N.; HOULE, D.; LYNCH, M.; CHARLESWORTH, B.; KEIGHTLEY, P.D. Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. **PLoS biology**, v. 6, n. 8, p. e204, 2008.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95 - 98, 1999.

- HANCOCK, J.M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C.(Ed.). **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford University Press, Oxford, 1-9 pp. 2000.
- HEDRICK, P. W. A standardized genetic differentiation measure. **Evolution**, v. 59, n. 8, p. 1633-8, 2005.
- HEIMPEL, G.E.; DE BOER, J.G. Sex determination in the hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 209-30, 2008.
- HELLER, R.; SIEGISMUND, H.R. Relationship between three measures of genetic differentiation G_{ST} , D_{EST} and G'_{ST} : how wrong have we been? **Molecular Ecology**, v. 18, n. 10, p. 2080- 2083, 2009.
- HILSDORF, A.W.; PETRERE, JR M. Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. **Ciência Hoje**, v. 30, p. 62–67. 2002.
- JANZEN, D.H. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants, **Science**, v. 171, p. 203-205. 1971.
- JOST, L. G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 18, p. 4015-4026, 2008.
- KARASAWA, M.M.G. **Análise da Estrutura Genética de Populações e Sistema Reprodutivo de *Oryza glumaepatula* por Meio de Microssatélites**. Tese (doutorado) Escola Superior de Agricultura Luiz Carlos de Queiroz/USP, Piracicaba, 92 pp. 2005.
- KIMURA, M.; CROW, J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, v. 49, p. 725-738, 1964.
- KIMURA, M.; WEISS, G. H. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. **Genetics**, v. 49, p. 561-576, 1964.
- LAURANCE, W.F. Conserving the hottest of the hotspots. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1137. 2009.
- LEYS, R.; COOPER, S.J.; SCHWARZ, M.P. Molecular phylogeny of the large carpenter bees, genus *Xylocopa* (Hymenoptera: apidae), based on mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 17, p. 407-18, 2000.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-2, 2009.
- LÓPEZ-URIBE, M.M.; ALMANZA, M.T.; ORDOÑEZ, M. Diploid male frequencies in Colombian populations of euglossine bees. **Biotropica**, v. 39, p. 660-662. 2007.
- LÓPEZ-URIBE, M.M.; GREEN, A.N.; RAMÍREZ, S.R.; BOGDANOWICZ, S.M.; DANFORTH, B.N. Isolation and cross-species characterization of polymorphic microsatellites for the orchid bee *Eulaema meriana* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Conservation Genetics Resources**, v. 3 p. 21–23. 2011.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological Genetics: Design Analysis and Application**. Blackwell Publishing, Malden, 326 pp. 2004.

MATTOZO, V.C.; FARIA, L.R.R.; MELO, G.A.R. Orchid bees in the coastal forests of southern Brazil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 51, 33, p 505-515, 2011.

MEIRMANS, P. G. Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. **Evolution**, v. 60, n. 11, p. 2399-2402, 2006.

MORELLATO, L.P.C.; HADDAD, C.F.B. Introduction: the Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 32, p. 786-792. 2000.

MORITZ, C.; PATTON, J.L.; SCHNEIDER, C.J.; SMITH, T.B. Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 31, p. 533-563, 2000.

MOURE, J.S.; MELO G.A.R.; FARIA JR, L.R.R. Euglossini Latreille, 1802. In: Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version**. Disponível em: <<http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. 2012>. Acesso em: 6 fev. 2013

MURREN, C.J. Effects of habitat fragmentation on pollination: pollinators, pollinia viability and reproductive success. **Journal of Ecology**, v. 90, n. 1, p. 100-107, 2002.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-8, 2000.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.

NEI, M. Genetics Distance and Molecular Phylogeny. **Population Genetics and Fishery Management**, 1987.

NEMÉSIO, A. Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of the Brazilian Atlantic Forest. **Zootaxa**, v. 2041, p. 1-242, 2009.

NEMÉSIO, A. The orchid-bee fauna (Hymenoptera: Apidae) of a forest remnant in northeastern Brazil, with new geographic records and an identification key to the known species of the Atlantic Forest of northeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 2656, p. 55-66, 2010.

NEMÉSIO, A. The western limits of the “Hileia Baiana” for orchid bees, including seven new records for the state of Minas Gerais, eastern Brazil. **Spixiana**, v. 35, n. 1, p. 109-116, 2012.

NEMÉSIO, A. The western limits of the “Hileia Baiana” for orchid bees, including seven new records for the state of Minas Gerais, eastern Brazil. **Spixiana**, v. 35, p. 109-116. 2012.

NEMÉSIO, A.; SANTOS JÚNIOR, J.E.; SANTOS, F.R. *Eufriesea zhangii* sp. n. (Hymenoptera: Apidae: Euglossina), a new orchid bee from Brazil revealed by molecular and morphological characters. **Zootaxa**, v. 3609, p. 568-582, 2013.

NEMÉSIO, A.; SILVEIRA, F.A. Diversity and distribution of orchid bees (Hymenoptera: Apidae) with a revised checklist of species. **Neotropical entomology**, v. 36, n. 6, p. 874-888, 2007.

OLIVEIRA, P.E.; BEHLING, H.; LEDRU, M.-P.; BARBERI, M.; BUSH, M. Paleovegetação e Paleoclimas do Quaternário do Brasil. In: C. R. G. Souza; K. Suguio; A. M. Santos; Paulo Eduardo Oliveira (Eds.), **Quaternário do Brasil**. Ribeirão Preto. p.52 -74, 2005.

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

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

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537-9, 2012.

PEREZ-SWEENEY, B.M.; RODRIGUES, F.P.; MELNICK, D.J., Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. In: CULLEN JR, L.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PADUA, C. **Métodos de Estudo em Biologia da Conservação e Manejo da Vida Silvestre**. Curitiba: Editora da UFPR, cap.13. p. 343-366. 2004.

POLZIN, T.; DANESHMAND, S.V. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. **Operations Research Letters**, v. 31, n. 1, p. 12-20, 2003.

POTTS, S.G.; BIESMEIJER, J.C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W.E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345-53, 2010.

POWELL, A.H.; POWELL G.V.N. Population dynamics of male euglossine bees in Amazonian forest fragments. **Biotropica**, v. 19, p. 176-179. 1987.

RAW, A. The dispersal of euglossine bees between isolated patches of eastern Brazilian wet forest. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 33, p. 103 - 107, 1989.

REBÊLO, J.M.M. **História Natural das Euglossíneas. As abelhas das orquídeas**. São Luis: Lithograf Editora. 2001.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

ROCHA FILHO, L.C. **Estrutura genética e ecologia de comunidades das abelhas Euglossini (Hymenoptera; Apidae) do Parque Estadual da Serra do Mar e Parque Estadual da Ilha Anchieta**, Ubatuba, SP, Brasil. Tese de Doutorado (FFCLRP) –Tese de Doutorado em Entomologia. 2011.

ROUBIK, D.W, HANSON, P.H.**Abejas de orquídeas de la América tropical. Biología y guía de campo (Orchid bees of Tropical América) Biology and field guide**.Heredia, Costa Rica. INBio Press. 370 p. 2004.

ROUBIK, D.W. Sibling species of *Glossura* and *Glossuropoda* in the Amazon region (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Kansas Entomological Society**, v. 77, p. 235–253. 2004.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S.(Eds.); **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Humana Pre ed., p.361 - 386, 2004. Totowa, NJ.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments A poor man ' s approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics **.Nature Biotechnology**, v. 18, p. 232 - 234, 2000.

SIMONS, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A. et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers.**Entomological Society of America**, v. 87, n. 6, p. 652 - 701, 1994.

SODRÉ, L.M.K.; ALMEIDA, F.S.; CHIARI, L. Estudos sobre a variabilidade genética de peixes do rio Tibagi através de marcadores moleculares. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. **Bacia do Rio Tibagi**. Londrina.p. 531-550. 2002.

SOFIA, S.H., SUZUKI, K.M. Comunidades de machos de abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em fragmentos florestais no sul do Brasil.**Neotropical Entomology**, v. 33, p. 693-702. 2004.

SOLÉ-CAVA, A. J.; CUNHA, H.A. A genética e a conservação da Natureza. In: MATIOLI, S.R. FERNANDES, F.M.C. (Ed.).**Biologia Molecular e Evolução**.2^a ed. Editora Holos, Ribeirão Preto, p.217-238. 2012.

SOUZA, R.O.; CERVINI, M.; DEL LAMA, M.A.; PAXTON, R.J. Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera, Apidae). **Molecular EcologyNotes**, v.7, p.1-5. 2007.

SOUZA, R.O.; DEL LAMA, M.A.; CERVINI, M.; MORTARI, N.; ELTZ, T.; ZIMMERMANN, BACH, C.; BROSI, B.J.; SUNI, S.; QUEZADA-EUÁN, J.J.G.; PAXTON, R.J. Conservation genetics of Neotropical pollinators revisited: microsatellite analysis suggests that diploid males are rare in orchid bees. **Evolution**, v. 64, p. 3318-3326. 2010.

SUZUKI, K.M.; ARIAS, M.C.; GIANGARELLI, D.C.; FREIRIA, G.A; SOFIA, S.H. Mitochondrial DNA diversity of orchid bee *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera: Apidae) populations assessed by PCR-RFLP. **Biochemical Genetics**, v. 48, p. 326-41, 2010.

SUZUKI, K.M.; VILAS-BOAS, L.A.; SOFIA, S.H. DNA barcoding of *Euglossa iopoecila* and *Euglossa roubiki* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) and the problem of *Euglossa* coloration in taxonomic analysis. **Resumos do 57º Congresso Brasileiro de Genética**, p. 165. 2011.

UNRUH, T.R.; MESSING, R.H. Intraspecific biodiversity in Hymenoptera: implications for conservation and biological control. In: LASALLE, J. and GAULD, I.D. Eds., **Hymenoptera and Biodiversity**, CAB International, Wallingford, UK. 1993.

VALLONE, P.M.; BUTLER, J.M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. **BioTechniques**, v. 37, n. 2, p. 226-31, 2004.

VIADANA, A.G.; CAVALCANTI, A.P.B. A Teoria dos Refúgios Florestais Aplicada ao estado de São Paulo. **Revista da Casa da Geografia de Sobral**, v. 8/9, n. 1, p. 61-80, 2007.

WANG, I.J. Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 13, p. 2605-8, 2010.

WIKELSKI, M.; MOXLEY, J.; EATON-MORDAS, A. et al. Large-range movements of neotropical orchid bees observed via radio telemetry. **PloS One**, v. 5, n. 5, p. 1 - 6, 2010.

WILLIAMS, N.H., WHITTEN, W.M. Orchid floral fragrances and male euglossine bees: methods and advances in the last sesquidecade. **Biological Bulletin**, v.164, p.355-395. 1983.

WITTMANN, D.; HOFFMANN, M.; SCHOLZ, E. Southern distributional limits of euglossine bees in Brazil linked to habitats of the Atlantic- and Subtropical Rain Forest (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Entomologia Generalis**, v. 14, p. 53-60, 1988.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, n. 114, p. 114 - 138, 1943.

WRIGHT, S. The genetical structure of population. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323 - 324, 1951.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZAYED, A. Bee genetics and conservation. **Apidologie**, v. 40, 3, p. 237-262, 2009.

ZAYED, A.; PACKER, L. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 10742-10746. 2005.

ZAYED, A.; PACKER, L. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 10742-6, 2005.

ZAYED, A.; ROUBIK, D.W.; PACKER, L. Use of diploid male frequency data as an indicator of pollinator decline. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 271, p. 9-12. 2004.

ZIMMERMANN, Y.; SCHORKOPF, D.L.P.; MORITZ, R.F.A.; PEMBERTON, R.W.; QUEZADA-EUAN, J.J.G; ELTZ, T. Population genetic structure of orchid bees (Euglossini) in anthropogenically altered landscapes. **Conservation Genetics**, v. 12, p11-22. 2011.