



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LEANDRO NUNES DE ANDRADE

**ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL E FREQUÊNCIA
DE MACHOS DIPLÓIDES DE *EUGLOSSA PLEOSTICTA* E
EUGLOSSA FIMBRIATA (HYMENOPTERA, APIDAE,
EUGLOSSINI)**

LEANDRO NUNES DE ANDRADE

**ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL E FREQUÊNCIA
DE MACHOS DIPLÓIDES DE *EUGLOSSA PLEOSTICTA* E
EUGLOSSA FIMBRIATA (HYMENOPTERA, APIDAE,
EUGLOSSINI)**

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: Profa. Dra. Silvia Helena Sofia

Londrina
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A553e Andrade, Leandro Nunes de.

Estrutura genética populacional e frequência de machos diplóides de *Euglossa pleosticta* e *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) / Leandro Nunes de Andrade. – Londrina, 2010.
81 f. : 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, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Abelha – Genética – Teses. 2. Himenóptero – Teses. 3. Genética de populações – Teses. 3. Abelha – Mata Atlântica – 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 Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 595.799

LEANDRO NUNES DE ANDRADE

**ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL E FREQUÊNCIA DE
MACHOS DIPLÓIDES DE *EUGLOSSA PLEOSTICTA* E *EUGLOSSA
FIMBRIATA* (HYMENOPTERA, APIDAE, EUGLOSSINI)**

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

Profa. Dra. Silvia Helena Sofia
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Solange Cristina Augusto
UFU – Uberlândia - MG

Profa. Dra. Claudete de Fátima Ruas
UEL – Londrina - PR

Londrina, 26 de fevereiro de 2010.

**À minha Mãe Luzia, meu pai Anselmo
Às minhas irmãs Adriana e Suéllen**

AGRADECIMENTOS

A Deus, Obrigado por Tudo;

À Coordenação Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e ao Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, pelas condições fornecidas para o desenvolvimento deste trabalho;

À minha orientadora Profa. Dra. Silvia Helena Sofia pela orientação, oportunidade em desenvolver este trabalho, compreensão, disponibilidade, carinho, amizade e confiança;

À Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Klabin S.A. e CAPES pelo apoio financeiro;

Aos professores Dr. Rogério Fernandes de Souza e Dr. Laurival A. Villas-Boas pelo apoio e 'dicas' importantes durante o desenvolvimento deste trabalho e pelas valiosas sugestões no meu Exame de Qualificação;

Às professoras Dra. Leda Maria Sodré e Dra. Fernanda Simões de Almeida pelos ensinamentos, disponibilidade em sanar as minhas d vidas, carinho e amizade;

À profa. Dra. Claudete de Fátima Ruas e profa. Dra. Solange Cristina Augusto, membros da banca examinadora, pela disponibilidade em participar da avalia o deste trabalho;

Ao prof. Dr. Paulo Maurício Ruas pelas valiosas sugestões;

  Sueli Miranda, Secretária do Programa de Pós-Gradua o em Genética e Biologia Molecular, pela pronta disposi o em ajudar sempre que solicitada.

Aos técnicos Dário e Melyssa pela ajuda permanente durante estes dois anos e ao secretário do Departamento de Biologia Geral, Eduardo Cambuí, e demais funcionários deste Departamento pelo apoio prestado, em especial a Dona Edna;

Aos meus amigos do LAGEA: Yuldi, Natália, Rafa, Vanessa, Carla, Dalita, Cacondi, Bruna e Carol; em especial, a todos os abelhudos - Karen, Douglas, Gabi, Alessandra, Francielly, Stéphaney, Bruno Ferrari, Henrique, Juliana Bombarda e Géssica - por todo o auxílio prestado;

À Gabriele pela amizade e por tornar o meu trabalho mais divertido durante meus momentos de estresse e me auxiliar nos momentos de dificuldade.

Ao William por todos os momentos que se dispôs a me ajudar, pelo convívio e amizade;

À Karina e a Priscila por todos os finais de semana que nos divertimos muito;

À Universidade Estadual de Londrina pelo suporte ao longo de todo este trabalho e a todo o pessoal do Setor de Transporte da UEL pelo inestimável apoio nas coletas.

Aos meus amigos do mestrado;

Aos meus queridos pais Anselmo e Luzia por tudo que me fizeram desde o primeiro dia que vim ao mundo;

Às minhas irmãs Suéllen e Adriana. Aos meus cunhados Reginaldo e Fábio. A minha sobrinha Yasmin. A minha sobrinha e afillhada Íris pelos momentos familiares.

ANDRADE, Lendro Nunes de. **Estrutura genética populacional e frequência de machos diplóides de *Euglossa pleosticta* e *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini)**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

A estrutura genética e a frequência de machos diplóides de populações de duas espécies de abelhas das orquídeas, *Euglossa pleosticta* e *Euglossa fimbriata*, foram estudadas com base em marcadores microssatélites. Estas duas espécies apresentam uma ampla distribuição em território brasileiro e são comumente encontradas em remanescentes florestais de Mata Atlântica do nordeste ao sul do Brasil. As análises genéticas envolveram machos de populações de *E. pleosticta* e *E. fimbriata*, respectivamente, de seis e cinco fragmentos florestais, de tamanhos diferentes (variando de 13,4 a 580 ha), separados por distâncias entre 6,1 e 50,4 km, localizados no norte do estado do Paraná. Os machos de abelhas foram coletados com rede entomológica durante visita à iscas-odores. Em cada fragmento florestal, as abelhas foram amostradas simultaneamente por dois coletores em dois pontos distintos de coleta. O número de coleta por fragmento variou de 12 a 18. Foram analisados 269 machos de *E. pleosticta* e 212 machos de *E. fimbriata*. Todos os seis locos de microssatélites analisados se mostraram polimórficos, com um número de alelos variando de 11 a 39 entre os diferentes locos para *E. pleosticta* e, 7 a 36 para *E. fimbriata*. De um total de 128 alelos identificados para *E. pleosticta* e 115 para *E. fimbriata*, 45 e 37 foram alelos exclusivos para as respectivas espécies. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) revelou uma variação genética de 84,88% dentro das amostras analisadas de *E. pleosticta* e de 15,12% entre estas, com um valor de $\phi_{ST} = 0,15$. Valores similares foram observados para *E. fimbriata*. Para esta espécie foi encontrada uma variação de 86,2% dentro das amostras analisadas e de 13,8% entre estas, e um valor de $\phi_{ST} = 0,13$. Para ambas as espécies os valores de ϕ_{ST} foram significativamente diferentes de zero, indicando diferenciação genética alta e moderada, respectivamente, para *E. pleosticta* e *E. fimbriata*. Uma significativa estruturação entre as amostras analisadas também foi encontrada pela análise bayesiana, a qual revelou a formação de três agrupamentos distintos entre si, para ambas as espécies estudadas. As análises revelaram baixas frequências de machos diplóides, totalizando seis machos diplóides identificados para *E. pleosticta* e dois para a espécie *E. fimbriata*. A diferenciação genética detectada entre os vários pares de amostras é sugestiva de restrição de fluxo gênico entre as subpopulações dos diferentes fragmentos florestais na região estudada.

Palavras-chave: Insetos haplodiplóides. Euglossini. Macho diploide. Microssatélites. Diversidade genética. Fragmentos florestais.

ANDRADE, Leandro Nunes de. **Population genetic structure and frequency of diploid males of *Euglossa pleosticta* and *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini)**. 2010. 81 f. Dissertation (Master's degree in Genetic and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

The genetic structure and the frequency of diploid males in populations of two orchid bee species, *Euglossa pleosticta* and *Euglossa fimbriata*, were studied using microsatellite markers. Both species show a wide distribution in the Brazilian territory and are usually found in Atlantic Forest remnants, from northeastern to southern Brazil. Genetic analysis were carried out on samples of males of *E. pleosticta* and *E. fimbriata*, respectively, from five and six forest fragments, located in northern Paraná state. These fragments have different sizes (ranging from 13.4 to 580 ha) and they are separated by distances varying from 6.1 to 50.4 km. Euglossine bees were collected with an entomological net after being attracted to scent-baits. In each forest fragment, bees were sampled simultaneously by two collectors at two different sites. The number of samplings per fragment ranged from 12 to 18. A total of 269 males of *E. pleosticta* and 212 males of *E. fimbriata* were analyzed. The six microsatellite loci analyzed (Egc17, Egc 18, Egc 24, Egc 26, Egc Egc 35 and 51) were polymorphic, with a number of alleles ranging from 11 to 39 for *E. pleosticta* and from 7 to 36 for *E. fimbriata*. From the 128 alleles identified for *E. pleosticta* and 115 for *E. fimbriata*, 45 and 37, respectively, were exclusive alleles. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed 84.88% of genetic variation within *E. pleosticta* samples and 15.12% among samples from different fragments, with a $\phi_{ST} = 0.15$. Similar results were found for *E. fimbriata*. For this species the variation within and between samples were, respectively, 86.2% and 13.8%, and the value of ϕ_{ST} was 0.13. For both species the estimates of ϕ_{ST} were significantly different from zero and indicated a high genetic differentiation for *E. pleosticta* and a moderate genetic differentiation for *E. fimbriata*. Bayesian analysis indicated a significant genetic differentiation among the samples and revealed the formation of three distinct clusters for both species. The analyses also revealed a low frequency of diploid males, with a total of six diploid males of *E. pleosticta* and two of *E. fimbriata*. The genetic differentiation detected between several pairs of samples is suggestive of restricted gene flow among subpopulations of both species inhabiting forest fragments in the region of study.

Keywords: Haplodiploid insects. Bees. Male diploid. Microsatellite. Genetic diversity. Forest fragments.

LISTA DE TABELAS

Artigo

- Tabela 1** – Características dos cinco fragmentos florestais estudados, incluindo tamanho em hectares (ha), localização, tipo de reserva e vegetação. São apresentados os totais de machos das espécies *E. pleosticta* e *E. fimbriata* coletados em cada fragmento (N) e o esforço de coleta em cada fragmento número de coletas 38
- Tabela 2** – Distância geográfica (km) entre os seis fragmentos florestais estudados. D = Faz. Doralice; G = Pq. Estadual Mata dos Godoy; P = Estância Patrial; 2C = Faz. 2C; AT = Pq. Arthur Thomas e H = Horto/ UEL 40
- Tabela 3** – Locos utilizados, total de alelos obtidos para cada loco para a análise de *E. pleosticta* e *E. fimbriata* dos fragmentos estudados 44
- Tabela 4** – Heterozigosidade total esperada (H_T), heterozigosidade intra-loco e heterozigosidade média esperada ($\pm dp$) para as diferentes populações de *Euglossa pleosticta* (parte superior da tabela) e *Euglossa fimbriata* (parte inferior da tabela) provenientes dos cinco fragmentos florestais estudados (D - AT)*. [] = no. de indivíduos analisados 46
- Tabela 5** – Número de indivíduos analisados (N), número de machos diplóides (M_{2n}) número de locos que revelaram machos diplóides, porcentagem de locos polimórficos (P), frequência total (ϕ_T) de machos diplóides e frequência de machos diplóides encontrados por fragmento ($\phi_{\text{fragmento}}$) das espécies *E. pleosticta* e *E. fimbriata* coletados em fragmentos florestais^a no norte do Paraná. N_o = não observado 48
- Tabela 6** – Análise da Variância Molecular (AMOVA) e comparação da variância da frequência gênica (ϕ_{ST}), entre as populações das espécies *E. pleosticta* e *E. fimbriata* dos cinco fragmentos

florestais estudados, baseados em marcadores microssatélites (obtidos para os locos Egc 17, Egc 18, Egc 24, Egc 26, Egc 35 e Egc 51).....49

Tabela 7 – Análise da Variância Molecular (AMOVA) e comparação da variância da frequência gênica (ϕ_{ST}) par a par, entre populações de *E. pleosticta* e entre cinco fragmentos florestais estudados^a, baseados em marcadores microssatélites (obtidos para os locos Egc 17, Egc 18, Egc 24, Egc 26, Egc 35 e Egc 51). * = $p < 0,05$ 50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Desenho esquemático de uma abelha da tribo Euglossini.....23
- Figura 2** – Extensão original e atual da Mata Atlântica no Brasil.....29

Artigo

- Figura 1** – Localização geográfica dos fragmentos florestais estudados e as distâncias entre estes. Os números correspondem à distância em quilômetros (km) entre os seis fragmentos florestais estudados: 2C = Fazenda 2C, D = Fazenda Doralice, G = Parque Estadual mata dos Godoy, P = Estância Patrial, AT = Parque Municipal Arthur Thomas e H = Horto / UEL.....39
- Figura 2** – Número médio de alelos de microssatélites obtidos nas ampliações dos seis locos das espécies *Euglossa pleosticta* e *Euglossa fimbriata* dos cinco fragmentos florestais estudados (D = Faz. Doralice; G = Pq. Estadual Mata dos Godoy; P = Estância Patrial; 2C = Faz. 2C; AT = Pq. Arthur Thomas e H = Horto/ UEL).....45
- Figura 3** – Número de alelos obtidos para os locos de microssatélites das espécies *E. pleosticta* e *E. fimbriata* dos cinco fragmentos florestais estudados (D = Faz. Doralice; G = Pq. Estadual Mata dos Godoy; P = Estância Patrial; 2C = Faz. 2C; AT = Pq. Arthur Thomas e H = Horto / UEL).....47
- Figura 4** – Comparação entre os valores de ϕ_{ST} obtidos em análises com amostras de 23 indivíduos (verde) e as amostras de tamanho original, com o total de indivíduos coletados (vermelho). Para as amostras incluindo um número de indivíduos (N) menor que 23, nas análises foram considerados todos os indivíduos destas amostras.....51
- Figura 5** – Coeficientes (Q) estimados para os diferentes indivíduos (*membership*) de *E. pleosticta* (a) e *E. fimbriata* (b), assumindo-

se $K = 3$. Em vermelho estão representados os indivíduos do fragmento D, em verde os indivíduos do fragmento G e em azul, amarelo, rosa e ciano os indivíduos dos52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL.....	17
2.2	A HAPLODIPLOIDIA E O SISTEMA COMPLEMENTAR DE DETERMINAÇÃO SEXUAL NOS HYMENOPTERA.....	18
2.3	IMPLICAÇÕES DA HAPLODIPLOIDIA E DO SISTEMA DE DETERMINAÇÃO SEXUAL COMPLEMENTAR (CSD) DE LOCO ÚNICO PARA A CONSERVAÇÃO DOS HIMENÓPTEROS.....	19
2.4	AS ABELHAS COMO AGENTES POLINIZADORES E A TRIBO EUGLOSSINI.....	21
2.5	MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	26
2.6	O BIOMA MATA ATLÂNTICA E A FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL NO PARANÁ.....	28
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	ARTIGO	32
	Resumo.....	33
1	INTRODUÇÃO	33
2	MATERIAIS E MÉTODOS	36
2.1	ESPÉCIES ESTUDADAS.....	36
2.2	ÁREA DE ESTUDO.....	36
2.3	COLETAS DAS ABELHAS.....	40
2.4	EXTRAÇÃO DE DNA E ANÁLISES DE MICROSSATÉLITE.....	41
2.5	ANALISE DE DADOS.....	42
3	RESULTADOS	43

4 DISCUSSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	57
CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXOS.....	74

1 INTRODUÇÃO

A fragmentação e perda de habitats naturais estão na atualidade entre os maiores desafios à biologia da conservação, constituindo em conjunto uma das principais ameaças à biodiversidade (FAHRIG, 2003). O processo de fragmentação resulta frequentemente na redução do tamanho dos habitats com consequente deterioração na qualidade destes, seguido do declínio no tamanho das populações (UNRUH; MESSING, 1993). Após a fragmentação, populações pequenas e isoladas podem ficar mais susceptíveis à ação da deriva genética, ter riscos maiores de endocruzamento e perda do potencial evolutivo e, consequentemente, sujeitas a maiores riscos de extinção (REED; FRANKHAM, 2003).

Insetos haplodiplóides como abelhas, vespas e formigas são componentes cruciais dos ecossistemas terrestres, pelos diferentes papéis ecológicos que estes diferentes grupos de himenópteros desempenham em tais ecossistemas (LA SALLE; GAULD, 1993). Nestes insetos as fêmeas são organismos diplóides, enquanto os machos são haplóides, hemizigotos. Entretanto, machos diplóides podem também ocorrer em populações de himenópteros (COOK, 1993; UNRUH; MESSING, 1993). Nestes organismos tais machos surgem de ovos fertilizados que se mostram homozigotos para o loco que determina o sexo, enquanto indivíduos heterozigotos para este mesmo loco desenvolvem-se em fêmeas e, indivíduos hemizigotos dão origem a machos haplóides e funcionais (COOK; CROZIER, 1995). Com poucas exceções (COWAN; STAHLHUT, 2004), os machos diplóides em populações de himenópteros são organismos estéreis e/ou de baixo valor adaptativo, representando assim um custo genético para suas populações (UNRUH; MESSING, 1993).

A conservação genética de organismos haplodiplóides tem recebido pouca atenção da comunidade científica e sido ignorada em decisões sobre conservação (ZAYED; PACKER, 2005). Este é um fato preocupante, pois com base em um modelo estocástico computacional, estes mesmos autores demonstraram que a taxa de extinção em algumas populações haplodiplóides na presença de

machos diplóides é uma ordem de grandeza maior do que na ausência destes (ZAYED; PACKER, *op. cit.*).

Os machos diplóides têm sido considerados, por alguns autores, um custo genético para as suas populações, pois além de serem indivíduos estéreis e ou com uma capacidade adaptativa reduzida, a cada macho diplóide produzido, uma fêmea funcional deixa de ser produzida (ZAYED; ROUBIK; PACKER, 2004; ZAYED; PACKER, 2005). Como são organismos reprodutivamente inviáveis, a produção de tais machos representa também uma redução no tamanho efetivo das populações. Se as populações nas quais machos diplóides são encontrados já se apresentarem reduzidas em tamanho, a presença de tais machos pode, então, acentuar a redução no tamanho destas populações. Alguns estudos desenvolvidos com abelhas da tribo Euglossini, insetos popularmente conhecidos como “abelhas das orquídeas”, têm sugerido que a presença de machos diplóides pode estar relacionada a um declínio no tamanho populacional de algumas espécies (ZAYED; PACKER, 2001; ZAYED; ROUBIK; PACKER, 2004).

Vários autores têm sugerido que populações de algumas espécies de Euglossini podem declinar em número de indivíduos em ambientes fragmentados, a exemplo de fragmentos florestais formados em decorrência dos processos de desmatamento (POWELL; POWELL, 1987; MORATO, 1994; SOFIA; SUZUKI, 2004; BROSI, 2009). Especialmente para algumas espécies de Euglossini a redução do tamanho do fragmento parece ter um efeito negativo sobre as populações destas abelhas (POWELL; POWELL, 1987; GIANGARELLI *et al.*, 2009).

Insetos haplodiplóides, como as abelhas, exibem naturalmente uma variação genética comprovadamente inferior a de outros grupos de insetos que não apresentam o sistema haplodiplóide de determinação sexual (PAMILO; VARVIO-AHO; PEKKARINEN, 1978; BERKEIHAMER, 1982; SHOEMAKER; COSTA; ROSS, 1992; PACKER; OWEN, 2001). Assim, para populações de insetos haplodiplóides sob perda de diversidade genética, os riscos de extinção podem ser ainda maiores.

A determinação das frequências de machos diplóides em populações de abelhas tem se baseado em análises genéticas a partir de marcadores isoenzimáticos (TAKAHASHI *et al.*, 2001; ZAYED; ROUBIK; PACKER, 2004; LÓPEZ-URIBE; ALMANZA; ORDONEZ, 2007). Isso por que tais machos não são claramente distintos dos machos haplóides e coletam normalmente fragrâncias

produzidas pelas plantas (ROUBIK; WEIGHT; BONILLA, 1996) bem como, provavelmente de outras fontes não florais. Contudo, os resultados obtidos em determinados estudos têm algumas vezes se mostrado divergentes (ROUBIK; WEIGHT; BONILLA, 1996; TAKAHASHI *et al.*, 2001).

Nas últimas décadas, marcadores moleculares microssatélites têm sido amplamente empregados em estudos populacionais devido a algumas de suas características, tais como: apresentam herança mendeliana, exibem elevada repetibilidade, são marcadores codominantes e altamente variáveis, especialmente quando comparados a marcadores isoenzimáticos. Apesar disto, nenhum estudo até o momento fez uso de tais marcadores na determinação da frequência de machos diplóides em populações de abelhas Euglossini. Contudo, com o desenvolvimento dos primeiros *primers* de microssatélites para espécies destas abelhas (SOUZA *et al.*, 2007) a utilização de marcadores microssatélites para estudos deste tipo se tornou mais acessível.

Assim, o presente trabalho se propõe a utilizar tais marcadores para obter maiores informações relacionadas à diversidade genética de populações de duas espécies de Euglossini presentes em fragmentos florestais sob diferentes formas de interferência antrópica, bem como investigar a frequência de machos diplóides em tais populações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL

A estruturação populacional é quase universal entre os organismos. Muitos organismos naturalmente formam subpopulações, em diferentes formas de agregados. Além disso, os ambientes naturais são tipicamente irregulares, com áreas favoráveis e desfavoráveis misturadas entre si e, ao longo do tempo, mesmo as regiões favoráveis podem ser desorganizadas por enchentes, incêndios e outras intempéries (HARTL; CLARK, 1997). Estes mesmos autores afirmam que as consequências genéticas da estruturação populacional resultam do fato de que duas subpopulações podem apresentar diferenças genéticas, que consistem na aquisição de frequências alélicas que podem diferir entre subpopulações.

A variabilidade genética é introduzida dentro da população por meio de mutação, recombinação, ou ainda, por meio do fluxo gênico entre imigrantes e a população local (HARTL; CLARK, 1997). A variação genética dentro de uma espécie é um conceito fundamental para a genética aplicada à ecologia e esta possui três componentes: diversidade genética, diferenciação genética e distância genética (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004).

A diversidade genética é uma expressão comumente utilizada para descrever a variação genética herdável, encontrada dentro de entidades biológicas e que pode ser medida em três níveis: individual, populacional e de espécie. No nível individual, a diversidade pode ser encontrada em um indivíduo heterozigoto para qualquer loco particular; já no nível populacional, os alelos presentes em um loco variável são encontrados em indivíduos diferentes na mesma população. Neste caso, se existem mais que dois alelos para um mesmo loco e os organismos são diplóides, nenhum indivíduo exibirá a variação total apresentada pela população; assim, a diversidade populacional é descrita como sendo dividida entre seus indivíduos. Por fim, em nível de espécie, a variação alélica pode mudar entre populações dentro dos limites de distribuição da espécie, onde algumas populações exibem alelos que estão ausentes em outras; neste caso, diz-se que a diversidade

encontra-se dividida entre populações da espécie (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004).

Enquanto a diversidade genética mede a quantidade de variação encontrada numa população, a diferenciação genética descreve como esta variação é dividida entre populações. A distância genética quantifica o grau de similaridade entre dois indivíduos, ou grupos de indivíduos, sejam estes de populações ou mesmo de espécies distintas (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004). Segundo Whiteley, Spruell e Allendorf (2004), um grande número de estudos levantou a hipótese de que fatores ecológicos e história de vida, como tamanho populacional, padrões de migração e sistema reprodutivo estão relacionados com a divergência genética entre populações, por meio dos efeitos de deriva genética e fluxo gênico.

Avaliações da estrutura genética populacional fornecem um retrato genético das populações, revelando medidas de endogamia, diversidade genética e diferenciação entre os espécimes. Esses dados associados ao conhecimento de atributos como o tamanho efetivo da população, o fluxo gênico e os sistemas de acasalamento são particularmente importantes no delineamento das ações de manejo a serem adotadas. Em longo prazo, as metas de conservação visam evitar a endogamia em populações que não são naturalmente endogâmicas, permitindo a manutenção do maior potencial evolutivo possível (PEREZ-SWEENEY; RODRIGUES; MELNICK, 2003).

2.2 A HAPLODIPLOIDIA E O SISTEMA COMPLEMENTAR DE DETERMINAÇÃO SEXUAL NOS HYMENOPTERA

Dentre os insetos Hymenoptera, ordem na qual estão inseridas as formigas, vespas e abelhas, o modo de reprodução mais comum é a arrenotoquia (COOK, 1993; COOK; CROZIER, 1995). Neste modo de reprodução, os machos nascem de ovos não fertilizados (partenogênese), recebendo assim um conjunto simples (haplóide) de cromossomos maternos, enquanto as fêmeas têm sua origem a partir de ovos fertilizados, sendo assim organismos diplóides ($2n$) que carregam cromossomos de origem paterna e materna.

Estudos mostram que na maioria dos himenópteros não ocorre os conhecidos mecanismos de determinação sexual diplodiplóide, o qual se baseia nas diferenças de dosagens entre locos ou diferenças em conjuntos cromossômicos, tal como a presença/ausência do cromossomo Y, que resulta na determinação do sexo masculino em mamíferos (COOK op. cit.). Deste modo, diferentes modelos de determinação sexual para insetos haplodiplóides têm sido propostos (COOK, 1993; UNRUH; MESSING, 1993; COOK; CROZIER, 1995), dentre os quais se destacam: o modelo denominado por determinação de sexo por complementaridade (CSD, do inglês: *Complementary Sex Determination*) e o de balanço gênico. No modelo CSD, duas possibilidades têm sido sugeridas, uma na qual a determinação do sexo em haplodiplóides seria baseada em um único loco (*single-locus CSD*) com múltiplos alelos. Neste modelo, proposto por Whiting nas décadas de 1930-1940, indivíduos diplóides heterozigotos para o loco sexual seriam fêmeas, enquanto que indivíduos diplóides homozigotos para este loco, ou ainda hemizigotos, seriam machos (UNRUH; MESSING, 1993). O modelo CSD-loco único multialélico foi primeiro descrito para a vespa parasita *Bracon hebetor*. Nesta espécie, heterozigotos $AiAj$ são fêmeas, enquanto os genótipos $Ai Ai$ ou $Aj Aj$ são machos diplóides e os genótipos hemizigotos Ai ou Aj correspondem a machos haplóides (COOK, 1993). Um segundo modelo relacionado ao CSD, propõe a presença de dois ou mais locos sexuais contribuindo para determinação do sexo nestes insetos, no qual a heterozigosidade em um ou mais destes locos conduziria ao desenvolvimento de fêmeas (CROZIER, 1977). Assim, no sistema CSD multiloco, a heterozigosidade de vários locos (por exemplo $AiAi / BiBj$) é suficiente para o desenvolvimento de fêmeas, enquanto que um indivíduo diplóide será macho somente se todos os locos estiverem em homozigose (CROZIER, 1977; COOK, 1993).

2.3 IMPLICAÇÕES DA HAPLODIPLOIDIA E DO SISTEMA DE DETERMINAÇÃO SEXUAL COMPLEMENTAR (CSD) DE LOCO ÚNICO PARA A CONSERVAÇÃO DOS HIMENÓPTEROS

O sistema haplodiplóide dos himenópteros tem sido foco de diversos debates no meio científico, uma vez que tal sistema tem várias outras

consequências além da determinação do sexo para este grupo de insetos. Uma delas relaciona-se ao fato de que, segundo alguns pesquisadores, os organismos haplodiplóides, ao contrário dos diplóides, estariam possivelmente mais imunes aos impactos dos alelos deletérios, os quais seriam eliminados („purgados“) mais rapidamente por meio dos machos haplóides, diminuindo os riscos intrínsecos de uma extinção (ZAYED; PACKER, 2005). Entretanto, como mencionado anteriormente, estes dois autores destacam que o sistema de determinação sexual de loco único, identificado até o momento para a maioria dos himenópteros haplodiplóides, introduz outra fonte de desvantagem genética nestes insetos, correspondente à produção dos machos diplóides estéreis ou de baixo valor adaptativo. A principal decorrência deste fato, segundo análise envolvendo modelo estocástico computacional desenvolvido por estes mesmos autores, é que a presença de tais machos em populações pequenas, as quais estão sujeitas a uma menor diversidade alélica (alelos *CSD*; < 5 alelos), teoricamente aumenta a probabilidade de extinção das populações nas quais estes ocorrem. Ou seja, em populações pequenas, que tenham sofrido, por exemplo, „gargalo de garrafa“, a perda de alelos no loco único-*CSD* pode representar um risco maior para tais populações, decorrente de uma maior probabilidade de produção de machos diplóides (UNRUH; MESSING, 1993). Aparentemente as populações maiores de himenópteros haplodiplóides podem manter muitos alelos por loco *CSD* - comumente entre 9 e 20 - reduzindo assim a chance de machos diplóides serem produzidos (COOK; CROZIER, 1995; ZAYED; PACKER, 2005). O número de alelos no loco *CSD* é mantido pelo equilíbrio entre mutação e deriva, com populações grandes mantendo mais alelos do que as populações menores (YOKOYAMA; NEI, 1979 *apud* ZAYED; ROUBIK; PACKER, 2004).

Embora alguns autores argumentem que o sistema haplodiplóide de himenópteros resulte em um desvio na razão sexual dos indivíduos produzidos nos ninhos destes insetos, já foi demonstrado para diferentes espécies de abelhas da tribo Euglossini, que geralmente a razão sexual na produção de fêmeas e machos é de 1:1, ou bem próximo a esta proporção (PERUQUETTI; CAMPOS, 1997). Apesar disto, ao reduzir o número de fêmeas em uma população, a produção de machos diplóides pode produzir um viés nesta razão sexual em favor de machos, ou seja, para cada macho diplóide produzido uma fêmea deixa de ser produzida. Assim, o

número de machos, nestes casos, pode superar a quantidade de fêmeas (ZAYED, 2004). Além disto, a própria produção de indivíduos estéreis, quando da produção de machos diplóides, resulta na diminuição do tamanho efetivo (N_e) das populações onde estes estão presentes. Zayed (2004) demonstra que uma baixa diversidade alélica no loco *CSD* resulta em uma redução no tamanho efetivo de populações de himenópteros e tal efeito é maior quando os machos diplóides são efetivamente estéreis.

2.4 AS ABELHAS COMO AGENTES POLINIZADORES E A TRIBO EUGLOSSINI

Devido ao seu papel na polinização, as abelhas são consideradas essenciais para a manutenção da biodiversidade vegetal (NEFF; SIMPSON, 1993). No caso das espécies que dependem exclusivamente de fecundação cruzada, a atividade dos polinizadores é um evento de importância absoluta (PLEASANTS, 1983). Entre as Angiospermas, a maior parte das espécies possui flores zoófilas e, desta maneira, necessita de animais para desenvolver frutos e sementes (SCHLINDWEIN, 2000). Em muitos casos, a polinização é o resultado de intrincadas relações entre planta e animal, e a redução e/ou perda de um deles poderá afetar a sobrevivência de ambos (cf. SILVA, 2002). Na região Neotropical, que abrange toda América Central e América do Sul, existe um grupo peculiar de abelhas que tem grande importância na polinização de várias famílias vegetais, mas que, sobretudo, apresenta uma íntima associação com a família Orchidaceae. Pelo menos 650 espécies de orquídeas são polinizadas por essas abelhas e algumas espécies de orquídeas dependem exclusivamente da sua visita para que a polinização ocorra (ACKERMAN, 1983). Tal grupo pertence à tribo Euglossini, sendo popularmente conhecidas como abelhas das orquídeas (DRESSLER, 1982; ROUBIK; HANSON, 2004).

A tribo Euglossini reúne cerca de 200 espécies distribuídas em cinco gêneros: *Aglae* Lepeletier & Serville, 1825, *Exaerete* Hoffmannsegg, 1817, *Eufriesea* Cockerell, 1909, *Euglossa* Latreille, 1802, e *Eulaema* Lepeletier, 1841 (DRESSLER, 1982; ROUBIK; HANSON, 2004). Com distribuição restrita à América tropical, as

Euglossini devem ter se originado entre 100 e 20 milhões de anos atrás na América do Sul (REBÊLO, 2001; ROUBIK; HANSON, 2004). Embora o grupo seja primitivamente neotropical, ocorrendo do México até a Argentina e Paraguai (DRESSLER, 1982), a ocorrência de pelo menos duas espécies (*Eulaema polychroma* Mocsáry 1899 e *Euglossa viridissima* Friese 1899) já foi registrada em territórios dos Estados Unidos da América (MINCKLEY; REYES, 1996; PEMBERTON; WHEELER, 2007). Do total de espécies existentes nos neotrópicos, pelo menos 101 espécies ocorrem na América do Sul (REBÊLO, 2001) e uma grande parte destas ocorre em território brasileiro. Levantamentos realizados em remanescentes de Mata Atlântica do Brasil revelaram a ocorrência de mais de 50 espécies de Euglossini ocorrendo neste bioma (PERUQUETTI *et al.*, 1999; NEMÉSIO, 2009), com várias espécies descritas recentemente (NEMÉSIO, 2009). De acordo com Roubik e Hanson (2004), se espécies ainda estão sendo descobertas, sem dúvida, ainda existe muito a ser aprendido sobre as abelhas das orquídeas. As abelhas Euglossini formam um grupo distinto dentro da família Apidae, por apresentarem frequentemente tegumento metálico, glossa bastante longa e, no caso dos machos (Figura 1), as tíbias das pernas posteriores modificadas para possível metabolização de substâncias aromáticas (DRESSLER, 1982; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002; ROUBIK; HANSON, 2004). As fêmeas destas abelhas, juntamente com outras de três tribos de Apidae (Apini, Bombini e Meliponini), apresentam no terceiro par de pernas uma corbícula, usada para o transporte de pólen e material para a construção dos ninhos (DRESSLER, 1982; MICHENER, 2000).

Alguns autores sugerem que muitas espécies de Euglossini apresentam associações pequenas ou médias com comportamento do tipo comunal e eussocial. Nestes casos, umas poucas fêmeas dividem cooperativamente um mesmo ninho (ZUCCHI; CAMARGO; SAKAGAMI, 1969; DRESSLER, 1982; REBÊLO, 2001; AUGUSTO; GARÓFALO, 2004). Os ninhos são construídos como uma urna de resina, barro e outros materiais, podendo estar expostos sobre ramos ou gravetos; mas a maioria das espécies constrói suas células de resina aglomeradas dentro de cavidades pré-existentes em ramos ou tronco de árvores, em barrancos ou em edificações (ZUCCHI; CAMARGO; SAKAGAMI, 1969; DRESSLER,

1982). Estas raramente são vistas em flores, mas os machos são abundantes em amostras obtidas com iscas aromáticas (DRESSLER, 1982).

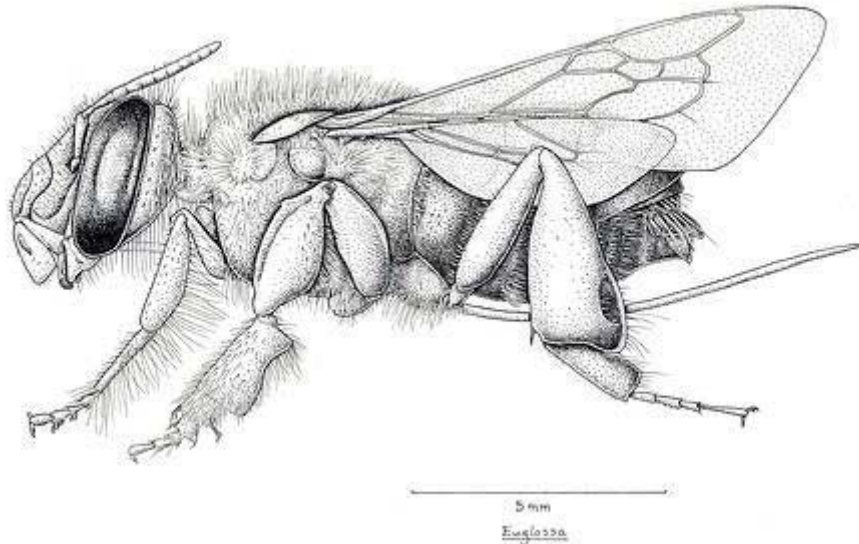


Figura 1 – Desenho esquemático de uma abelha da tribo Euglossini.
Fonte: Roubik (2004).

Apesar do colorido metálico e tamanho avantajado de várias espécies, as abelhas das orquídeas permaneceram escassas em coleções de museus do mundo até meados de 1960 (DRESSLER, 1982). Segundo este autor, o voo rápido destas abelhas pode ter contribuído para o número reduzido de exemplares coletados até então. Contudo, com a identificação de diversos compostos químicos presentes nas orquídeas (DODSON *et al.*, 1969; WILLIAMS; DODSON, 1972), a síntese de essências artificiais de algum modo similares a tais compostos e a descoberta de que machos de várias espécies do grupo eram facilmente atraídos à iscas-odores contendo tais essências, vários levantamentos da fauna de Euglossini em diversos ecossistemas neotropicais foram realizados (PEARSON; DRESSLER, 1985; REBÊLO; GARÓFALO, 1991; MORATO; CAMPOS; MOURE, 1992; NEVES; VIANA, 1999; ROUBIK, 2001; ALVARENGA; FREITAS; AUGUSTO, 2007; AGUIAR; GAGLIANONE, 2008; STORCK-TONON; MORATO; OLIVEIRA, 2009). Esta metodologia vem revelando continuamente novas espécies para o grupo (ANJOS-DA-SILVA; REBÊLO, 2006; NEMÉSIO, 2007, 2009). Nas

últimas décadas, estudos voltados para a biologia da nidificação e comportamento de diversas espécies de Euglossini forneceram informações importantes sobre a biologia de tais abelhas (ZUCCHI; CAMARGO; SAKAGAMI, 1969; AUGUSTO; GARÓFALO, 2004; AUGUSTO; GARÓFALO, 2007). A estreita relação de parentesco com os demais Apidae corbiculados, associado ao fato de exibir diferentes níveis de organização social, um caráter distinto dentre as abelhas corbiculadas, têm suscitado um maior interesse sobre o grupo como elemento importante para estudos voltados à compreensão da evolução do comportamento social entre as abelhas (SOUCY; GIRAY; ROUBIK, 2003; AUGUSTO; GARÓFALO, 2004).

Diante da importância das Euglossini como polinizadores em diversos ecossistemas neotropicais e da expressiva diversidade do grupo, não restam dúvidas de que este grupo de abelhas merece ser mais bem estudado dentro de uma ampla gama de aspectos. Uma das lacunas no conhecimento desta tribo de abelhas corbiculadas relaciona-se a estudos de genética de populações. Particularmente, estudos baseados em marcadores moleculares aplicados à caracterização de populações de espécies de Euglossini são ainda raros. Dentre os estudos envolvendo populações destas abelhas, alguns têm feito uso de marcadores para a análise de populações de diferentes espécies em ambientes fragmentados (SOFIA *et al.*, 2005; WALDSCHMIDT *et al.*, 2005; SUZUKI, 2007), enquanto outros têm buscado informações sobre as frequências de machos diplóides em populações de algumas espécies

(ROUBIK; WEIGT; BONILLA, 1996; LÓPEZ-URIBE; ALMANZA; ORDOÑEZ, 2007). Em ambos os casos, o foco dos trabalhos relaciona-se à conservação de populações destas abelhas, que segundo vários estudos são aparentemente sensíveis à degradação ambiental e/ou fragmentação de habitats, a exemplo da fragmentação florestal (POWELL; POWELL, 1987; MORATO, 1994; SOFIA; SUZUKI, 2004; PARRA-H; NATES-PARRA, 2007; BROSI, 2009). Uma questão que tem sido objeto de debates entre alguns autores relaciona-se à frequência de machos diplóides em populações de Euglossini (ROUBIK; WEIGT; BONILLA, 1996; TAKAHASHI *et al.*, 2001; ZAYED; ROUBIK; PACKER, 2004; ZAYED; PACKER, 2005; LÓPEZ; ALMANZA; ORDONEZ, 2007) e outros grupos de abelhas (ZAYED; PACKER, 2001). Foi detectado por alguns destes pesquisadores

um aumento na produção de machos diplóides em populações de tamanhos mais reduzidos (ROUBIK; WEIGT; BONILLA, 1996; ZAYED; ROUBIK; PACKER, 2004), com a produção de tais machos sendo apontada como um critério ideal para detectar declínios na diversidade genética de populações de haplodiplóides (PACKER; OWEN, 2001; ZAYED; PACKER, 2001).

A diversidade genética é uma expressão comumente utilizada para descrever a variação genética herdável encontrada dentro de entidades biológicas e que pode ser medida em três níveis: individual, populacional e de espécie. No nível individual, a diversidade pode ser encontrada em um indivíduo heterozigoto para qualquer loco particular. Já, no nível populacional, os alelos presentes em um loco variável são encontrados em indivíduos diferentes na mesma população. Neste caso, se existem mais que dois alelos para um mesmo loco e os organismos são diplóides, nenhum indivíduo exibirá a variação total apresentada pela população. Assim, a diversidade populacional é descrita como sendo dividida entre seus indivíduos. Por fim, em nível de espécie, a variação alélica pode mudar entre populações dentro dos limites de distribuição da espécie, onde algumas populações exibem alelos que estão ausentes em outras. Neste caso, diz-se que a diversidade encontra-se dividida entre populações da espécie (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004).

Enquanto a diversidade genética mede a quantidade de variação encontrada numa população, a diferenciação genética descreve como esta variação é dividida entre populações. Por sua vez, a distância genética quantifica o grau de similaridade entre dois indivíduos, ou grupos de indivíduos, sejam estes populações ou mesmo espécies (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004). Segundo Whiteley, Spruell e Allendorf (2004), um grande número de estudos levantou a hipótese de que fatores ecológicos e da história de vida das populações e espécies, como sistema reprodutivo, tamanho populacional e padrões de migração estão relacionados com a divergência genética entre populações, podendo modular os efeitos de deriva genética e fluxo gênico sobre estas. Avaliações da estrutura genética populacional fornecem um retrato genético das populações, revelando medidas de endogamia, diversidade genética e diferenciação genética destas. Tais informações associadas ao conhecimento de atributos como o tamanho efetivo da população (N_e), o fluxo gênico e os sistemas de acasalamento são particularmente importantes no

delineamento das ações de manejo a serem adotadas. Em longo prazo, as metas de conservação relacionam-se a evitar a endogamia em populações que não são naturalmente endogâmicas, permitindo a manutenção do maior potencial evolutivo possível (PÉREZ-SWEENEY; RODRIGUES; MELNICK, 2004).

Atualmente, vários tipos de marcadores moleculares estão disponíveis para análises de diversidade e estrutura genética das espécies e populações (AVISE, 2004). Particularmente, para a determinação de machos diplóides de abelhas *Euglossini*, é necessário o emprego de marcadores moleculares codominantes, a exemplo de marcadores isoenzimáticos e microssatélites. Neste tipo de investigação observa-se na literatura atual uma gama de estudos fazendo uso de marcadores isoenzimáticos (ROUBIK; WEIGT; BONILLA, 1996; TAKAHASHI *et al.*, 2001; ZAYED; ROUBIK; PACKER, 2004; LÓPEZ-URIBE; ALMANZA; ORDONEZ, 2007) e uma carência total de pesquisas baseadas em marcadores microssatélites. Além disto, é perceptível a escassez de trabalhos sobre a diversidade genética de populações de *Euglossini* sob ameaças antropogênicas, tais como as submetidas à fragmentação de habitats. Neste sentido, maiores esforços devem ser dirigidos para o estudo de possíveis perdas na diversidade genética de populações destas abelhas.

2.5 MARCADORES MICROSSATÉLITES

Os marcadores microssatélites, também conhecidos como sequências simples repetidas (SSRs, do inglês *Simple Sequence Repeats*) ou repetições curtas em *tandem* (STRs, do inglês *Short Tandem Repeats*), são marcadores neutros com alta taxa de polimorfismo representados por sequências genômicas de DNA não codificante, apresentando sequências curtas repetidas (de 1 a 6 pares de bases) em *tandem* e distribuídas abundantemente pelo genoma. Variando normalmente de vinte a algumas centenas de bases em tamanho, tais sequências são geralmente amplificadas facilmente pela reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) (AVISE, 2004; CHISTIYAKOV; HELLEMANS; VOLCKAERT, 2006). Embora os microssatélites sejam

extensivamente usados em um considerável número de estudos que abrangem as mais variadas áreas da genética, a dinâmica mutacional destas regiões genômicas ainda não se apresenta bem compreendida. Um dos aspectos conhecidos diz respeito à taxa de mutação de microssatélites, sendo esta muito mais alta que a de outras partes do genoma, variando de 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos por loco por geração. Vários mecanismos foram sugeridos para explicar essa taxa, incluindo erros durante a recombinação, *crossing-over* desigual e deslizamento da polimerase durante a replicação ou reparo do DNA (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O sucesso no uso dos marcadores microssatélites se deve a sua abundância e grande distribuição no genoma, alto grau de polimorfismo (multialelismo) e à facilidade de análise destes marcadores (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002). Além disso, estes marcadores apresentam herança mendeliana simples e são considerados codominantes sendo possível a identificação dos heterozigotos (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004). Todos estes fatores combinados os colocam como os marcadores moleculares com maior conteúdo de informação de polimorfismo e de grande interesse para muitos estudos como mapeamento genético, estudos de DNA forense, estudo da variabilidade genética de populações e conservação/manejo dos recursos biológicos (AVISE, 2004; PÉREZ-SWEENEY; RODRIGUES; MELNICK, 2004). No entanto, conforme Oliveira *et al.* (2006), a utilização de microssatélites tem encontrado barreiras devido ao alto custo no desenvolvimento de *primers* específicos. Vários estudos têm mostrado, entretanto, que pares de *primers* determinados para uma espécie podem ser utilizados para outras do mesmo gênero ou para gêneros diferentes da mesma família. Esse atributo dos microssatélites é conhecido como transferabilidade ou amplificação espécie-cruzada. A transferabilidade pode ser um fator importante na simplificação do uso dos microssatélites pela redução de custos, principalmente quando se trabalha com espécies raras ou que apresentem dificuldades de isolamento de microssatélites (OLIVEIRA *et al.*, 2006). A aplicação de marcadores microssatélites em estudos de populações de Euglossini teve início apenas recentemente. Isso ocorreu após a descrição de diferentes *primers* desenvolvidos por Souza *et al.* (2007) para duas espécies destas abelhas (*Euglossa cordata* L. e *Eulaema nigrita* Lepeletier). Segundo estes autores, tais *primers* se mostraram eficientes para a amplificação de vários locos polimórficos de diferentes espécies da

tribo, dentre as quais *Euglossa fimbriata* Rebêlo e Moure e *Euglossa pleosticta* Dressler. Estas duas são objetos de investigação no presente estudo, por serem espécies que representam componentes importantes das comunidades de Euglossini em fragmentos de Mata Atlântica do sul e sudeste do Brasil.

2.6 O BIOMA MATA ATLÂNTICA E A FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL NO PARANÁ

Como destacado anteriormente, mais de 50 espécies de Euglossini já foram descritas para a Mata Atlântica, algumas das quais endêmicas deste bioma (NEMÉSIO; SILVEIRA, 2007a; NEMÉSIO, 2009). Contudo, nos dias atuais, espera-se que as populações de Euglossini, assim como de outros grupos de polinizadores presentes na Mata Atlântica estejam potencialmente sob forte risco de declínio e extinção dado o grau de devastação deste ameaçado bioma. A Mata Atlântica que, no passado ocupava uma extensão de cerca de 1300.000 km², atualmente ficou reduzida a cerca de 7% de sua extensão original (SOS MATA ATLÂNTICA, 2008) e encontra-se representada, na sua maior parte, por pequenos fragmentos, resquícios da antiga vegetação nativa (TOREZAN, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2009; TABARELLI *et al.*, 2010). Contudo, as estimativas em relação à extensão atual deste bioma têm variado segundo os diferentes autores (TONHASCA JR, 2005). Segundo os resultados apresentados no Atlas dos Remanescentes Florestais de Mata Atlântica, período 2000 - 2005, esta estava reduzida a 6,98% de sua cobertura original (Figura 2). Em 2000, este índice era de 7,1%. Apesar disso, o levantamento mostra que, comparando os desmatamentos identificados nos intervalos de 1995-2000 e 2000-2005, houve diminuição de 71% no ritmo de desflorestamento (SOS MATA ATLÂNTICA, 2008).

No estado do Paraná, os registros apontam que toda sua superfície era recoberta por algum tipo de formação vegetal pertencente ao bioma Mata Atlântica (SOARES; MEDRI, 2002). Particularmente no norte deste estado, a vegetação originalmente nativa era de floresta estacional semidecidual, a qual, assim como a vegetação no restante do estado, sofreu um processo intenso de fragmentação desde o século XIX, resultando em uma paisagem composta por uma miríade de

pequenos fragmentos (TOREZAN, 2002). Segundo este autor, antes da fragmentação, este tipo de ecossistema formava um contínuo com a floresta ombrófila densa localizada na costa atlântica. Contudo, após o desmatamento, apenas menos de 5% da formação vegetal nativa do norte do estado persistem na atualidade. Tal situação pode ser considerada alarmante, devido à importância da Mata Atlântica como um bioma de alta biodiversidade e endemismos (MYERS *et al.*, 2000). O processo de fragmentação que decorre do desmatamento de florestas, como o que acometeu a Mata Atlântica, tem profundas consequências para o ecossistema, mas sem dúvida, o efeito mais evidente é a redução no número de espécies (TONHASCA JR, 2005).

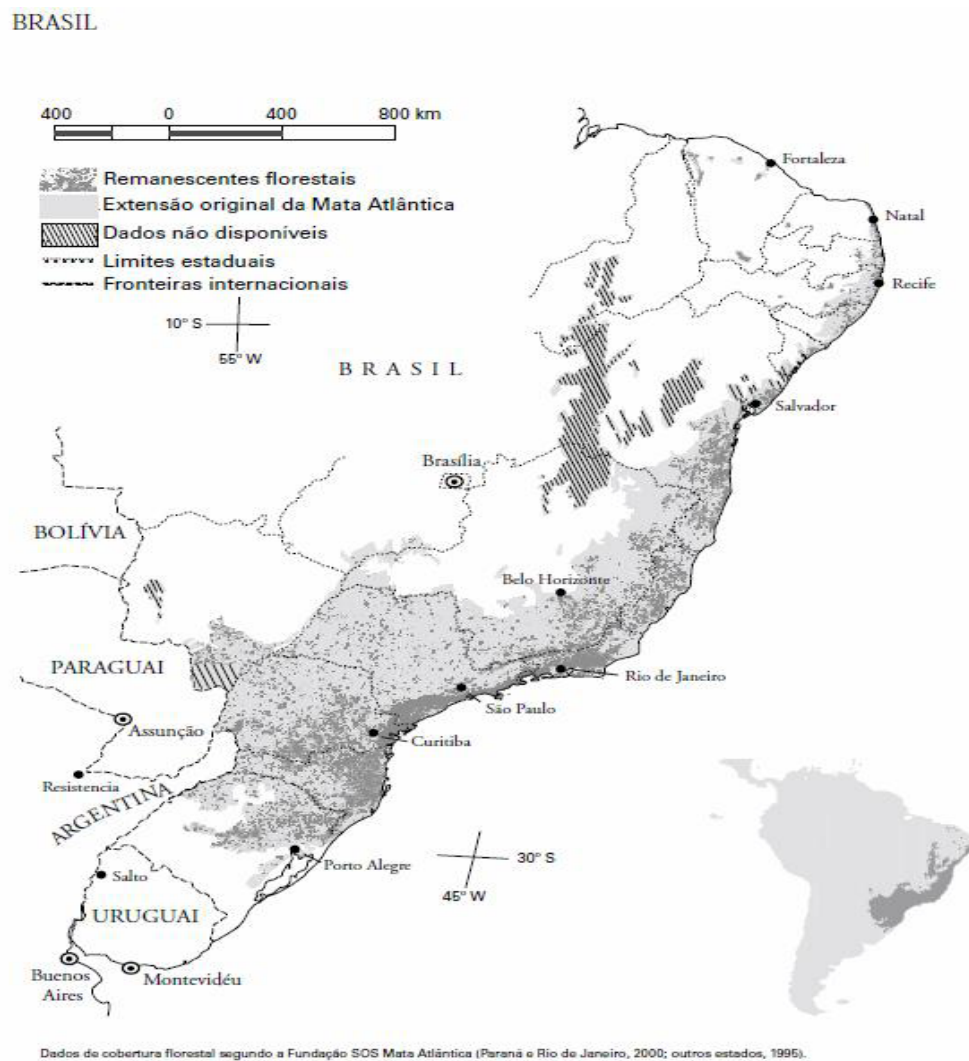


Figura 2 – Extensão original e atual da Mata Atlântica no Brasil
Fonte: Galindo-Leal *et al.*(2005).

Outros problemas relacionados à fragmentação dizem respeito ao tamanho dos fragmentos e o isolamento destes, uma vez que tais condições podem resultar em reduções nos tamanhos das populações afetadas e a uma interferência nas interações planta-polinizadores que dependem da conectividade entre os habitats (TSCHARNTKE; BRANDL, 2004).

Muitas vezes as populações locais ficam em fragmentos isolados e as distâncias são tão grandes que o movimento entre as manchas de habitats mais ou menos favoráveis pode se tornar impossível. Populações de plantas e animais em fragmentos isolados têm taxas menores de dispersão e migração e, em geral, com o tempo sofrem problemas de fluxo gênico e declínio populacional (ANTONINI *et al.*, 2003). Particularmente, os estudos sobre os efeitos dos desmatamentos e da fragmentação nas comunidades de Euglossini têm sido incompletos (CANE, 2001). É fato que em florestas tropicais, a exemplo da Mata Atlântica, as abelhas estão entre os principais polinizadores (BAWA, 1990). Apesar da importância ecológica das abelhas, questões relacionadas à detecção e extinção de espécies deste grupo de insetos são ainda assuntos negligenciados (MELO; MARTINS; GONÇALVES, 2008). Roubik e Hanson (2004) sugerem que as abelhas Euglossini podem ser especialmente vulneráveis à fragmentação pelo fato destas utilizarem uma ampla área de forrageio (JANZEN, 1971). Embora o deslocamento destas abelhas entre fragmentos florestais já tenha sido demonstrado (RAW, 1989; TONHASCA JR; BLACKMER; ALBUQUERQUE, 2002), as informações sobre a diversidade genética das populações de Euglossini em ambientes fragmentados são ainda limitadas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais deste estudo foram analisar a variabilidade e a estrutura genética e as frequências de machos diplóides de populações de *Euglossa pleosticta* e *Euglossa fimbriata* presentes em fragmentos florestais de Mata Atlântica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar, a partir da aplicação de marcadores microssatélites, as frequências de machos diplóides e a variabilidade e a estrutura genéticas de populações das espécies *Euglossa pleosticta* e *Euglossa fimbriata*, respectivamente, de seis e cinco fragmentos florestais de Mata Atlântica, apresentando tamanhos e graus de conservação distintos, localizados no norte do Paraná;
- Obter informações sobre as populações de *E. pleosticta* e *E. fimbriata* presentes em fragmentos florestais, que possibilitem uma maior compreensão dos efeitos da fragmentação sobre as espécies estudadas;
- Fornecer informações que possam vir a subsidiar estratégias de manejo que visem uma maior conservação das espécies estudadas e de remanescentes de Mata Atlântica mantidos na forma de fragmentos florestais.

4 ARTIGO

**MARCADORES MICROSSATÉLITES APLICADOS À ANÁLISE DA ESTRUTURA
GENÉTICA POPULACIONAL E FREQUÊNCIA DE MACHOS DIPLÓIDES DE
DUAS ESPÉCIES DE ABELHAS EUGLOSSINI**

Leandro N. ANDRADE Silvia H. SOFIA*

Trabalho a ser submetido à revista **Apidologie**

MARCADORES MICROSSATÉLITES APLICADOS À ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL E FREQUÊNCIA DE MACHOS DIPLÓIDES DE DUAS ESPÉCIES DE ABELHAS EUGLOSSINI

Leandro N. ANDRADE¹ Silvia H. SOFIA*

Resumo

O presente estudo analisou, com base em marcadores microssatélites, a estrutura genética e frequência de machos diplóides de seis populações de *Euglossa pleosticta* e cinco de *Euglossa fimbriata*, amostradas em fragmentos florestais no norte do estado do Paraná, sul do Brasil. O número de alelos obtidos, a partir da amplificação de seis locos de microssatélites, variou de 11 a 39 para a primeira espécie e, de 7 a 36 para a segunda. Tais marcadores revelaram a presença de machos diplóides nas populações de ambas as espécies, os quais ocorreram em frequências variando de 4,8 a 16,4% para *E. pleosticta* e 3,2% para *E. fimbriata*. A maior parte da variação genética encontrada mostrou-se presente dentro das populações. Para ambas as espécies, as estimativas de diferenciação genética populacional revelaram valores de ϕ_{ST} significativamente diferentes de zero, variando de 0,039 a 0,211 para *E. pleosticta* e de 0,027 a 0,210 para *E. fimbriata*. A análise bayesiana de estrutura genética revelou três grupos estruturados de subpopulações (K=3) para ambas as espécies. Tais resultados sugerem uma limitação no fluxo entre as populações dos diferentes fragmentos estudados.

Palavras-chave: Diversidade genética. Euglossini. Fragmentos florestais. Macho diploide. Microssatélites

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o desmatamento da Mata Atlântica, ocorrido durante as cinco décadas de ocupação do território brasileiro, resultou na devastação deste importante bioma neotropical, o qual se encontra atualmente representado por vários fragmentos florestais (Morellato e Haddad, 2000). Tal processo de desmatamento da Mata Atlântica também se abateu sobre o norte do estado do Paraná, sul do Brasil,

¹ *Autor para correspondência Silvia Helena Sofia. E-mail: shsofia@uel.br - Phone: +55-43-33714437; Fax: +55-43-33714207. Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil Caixa Postal 6001, 86051-990

onde a vegetação original ficou reduzida a uma miríade de pequenos fragmentos florestais (Torezan, 2002).

A fragmentação e perda de habitats naturais estão, na atualidade, entre as principais ameaças à biodiversidade (Fahrig, 2003). O processo de fragmentação resulta na redução do tamanho dos habitats, seguido do declínio no tamanho das populações (Unruh e Messing, 1993). Após a fragmentação, populações pequenas e isoladas podem ficar susceptíveis à ação da deriva genética, endocruzamento e perda do potencial evolutivo, aumentando os riscos de extinção destas (Reed e Frankham, 2003).

Para insetos haplodiplóides, como as abelhas, que exibem uma variação genética inferior a de outros grupos de insetos que não apresentam o sistema haplodiplóide de determinação sexual (Pamilo et al., 1978; Berkelhamer, 1982; Shoemaker et al., 1992; Packer e Owen, 2001), as perdas de diversidade genética podem expor as populações de tais insetos a riscos maiores de extinção que os demais. Além disto, quando se considera o fato de que nos haplodiplóides o aumento no número de machos diplóides, de menor valor adaptativo que os haplóides, está potencialmente associado a um declínio do tamanho populacional e perda de diversidade genética das populações afetadas (Zayed e Packer, 2001; Zayed et al., 2004), a fragmentação de habitats pode representar uma ameaça ainda maior às populações destes insetos. Apesar disto, a conservação genética de organismos haplodiplóides tem recebido pouca atenção da comunidade científica e sido ignorada em decisões sobre conservação (Zayed e Packer, 2005). Segundo modelo estocástico computacional desenvolvido por estes autores, a taxa de extinção em algumas populações haplodiplóides revelou-se na presença de machos diplóides, uma ordem de grandeza maior do que na ausência destes (Zayed e Packer, 2005). Ao se considerar o importante papel ecológico desempenhado pelas abelhas na polinização e manutenção da diversidade vegetal em florestas tropicais (Bawa, 1990; Neff e Simpson, 1993), mais estudos voltados ao conhecimento da diversidade e estrutura genética das populações destes polinizadores presentes em fragmentos florestais devem ser desenvolvidos.

Particularmente no caso das abelhas das orquídeas, um grupo importante na polinização de diversas famílias de angiospermas nos neotrópicos (Dressler, 1982; Tonhasca Jr. et al., 2003), estudos têm mostrado que algumas

espécies podem ter suas populações reduzidas em ambientes fragmentados (Powell e Powell, 1987; Morato, 1994) e que a redução no tamanho do fragmento parece ter um efeito negativo sobre tais populações (Powell e Powell, 1987; Giangarelli et al., 2009; Brosi, 2009). Até o presente, contudo, são escassas as informações sobre a diversidade e estrutura genética de populações destas abelhas.

Atualmente, vários tipos de marcadores moleculares estão disponíveis para análises de diversidade e estrutura genética das espécies e populações (Awise, 2004). Dentre estes, os marcadores moleculares microssatélites estão entre os mais empregados em estudos populacionais, devido à elevada eficiência dos mesmos na detecção de polimorfismo genético. Apresentam herança mendeliana, são codominantes, exibem elevada repetibilidade e são altamente variáveis, especialmente quando comparados a marcadores isoenzimáticos (Awise, 2004; Oliveira et al., 2006).

Particularmente, para a determinação de machos diplóides de abelhas Euglossini, é necessário o emprego de marcadores moleculares codominantes, a exemplo de marcadores isoenzimáticos e microssatélites. Neste tipo de investigação observa-se na literatura atual uma gama de estudos fazendo uso de marcadores isoenzimáticos (Roubik et al., 1996; Takahashi et al., 2001; Zayed et al., 2004; López-Urbe et al., 2007) e uma carência total de esquisas baseadas em marcadores microssatélites. Além disto, é perceptível a escassez de trabalhos sobre a diversidade genética de populações de Euglossini sob ameaças antropogênicas, tais como as submetidas à fragmentação de habitats. Neste sentido, maiores esforços devem ser dirigidos para o estudo de possíveis perdas na diversidade genética de populações destas abelhas.

Diante deste quadro, o presente trabalho se propõe a utilizar marcadores microssatélites no estudo da diversidade e estrutura genética de populações de duas espécies de Euglossini presentes em fragmentos florestais sob diferentes formas de interferência antrópica, bem como investigar a frequência de machos diplóides em tais populações.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ESPÉCIES ESTUDADAS

Euglossa pleosticta Dressler e *Euglossa fimbriata* Rebêlo & Moure são duas espécies da tribo Euglossini que mostram ampla distribuição em território brasileiro. *E. pleosticta* é encontrada nos seguintes estados brasileiros: Amazonas, Acre, Maranhão, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (NEMÉSIO, 2009). *E. fimbriata* tem também sua ocorrência relatada para vários estados brasileiros, tais como Maranhão (REBÊLO; SILVA, 1999), Minas Gerais (NEMÉSIO; SILVEIRA, 2007b), Rio de Janeiro (AGUIAR; GAGLIANONE, 2008), São Paulo (REBÊLO; GARÓFALO, 1991) e Paraná (SOFIA; SANTOS; SILVA, 2004). Juntamente com outras espécies de Euglossini, *E. fimbriata* é tida como uma espécie típica de florestas semidecíduas, comumente encontrada do sudeste, a partir dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo até o Rio Grande do Sul (sul do Brasil) (NEMÉSIO, 2009). Segundo este autor, os registros desta espécie em estados como Paraíba, Pernambuco e Alagoas devem ser confirmados, uma vez que esta pode ser facilmente confundida com outras espécies morfológicamente similares de Euglossini. Ambas as espécies estudadas tem suas ocorrências maiores atribuídas a remanescentes florestais de Mata Atlântica das regiões sudeste do Brasil, embora *E. fimbriata* seja também considerada uma espécie relativamente comum em vários ecossistemas do Maranhão (REBÊLO; SILVA, 1999). Particularmente, no norte do estado do Paraná, estas duas espécies constituem componentes representativos da fauna local de Euglossini (SOFIA; SUZUKI, 2004; SOFIA; SANTOS; SILVA, 2004).

2.2 ÁREAS DE ESTUDO

As abelhas foram coletadas em cinco fragmentos florestais perfeitamente isolados na região norte do estado do Paraná, sul do Brasil (Figura 1). Originalmente, a região norte do Paraná era recoberta por Floresta Estacional Semidecidual, um dos ecossistemas associados de Mata Atlântica (MORELLATO; HADDAD, 2000), restando atualmente pouco (<5%) desta vegetação nativa.

Na Tabela 1 encontram-se as informações referentes à localização geográfica, tamanho em hectares e características da vegetação dos fragmentos florestais estudados. Dos cinco fragmentos estudados, o maior em tamanho (fragmento G), constitui uma reserva governamental (Parque Estadual “Mata dos Godoy”), com cerca de 580 ha de mata nativa primária ainda bastante conservada, que forma junto com outros fragmentos de mata fora dos limites da reserva, um grande fragmento florestal, com cerca de 2800 ha (SOFIA *et al.*, 2005). Três fragmentos estudados constituem reservas legais em propriedades rurais particulares, são estes: fragmentos D, P e 2C. (Tabela 1). Destes, apenas o fragmento D (localizado na Fazenda Doralice), com 180 ha, apresenta sua vegetação nativa ainda relativamente preservada; os outros dois fragmentos de mata privados apresentam a vegetação bastante alterada, representada por vegetação do tipo secundária. O quinto fragmento florestal (AT) constitui uma reserva governamental (Parque Municipal “Arthur Thomas”), com 66 ha e vegetação do tipo secundária. Quatro dos fragmentos onde as abelhas foram amostradas encontram-se circundados por áreas agrícolas ou pastagens, que avançam até a borda destes fragmentos, enquanto que o fragmento AT e H, localizados em áreas urbanas, encontram-se inseridos em matrizes urbanas. Particularmente, o fragmento H constitui uma mata de 13,4 ha, localizada no campus da Universidade Estadual de Londrina cuja vegetação foi consideravelmente modificada por ação antrópica. Todos os fragmentos são representados por vegetação do tipo estacional semidecidual e encontram-se geograficamente separados por distâncias variando aproximadamente entre 7,5 e 50 quilômetro (Figura 1). (Tabela 1). As distâncias aproximadas entre os seis fragmentos estão indicadas na (Tabela 2).

Tabela 1 – Características dos cinco fragmentos florestais estudados, incluindo tamanho em hectares (ha), localização, tipo de reserva e vegetação. São apresentados os totais de machos das espécies *E. pleosticta* e *E. fimbriata* coletados em cada fragmento (N) e o esforço de coleta em cada fragmento número de coletas.

Fragmentos Florestais	Tamanho (ha)	Localização (coordenadas geográficas)	Reserva	Tipo de vegetação	N		Número de coletas
					<i>E. pleosticta</i>	<i>E. fimbriata</i>	
Faz. Doralice (D)	170	Ibiporã (23°18'S; 50°59' W)	Particular/ rural	Madura	74	77	16
Pq. Mata dos Godoy (G)	580	Londrina (23°27'S; 51°14' W)	Governamental/ rural	Madura	45	70	15
Faz. Cachoeira 2C (2C)	180*	Sertanópolis (22°58'S; 50°59' W)	Particular/ rural	Secundária	55	24	18
Estância Patrial (P)	14,6	Londrina (23°22'S; 51°14' W)	Particular/ rural	Secundária	20	23	14
Pq. Arthur Thomas (AT)	66	Londrina (23°20'S; 51°08' W)	Governamental/ Urbana	Secundária	24	18	12
Horto/Uel (H)	13,4	Londrina (23°19'S; 51°12'W)	Governamental/ Urbana	Secundária	51	-	14

*Tamanho do fragmento = a soma de dois fragmentos menores com 66,7 e 117,3 ha, distantes 230 m entre si e considerados com único fragmento.

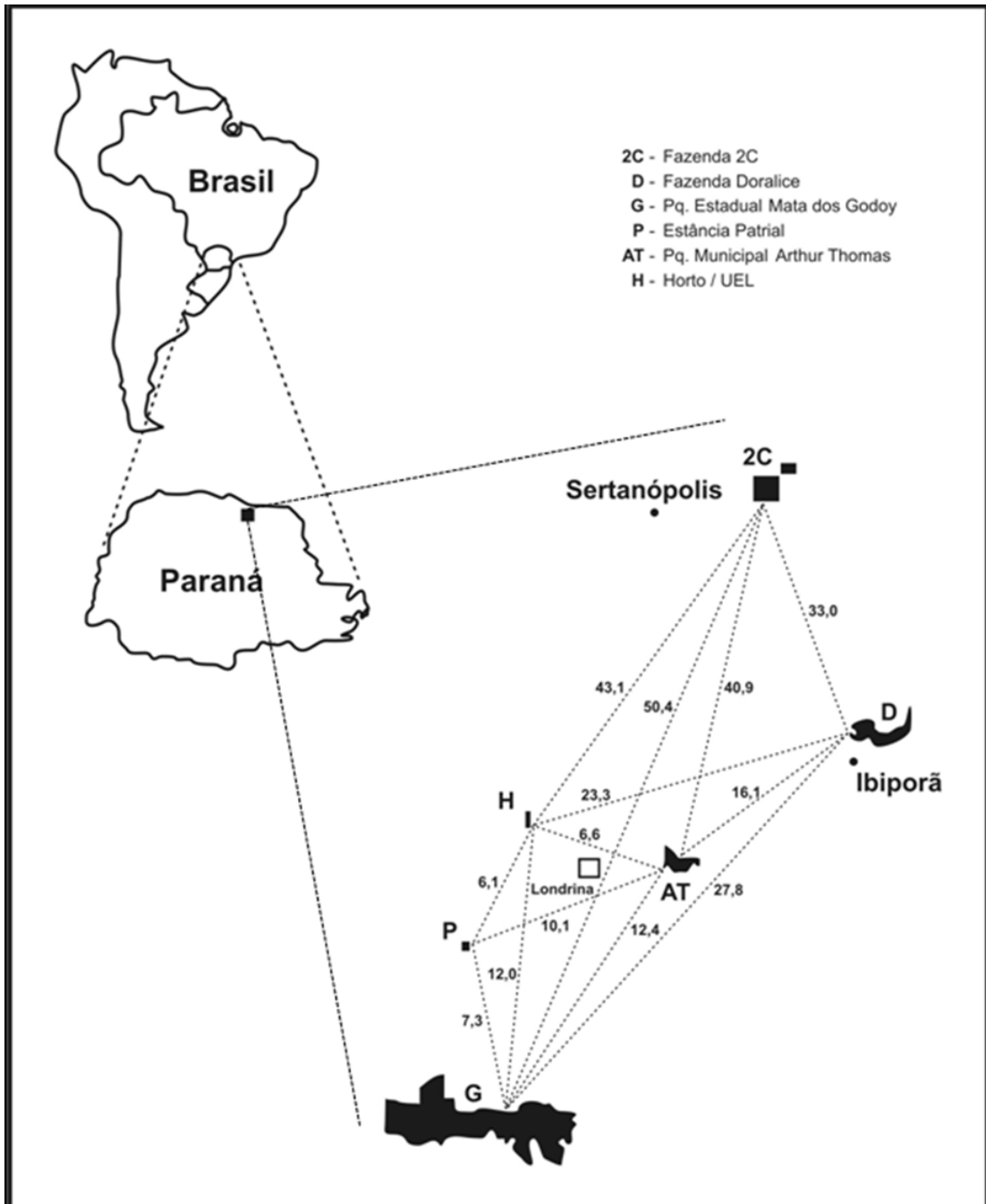


Figura 1 – Localização geográfica dos fragmentos florestais estudados e as distâncias entre estes. Os números correspondem à distância em quilômetros (km) entre os seis fragmentos florestais estudados: 2C = Fazenda 2C, D = Fazenda Doralice, G = Parque Estadual mata dos Godoy, P = Estância Patrial, AT = Parque Municipal Arthur Thomas e H = Horto / UEL

Fonte: modificado de Giangarelli et al. (2009).

Tabela 2 – Distância geográfica (km) entre os seis fragmentos florestais estudados. D = Faz. Doralice; G = Pq. Estadual Mata dos Godoy; P = Estância Patrial; 2C = Faz. 2C; AT = Pq. Arthur Thomas e H = Horto/ UEL.

	D	G	2C	P	AT
G	27,8	-			
2C	33,0	50,4	-		
P	26,3	7,35	49,2	-	
AT	16,1	12,4	40,9	10,1	-
H	23,3	12,0	43,1	6,1	6,6

2.3 COLETAS DE ABELHAS

A metodologia usada para a captura de machos foi baseada na descrita por Sofia e Suzuki (2004), com algumas modificações. Durante as amostragens foram utilizadas iscas-odores de três essências químicas - eucaliptol, eugenol e vanilina - que têm se mostrado eficientes na atração de machos de Euglossini.

Em cada fragmento florestal foram amostrados, simultaneamente por dois coletores, dois pontos de coleta. As coletas foram realizadas no horário entre 10 e 13 horas, período de maior atividade de machos de Euglossini na região de estudo (Santos e Sofia, 2002), e tiveram duração de duas a três horas cada. Em cada uma das áreas foram realizadas entre 12 e 16 amostragens nos meses de maior atividade de Euglossini (outubro a maio) na região (Sofia et al., 2004). A escolha de um número médio de 14 coletas por fragmento foi feita na tentativa de se padronizar e equalizar o esforço amostral por área de estudo e, assim, se obter uma estimativa subjetiva dos tamanhos populacionais das espécies estudadas em cada local. Tendo em vista que, os machos Euglossini que visitam iscas-odores estão em idade adulta e reprodutiva (Dressler, 1982), procurou-se por meio da estratégia de amostragem adotada se obter uma estimativa equivalente dos tamanhos efetivos das populações das espécies estudadas em cada um dos fragmentos estudados. Os machos atraídos às iscas foram coletados com uma rede entomológica e acondicionados vivos em frascos individuais. O material coletado foi identificado no laboratório sob estereomicroscópio. Após a identificação, as abelhas foram mantidas

em *freezer* à temperatura de -20°C até a extração do DNA total. Alguns indivíduos da espécie estudada foram montados em alfinetes entomológicos e depositados no Museu de Zoologia da Universidade de Londrina (MZUEL), servindo como material testemunho.

2.4 EXTRAÇÃO DE DNA E ANÁLISES DE MICROSSATÉLITE

Antes das extrações, as abelhas foram lavadas em etanol 70% para a remoção de contaminantes, como pólen ou fungos. O DNA total das amostras foi extraído por meio de três lavagens sucessivas em: fenol; fenol/clorofórmio/álcool isoamílico; e, clorofórmio/álcool isoamílico conforme metodologia descrita por Sofia et al. (2005). O material obtido da extração foi ressuspenso em 50 μL de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e armazenado a -20°C . Para a obtenção de marcadores microssatélites foram utilizados seis pares de *primers* (Egc 17, Egc 18, Egc 24, Egc 26, Egc 35 e Egc 51) desenvolvidos por Souza et al. (2007). As reações de amplificação foram produzidas em um volume final de 15 μL , contendo: tampão 10x; 0,25mM de dNTPs; 2,0 mM de MgCl_2 ; 0,2 μM de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*) e 1 U de Taq DNA Polimerase (BioTools), DNA estoque diluído 1/10.000 e água bidestilada (q.s.p). As amplificações das amostras foram executadas em um termociclador (PTC-100, *MJ Research*), de acordo com o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de 30 s a 94°C (desnaturação), 20 s em temperatura de 54°C e 1 min a 72°C (extensão) e, uma extensão final de 10 min a 72°C .

Os produtos da amplificação foram separados eletroforéticamente em géis de poliacrilamida e bisacrilamida (19:1) 8% (15,5 mL de água destilada; 4 mL de poliacrilamida 40% [38 g de acrilamida; 2 g de Bis-acrilamida; água ultra-pura até completar o volume de 100 mL]; 2 mL de TBE 10x; 550 μL de persulfato de potássio [1 g de persulfato de potássio; 9 mL de água destilada]; 30 μL de TEMED) em cubas verticais apropriadas com tampão TBE 1,0x. Um marcador de peso molecular de 10 pb foi aplicado na primeira e última canaletas de cada gel para auxiliar na determinação do peso molecular de cada alelo de microssatélite presente no gel. As corridas eletroforéticas foram feitas a 21 V.cm⁻¹, e tiveram duração de mais ou menos duas horas. Os géis foram então corados com nitrato de prata (2 g.10 mL⁻¹) e fotografados em câmera digital sobre negatoscópio.

2.5 ANÁLISES DOS DADOS

No presente trabalho o conjunto de abelhas (de cada uma das espécies estudadas) de cada fragmento florestal foi considerado, ao longo do trabalho, uma „amostra“.

A partir da identificação dos diferentes alelos, a análise genética foi realizada com base em diferentes programas computacionais. A análise da estrutura genética das populações estudadas foi realizada usando-se a estatística F (Wright, 1951) e também a partir da análise bayesiana (análise probabilística). No caso da estatística F foram empregados os seguintes programas computacionais: a) ARLEQUIN 3.01 (Excoffier et al., 2006), no qual a análise da estrutura genética populacional é feita com base na análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992). Esta análise serviu para gerar estimativas da variância genética em diferentes níveis hierárquicos (ou seja, de como a diversidade genética encontra-se distribuída dentro e entre as populações) e do índice ϕ_{ST} entre pares de populações, o qual pode ser usado como uma estimativa da distância genética entre elas (Excoffier et al., 2006). Wright (1978) sugeriu que os valores de ϕ_{ST} podem ser interpretados qualitativamente em termos de diferenciação genética como: valores de 0 a 0,05 indicam baixa diferenciação genética; 0,05 a 0,15 moderada; 0,15 a 0,25 alta e acima de 0,25 diferenciação genética muito alta. A significância do ϕ_{ST} (análogo de F_{ST}) foi estimada por meio de 1000 aleatorizações e foram considerados significativos valores de $p < 0,05$; b) programa TFGA 1.3 (Miller, 1997), por meio do qual foi estimado o valor de F_{ST} empregado para a estimativa de diferenciação das populações. Este programa permitiu ainda o cálculo dos seguintes parâmetros genéticos: proporção de locos polimórficos (P), usando-se o critério de 95% e distância genética Nei. c) programa STRUCTURE versão 2.2, para a determinação da estrutura genética dos grupos amostrados, a partir de análises bayesianas, as quais inferem o número de populações a partir dos dados genéticos fornecidos. Neste caso, o programa define se os grupos analisados estão estruturados em K populações ou não. Foram testadas as possibilidades da existência de uma a sete populações, sendo que a análise de cada K foi repetida dez vezes. No presente estudo, foi assumido o modelo ‘sem mistura’ de ancestralidade, o qual é apropriado para a análise de populações distintas quanto à origem dos seus indivíduos e que

também se mostra mais eficaz do que o modelo de ‘mistura’ em detectar estruturas mais ‘frágeis’ (menos evidentes) de populações (Pritchard et al., 2007). Nestas análises foram empregadas 100.000 randomizações. Todos estes parâmetros genéticos, bem como os de heterozigosidade esperada (intra-loco, média e total) apresentados a seguir, foram estimados sem a inclusão dos dados de machos diplóides, tendo em vista que os programas utilizados não possibilitam a análise simultânea de planilhas contendo dados haplóides e diplóides. A determinação de uma possível associação entre a distância geográfica e os valores de ϕ_{ST} para os diferentes pares de amostras foi calculada pelo coeficiente de correlação, utilizando-se o programa Excel da Microsoft.

A proporção de diploidia nas populações de machos adultos de Euglossini foi estimada a partir do modelo de „probabilidade máxima“, proposto por Owen e Packer (1994) para um loco com dois alelos segundo a fórmula: $\phi = B_2/2pqT_2$, onde B_2 é o número de machos diplóides, $2pq$ é a frequência de heterozigotos T_2 é o número de machos analisados.

3 RESULTADOS

No presente trabalho, os marcadores microssatélites apresentaram uma grande diversidade alélica para ambas as espécies estudadas. Para *E. pleosticta*, o número de alelos por loco variou de 11 (loco Egc 26) a 39 alelos (loco Egc 17). Para *E. fimbriata*, o número de alelos detectados para os seis locos amplificados variou de sete (loco Egc 35) a 36 (loco Egc 17), indicando que para ambas as espécies o loco Egc 17 foi o mais diverso (Tabela 3). Também para ambas as espécies o segundo loco mais variável em número de alelos foi o Egc18 (Tabela 3). Para quatro dos seis locos de microssatélites amplificados, foi observada uma tendência de uma maior diversidade alélica para a espécie *E. pleosticta*. Nesta espécie foram analisados 269 machos, o que permitiu a identificação de 128 alelos no total, ao passo que 115 alelos foram identificados para um total de 212 machos analisados da espécie *E. fimbriata* (Tabela 3). Em ambas as espécies, em todas as populações analisadas, foram detectados alelos exclusivos para todos os locos analisados. Para *E. pleosticta*, o número de alelos exclusivos variou de dois (loco

Egc26) a 13 (loco Egc 18) e para a espécie *E. fimbriata* os alelos exclusivos variaram em número de 1 a 14 (Anexos I e II).

Tabela 3 – Locos utilizados, total de alelos obtidos para cada loco para a análise de *E. pleosticta* e *E. fimbriata* dos fragmentos estudados.

Locos	Número de alelos	
	<i>E. pleosticta</i>	<i>E. fimbriata</i>
Egc17	39	36
Egc18	35	28
Egc24	14	14
Egc26	11	18
Egc35	14	7
Egc51	15	12
Total	128	115

Os números médios de alelos encontrados para as populações das duas espécies nos diferentes fragmentos florestais estudados (Figura 2). Em ambas as espécies a população do fragmento D (reserva legal de 170 ha - Tabela 1) mostrou um maior número médio de alelos por loco analisado. A população do fragmento de maior tamanho e maior grau de conservação (fragmento G, de 580 ha) foi a segunda na categoria de número médio de alelos por loco. Ao se comparar as populações de *E. pleosticta* e *E. fimbriata* deste fragmento com as do fragmento D quanto à diferenças no número médio de alelos, a maior diferença se deu entre as populações de *E. pleosticta* (Figura 2). Para a espécie *E. pleosticta* esta tendência da população do fragmento D (170 ha) de mostrar uma maior diversidade alélica que as demais populações analisadas foi verificada para os seis locos analisados, mas foi particularmente evidente para o loco Egc24 (Figura 3). No caso da espécie *E. fimbriata*, à exceção do loco Egc26 para o qual foi observado uma maior diversidade alélica para a população da Mata dos Godoy (fragmento G), a mesma tendência de uma maior diversidade alélica para a população do fragmento D foi também evidenciada.

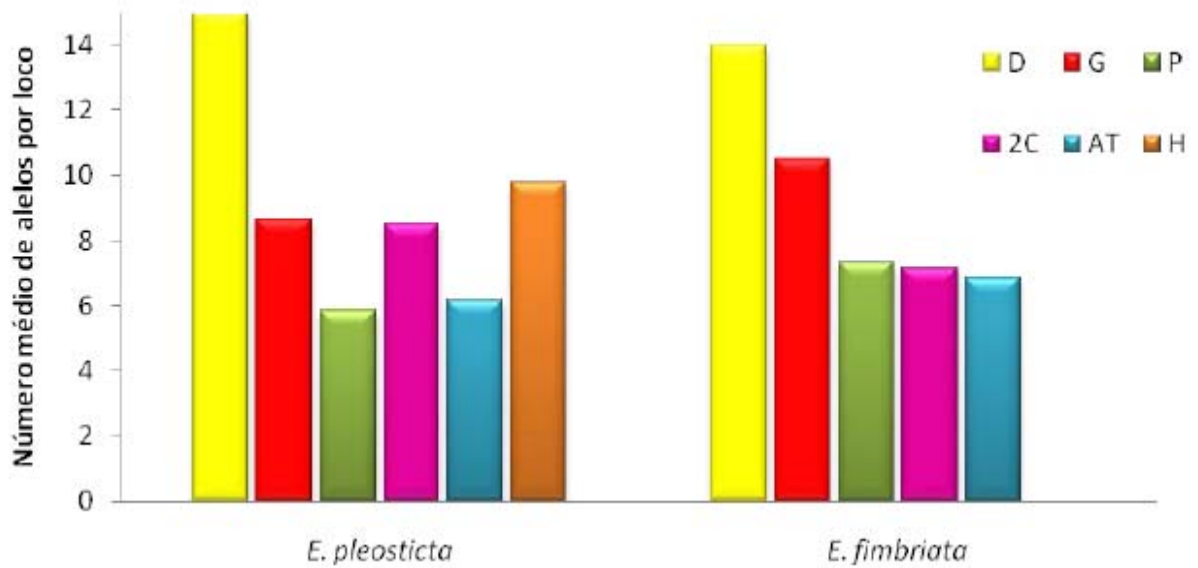


Figura 2 – Número médio de alelos de microssatélites obtidos nas amplificações dos seis locos das espécies *Euglossa pleosticta* e *Euglossa fimbriata* dos cinco fragmentos florestais estudados (D = Faz. Doralice; G = Pq. Estadual Mata dos Godoy; P = Estância Patrial; 2C = Faz. 2C; AT = Pq. Arthur Thomas e H = Horto/UEL).

Em relação às estimativas de heterozigosidade total (H_T) esperada, as análises revelaram valores similares de H_T para ambas as espécies, sendo este valor de 0,73 para *E. pleosticta* e 0,79 para *E. fimbriata*.

Para a espécie *E. pleosticta* as maiores heterozigosidades intra-loco esperadas foram detectadas para os locos Egc 17 e Egc 18, os quais mostraram heterozigosidades médias de 0,9350 e 0,8906 (Tabela 4). No caso de *E. fimbriata* as maiores heterozigosidades (intra-loco e médias) foram encontradas para os locos Egc 17 e Egc 26. Para ambas as espécies o maior valor de heterozigosidade média esperada foi obtido para a população do fragmento D. De modo diverso, os menores valores de heterozigosidade média para a espécie *E. pleosticta* foram detectados para as populações das reservas governamentais G e AT, enquanto que para *E. fimbriata* o menor valor de heterozigosidade média estimado (0,56) foi o da população do fragmento 2C (Tabela 4).

Tabela 4 – Heterozigosidade total esperada (H_T), heterozigosidade intra-loco e heterozigosidade média esperada ($\pm dp$) para as diferentes populações de *Euglossa pleosticta* (parte superior da tabela) e *Euglossa fimbriata* (parte inferior da tabela) provenientes dos cinco fragmentos florestais estudados (D - AT)*. [] = no. de indivíduos analisados.

Loco	D (170 ha)	G (580 ha)	P (14,60 ha)	2C (180 ha)	AT (66 ha)	H (13,4 ha)	Média	$\pm dp$	H_T
<i>Euglossa pleosticta</i>									
	[74]	[45]	[20]	[55]	[24]	[51]			
Egc17	0,9646	0,9596	0,9064	0,8999	0,9447	0,9503	0,9376	0,0276	
Egc18	0,9368	0,9152	0,8830	0,8721	0,8459	0,9432	0,8994	0,0386	
Egc24	0,9002	0,0000	0,1988	0,0370	0,0000	0,0000	0,1893	0,3567	
Egc26	0,8236	0,3212	0,6023	0,4528	0,1700	0,4540	0,4706	0,2259	
Egc35	0,6064	0,2788	0,4503	0,5192	0,2451	0,7525	0,4753	0,1940	
Egc51	0,7950	0,4919	0,6316	0,5164	0,8538	0,7840	0,6787	0,1540	
Het. Média	0,8379	0,4944	0,6121	0,5496	0,5090	0,6473	0,6085	0,1267	0,73
$\pm dp$	0,1193	0,3451	0,2441	0,2889	0,3799	0,3330	0,2850	0,0938	
<i>Euglossa fimbriata</i>									
N	[77]	[70]	[23]	[24]	[18]				
Egc17	0,9445	0,9437	0,9091	0,8080	0,9608	-	0,9132	0,0618	
Egc18	0,8858	0,8878	0,9447	0,9384	0,9150	-	0,9143	0,0275	
Egc24	0,7651	0,6625	0,3557	0,3080	0,7190	-	0,5621	0,2139	
Egc26	0,6995	0,8932	0,8261	0,9022	0,8693	-	0,8380	0,0829	
Egc35	0,6137	0,5615	0,7470	0,2355	0,7778	-	0,5871	0,2162	
Egc51	0,8688	0,0000	0,5692	0,1630	0,0000	-	0,3202	0,3850	
Het. Média	0,7962	0,6581	0,7253	0,5592	0,70700	-	0,6892	0,0880	0,79
$\pm dp$	0,1147	0,3246	0,2055	0,3287	0,3264	-	0,2560	0,0967	

*D = Faz. Doralice; G = Pq. Estadual Mata dos Godoy; P = Estância Patrial; 2C = Faz. 2C; AT = Pq. Arthur Thomas e H = Horto / UEL

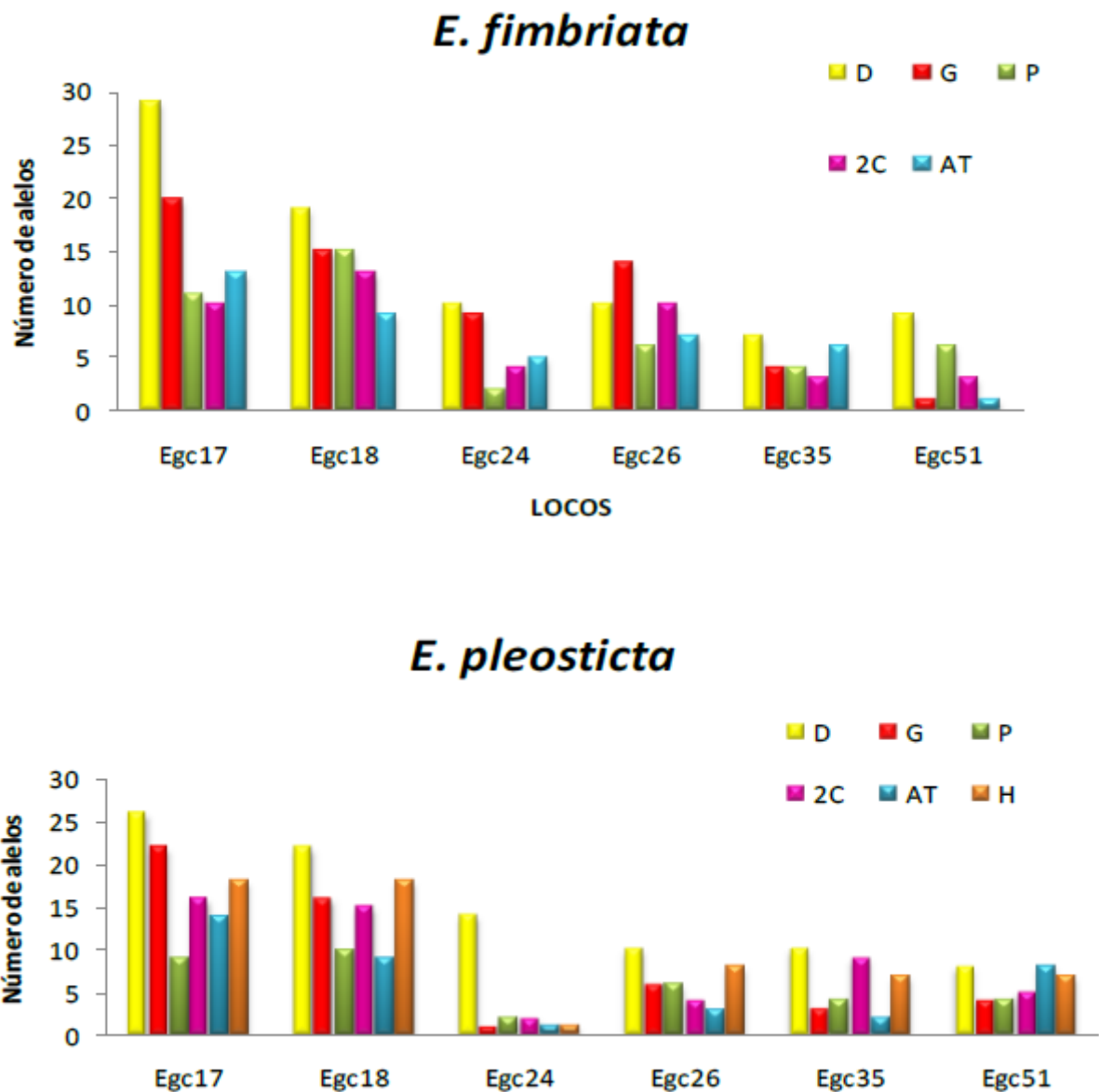


Figura 3 – Número de alelos obtidos para os locos de microssatélites das espécies *E. pleosticta* e *E. fimbriata* dos cinco fragmentos florestais estudados (D = Faz. Doralice; G = Pq. Estadual Mata dos Godoy; P = Estância Patrial; 2C = Faz. 2C; AT = Pq. Arthur Thomas e H = Horto / UEL).

Em relação às frequências dos diferentes alelos encontrados para os seis locos de microssatélites analisados para *E. pleosticta* e suas distribuições nas seis populações estudadas (Anexo I), alguns resultados merecem destaque, como segue: foi observado que para os locos Egc 24 e Egc 26, os alelos 11 e 5, respectivamente, mostraram frequências acentuadamente elevadas (variando entre 65% a 100%) para as populações dos fragmentos G, P, 2C, AT e H, enquanto que, para a população do fragmento D (Doralice) nota-se uma tendência de ocorrências de um maior número de alelos para ambos os locos em frequências mais baixas. Do

total de machos analisados da espécie *E. pleosticta* foi constatada a ocorrência de seis machos diplóides heterozigotos nas ampliações de quatro (Egc17, Egc26, Egc35 e Egc51) dos seis locos de microssatélites investigados (Tabela 5). Destes seis machos, cinco foram coletados em áreas de reservas legais em propriedades particulares e um na reserva governamental localizada em área urbana (AT). Dentre os machos diplóides coletados nas reservas legais, três foram coletados no fragmento D (170 ha), um no fragmento 2C (180 ha) e um no fragmento P (14,6 ha). Dos 212 machos de *E. fimbriata* analisados dois se mostraram heterozigotos para o loco Egc17, ambos pertencentes à população do fragmento D.

Tabela 5 – Número de indivíduos analisados (N), número de machos diplóides (M_{2n}), número de locos que revelaram machos diplóides, porcentagem de locos polimórficos (P), frequência total (ϕ_T) de machos diplóides e frequência de machos diplóides encontrados por fragmento ($\phi_{\text{fragmento}}$) das espécies *E. pleosticta* e *E. fimbriata* coletados em fragmentos florestais^a no norte do Paraná. No = não observado.

Espécies	N	M_{2n}	No. de locos	\bar{P} (%)	ϕ_T	$\phi_{\text{fragmento}}$				
						D	P	2C	AT	H
<i>E. pleosticta</i>	269	8	5	83 -100	3,8%	4,8%	16,4%	9,2%	8,3%	6%
<i>E. fimbriata</i>	212	2	1	83-100	1,2%	3,2%	No	No	No	No

aD = Faz. Doralice; P = Estância Patrial; 2C = Faz. 2C; AT = Pq. Arthur Thomas e H = Horto / UEL.

Para as populações das duas espécies estudadas, a análise da variância molecular (AMOVA) revelou uma diferenciação genética significativamente ($p < 0,0001$) diferente de zero, sendo esta diferenciação alta para a espécie *E. pleosticta* ($\phi_{ST} = 0,1690$) e moderada para *E. fimbriata* ($\phi_{ST} = 0,1378$). Em ambos os casos, a maior parte da variação genética mostrou-se presente dentro dos grupos, sendo 83,1% para *E. pleosticta* e 86,2% para *E. fimbriata* (Tabela 6). A análise de estruturação genética efetuada pelo programa TFGA revelou os mesmos valores de F_{ST} (análogo ao ϕ_{ST}) que os obtidos pela AMOVA.

Tabela 6 – Análise da Variância Molecular (AMOVA) e comparação da variância da frequência gênica (ϕ_{ST}), entre as populações das espécies *E. pleosticta* e *E. fimbriata* dos cinco fragmentos florestais estudados, baseados em marcadores microssatélites (obtidos para os locos Egc 17, Egc 18, Egc 24, Egc 26, Egc 35 e Egc 51).

Espécie	Fonte de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem da Variação	Φ_{ST}
<i>E. pleosticta</i>	Entre populações	5	80,354	0,33732	15,12	0,1512***
	Dentro de populações	255*	482,845	1,89351	84,88	
	Total	260	563,199	2,23083		
<i>E. fimbriata</i>	Entre populações	4	60,632	0,33820	13,78	0,1378***
	Dentro de populações	205*	433,635	2,11529	86,22	
	Total	209	493,867	2,45349		

* = Nas análises dentro de populações não foram incluídos os oito indivíduos diplóides de *E. pleosticta* e dois de *E. fimbriata*. *** = $p < 0,0001$.

Nas comparações par a par, também para ambas as espécies estudadas, a AMOVA indicou uma diferenciação genética significativamente diferente de zero ($p < 0,05$) para os diferentes pares de comparativos analisados (Tabela 7). No caso das populações de *E. pleosticta*, a diferenciação genética encontrada variou de baixa ($\phi_{ST} = 0,0398$) para as populações da reserva legal P (14,6 ha) e da reserva governamental mantida em área urbana - AT (66 ha), a muito alta ($\phi_{ST} = 0,2114$) para as populações do fragmento D (reserva legal de 170 ha) e G (Mata dos Godoy, 580 ha). No caso de *E. fimbriata*, o menor valor encontrado de diferenciação genética foi para o par G e AT ($\phi_{ST} = 0,0274$) e o maior valor estimado foi para o par G e 2C (reserva legal de 180 ha), indicando diferenciação genética também variando de baixa a muito alta (Tabela 7).

Tabela 7 – Análise da Variância Molecular (AMOVA) e comparação da variância da frequência gênica (ϕ_{ST}) par a par, entre populações de *E. pleosticta* e entre cinco fragmentos florestais estudados^a, baseados em marcadores microssatélites (obtidos para os locos Egc 17, Egc 18, Egc 24, Egc 26, Egc 35 e Egc 51). * = $p < 0,05$.

Comparativo	Fonte de variação	Porcentagem de variação		Φ_{ST}	Φ_{ST}
		<i>E. pleosticta</i>	<i>E. fimbriata</i>	<i>E. pleosticta</i>	<i>E. fimbriata</i>
D-G	Entre populações	21,14	13,15	0,2114*	0,1315*
	Dentro de populações	78,86	86,85		
D-2C	Entre populações	19,76	19,86	0,1976*	0,1986*
	Dentro de populações	80,24	80,14		
D-P	Entre populações	13,03	11,53	0,1303*	0,1153*
	Dentro de populações	86,97	88,47		
D-AT	Entre populações	15,86	10,32	0,1586*	0,1032*
	Dentro de populações	84,14	89,68		
D-H	Entre populações	16,86	-	0,1686*	-
	Dentro de populações	83,14	-		
G-2C	Entre populações	15,58	21,02	0,1558*	0,2102*
	Dentro de populações	84,42	78,98		
G-P	Entre populações	14,59	16,40	0,1459*	0,1640*
	Dentro de populações	85,41	83,60		
G-AT	Entre populações	12,44	2,74	0,1244*	0,0274*
	Dentro de populações	87,56	97,28		
G-H	Entre populações	7,55	-	0,0755*	-
	Dentro de populações	92,45	-		
2C-P	Entre populações	11,10	7,56	0,1110*	0,0756*
	Dentro de populações	88,90	92,44		
2C-AT	Entre populações	9,36	14,88	0,0936*	0,1488*
	Dentro de populações	90,64	85,12		
2C-H	Entre populações	7,47	-	0,0747*	-
	Dentro de populações	92,53	-		
P-AT	Entre populações	3,98	6,01	0,0398*	0,0601*
	Dentro de populações	96,02	93,99		
P-H	Entre populações	11,16	-	0,1116*	-
	Dentro de populações	884,4	-		
AT-H	Entre populações	9,42	-	0,0942*	-
	Dentro de populações	90,58	-		

aD = Faz. Doralice; G = Pq. Estadual Mata dos Godoy; P = Estância Patrial; 2C = Faz. 2C; AT = Pq. Arthur Thomas e H = Horto / UEL

Considerando-se que o número de espécimes estudados em cada fragmento foi bastante variável (Tabela 1), com o objetivo de se detectar possíveis desvios nas estimativas genéticas decorrentes de tais diferenças nos tamanhos das amostras analisadas, optou-se por uma análise adicional, como segue: para amostras com N superior a 23 indivíduos, foram escolhidos aleatoriamente (por sorteio) apenas 23 machos destes fragmentos. A partir disto, para ambas as espécies, foram realizadas novas análises de variância molecular (AMOVA) entre os diferentes pares de amostras de cada fragmento florestal. Os resultados obtidos revelaram que os novos valores de ϕ_{ST} dos pares de amostras dos diferentes fragmentos, com tamanhos amostrais variando de 18 indivíduos a 23 não se mostraram acentuadamente discrepantes dos observados com as análises incluindo o número total de indivíduos capturados em cada fragmento (Figura 4). Ou seja, os valores obtidos de ϕ_{ST} não estão refletindo um possível viés produzido por análises envolvendo amostras de tamanhos diferentes.

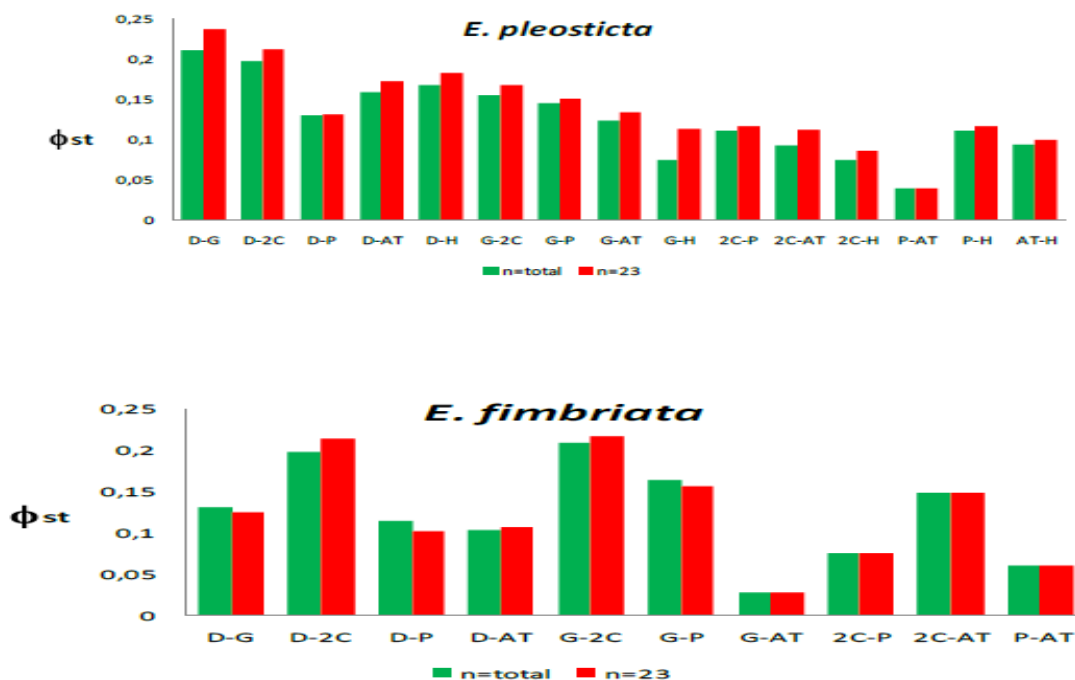


Figura 4 – Comparação entre os valores de ϕ_{ST} obtidos em análises com amostras de 23 indivíduos (verde) e as amostras de tamanho original, com o total de indivíduos coletados (vermelho). Para as amostras incluindo um número de indivíduos (N) menor que 23, nas análises foram considerados todos os indivíduos destas amostras.

Para as diferentes populações de ambas as espécies estudadas a análise bayesiana de estrutura genética revelou de forma nítida a existência de grupos estruturados de populações (ou subpopulações). No caso de *E. pleosticta*, o programa Structure identificou três populações estruturadas ($K = 3$), constituídas pelos seguintes grupos de abelhas: o primeiro formado pelas abelhas dos fragmentos G e H (que agruparam juntas); um segundo grupo, reunindo as abelhas do fragmento D e um terceiro constituído pelos indivíduos das reservas P, 2C e AT (os quais formaram uma única população). Apesar da população do fragmento 2C (localizado em Sertanópolis e, portanto, mais distante destes dois últimos fragmentos) apresentar vários alelos semelhantes às populações de P e AT, nota-se uma tendência da população 2C apresentar certa individualidade ou distinção das demais. Resultados similares foram obtidos para a espécie *E. fimbriata*. Neste caso, três grupos distintos ($K = 3$) foram formados, um destes constituído predominantemente por abelhas da população do fragmento D, outro pelas abelhas do fragmento G e um terceiro, integrando indistintamente abelhas dos fragmentos P, 2C e AT (Figura 5).

A análise de correlação entre distância geográfica (km) entre os fragmentos florestais, todos inteiramente isolados, e os valores de distância genética (valores de ϕ_{ST}) detectados para os diferentes pares de população revelou ausência de qualquer associação significativa entre estes dois parâmetros ($r = 0,17$ para *E. pleosticta*; $0,22$ para *E. fimbriata*).

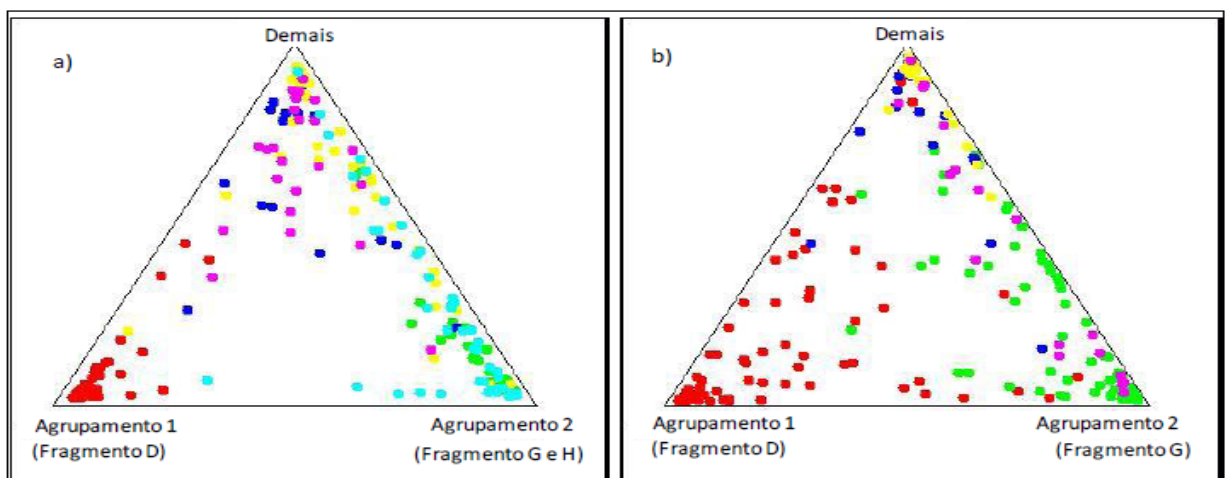


Figura 5 – Coeficientes (Q) estimados para os diferentes indivíduos (*membership*) de *E. pleosticta* (a) e *E. fimbriata* (b), assumindo-se $K = 3$. Em vermelho estão representados os indivíduos do fragmento D, em verde os indivíduos do fragmento G e em azul, amarelo, rosa e ciano os indivíduos dos

4 DISCUSSÃO

Muitas populações ao redor do mundo tornaram-se fragmentadas por atividades antrópicas. Os impactos da fragmentação das populações sobre a diversidade genética, diferenciação, endogamia e risco de extinção dependem do nível de fluxo gênico entre os fragmentos (Frankham et al., 2008). Ainda, segundo estes autores, o nível de fluxo gênico depende de vários fatores, incluindo número de fragmentos populacionais numa região, distribuição geográfica das populações, ambiente da matriz entre os fragmentos, impactos sobre a dispersão dos indivíduos, habilidade de dispersão das espécies, distância entre os fragmentos, tempo da fragmentação, taxas de extinção das populações e recolonização nos fragmentos.

A alta diferenciação genética detectada entre alguns pares de amostras, a exemplo das amostras de *E. pleosticta* dos fragmentos D e G ($\phi_{ST} = 0,211$) e entre as amostras de *E. fimbriata* dos fragmentos G e 2C ($\phi_{ST} = 0,210$) e D e 2C ($\phi_{ST} = 0,198$), é indicativa da existência de uma provável restrição no fluxo gênico entre tais populações. Ou seja, seria esperado na existência de fluxo gênico, uma baixa diferenciação entre as populações de uma região, pois este tende a produzir uma homogeneização no conjunto de alelos e suas frequências entre as populações presentes em um ambiente fragmentado. Mesmo quando estas estiverem sob a ação de efeitos de deriva genética, endogamia, gargalo de garrafa ou depressão endogâmica resultantes do processo de fragmentação. Ao se considerar ainda o histórico recente de fragmentação na região norte do Paraná (<100 anos), a diferenciação genética alta encontrada entre algumas subpopulações de *E. pleosticta* e *E. fimbriata* pode ser interpretada como indicativa de restrição de fluxo gênico entre as subpopulações dos diferentes fragmentos. Isso porque, espera-se que populações com históricos recentes de fragmentação mostrem valores baixos de F_{ST} (Sork et al., 1998). Além disto, pela ausência de correlação entre os índices de ϕ_{ST} e a distância geográfica pode-se supor que a distância entre os fragmentos não está sendo determinante na diferenciação genética encontrada. Tal suposição se baseia no fato de que subpopulações de fragmentos separados por cerca de 7 km (G-P) mostraram resultados de diferenciação genética (ϕ_{ST}) superiores a

subpopulações separadas por uma distância maior que 40 km (ex.: P-AT) (ver Tabela 6).

Encontra-se bem estabelecido na literatura que algumas espécies de Euglossini, especialmente espécies de tamanho maior como abelhas dos gêneros *Eufriesea* e *Eulaema*, são capazes de transpor mais de uma dezena de quilômetros em florestas contínuas (Janzen, 1971; Dressler, 1982), ou mesmo que algumas espécies de Euglossini podem deixar os fragmentos florestais para coletar na matriz vizinha a estes (Milet-Pinheiro e Schildwein, 2005). Brosi (2009) também sugere que abelhas Euglossini são capazes de se deslocar entre fragmentos florestais, fato também observado por outros autores (Raw, 1989; Tonhasca Jr. et al., 2003). No que se refere a *E. pleosticta* e *E. fimbriata* ainda não existem relatos sobre a capacidade de dispersão destas abelhas através de matrizes desmatadas ou áreas de cultivo. Em termos de tamanho corpóreo, estas duas espécies são similares à *Euglossa cordata*, para a qual já foi registrado o deslocamento entre fragmentos florestais, pelo menos em distâncias de 4 km (Raw, 1989), e assim seria esperado que tanto *E. pleosticta* quanto *E. fimbriata* pudessem apresentar um desempenho similar. Alguns estudos têm apontado declínios em populações de determinadas espécies de Euglossini em fragmentos florestais (Powell e Powell, 1987; Sofia e Suzuki, 2004; Brosi, 2009; Giangarelli et al., 2009). No presente trabalho, um esforço aproximado de coleta foi empregado para a captura de abelhas nos diferentes fragmentos estudados. Apesar disto, na reserva Patrial (P), um menor número de machos de ambas as espécies estudadas foi atraído às iscas-odores (Tabela 1), sugerindo que o grupo de indivíduos (ou subpopulação) destas duas espécies neste fragmento florestal é menor. Sabe-se que populações pequenas ou em declínio são mais propensas à extinção do que populações grandes e estáveis. Isto porque, em populações pequenas, os efeitos da deriva genética são maiores (Frankham et al., 2008). Assim, os resultados sugerem que mesmo que indivíduos das subpopulações de *E. pleosticta* e *E. fimbriata* estejam se deslocando entre fragmentos florestais, tal deslocamento não estaria sendo suficiente para minimizar o processo de diferenciação genética, que estaria ocorrendo entre as populações estudadas de ambas as espécies. De acordo com Ferguson et al. (1995), os modelos de genética de população mostram que diferenças substanciais nas frequências de alelos não ocorrem em um curto período de tempo, exceto por meio de seleção ou do tamanho efetivo (N_e) reduzido da população, ou ainda como resultado do efeito de gargalo de

garrafa que pode conduzir à deriva genética. Considerando-se que os machos de abelhas que visitam as iscas-odores em busca de fragrâncias químicas são indivíduos adultos em idade reprodutiva (Zimmerman e Madrinan, 1988), se de fato, tais fragmentos menores tiverem sofrendo declínio no número de machos, isto seria também indicativo de uma redução no tamanho efetivo das populações estudadas.

Segundo Primack e Rodrigues (2001) espécies podem se tornar extintas nos fragmentos por flutuação populacional e sucessão e novas espécies poderão deixar de chegar a estes habitats por problemas de dispersão. Como consequência, o número de espécies no hábitat diminuirá com o passar do tempo, pois é possível que fragmentos pequenos não possam sustentar populações grandes o suficiente para que esta sobreviva por um longo período. A redução no tamanho efetivo das populações, com consequente perda de diversidade alélica (especialmente os alelos do loco CSD), tem sido atribuída como uma das causas determinantes no aumento de machos diplóides de algumas espécies de Euglossini (Roubik et al., 1996; Zayed et al., 2004). Os estudos destes autores mostraram uma grande abundância de machos diplóides de Euglossini no Panamá, com números chegando, em alguns casos a 100% dos machos coletados. Resultados divergentes foram obtidos por Takahashi et al. (2001) e López-Urbe et al. (2007), os quais encontram frequências de machos diplóides variando de zero a 32%. Algumas estimativas indicam que os machos diplóides podem representar cerca de 10% dos machos nas populações naturais panmíticas de himenópteros (Owen e Packer, 1994). Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com tal estimativa, uma vez que a frequência de machos diplóides encontrada para a amostra total de *E. pleosticta* foi de 3,8% e para *E. fimbriata* de apenas 1,2%. Particularmente, para *E. pleosticta*, quando se analisou a frequências de machos por fragmento, esses valores foram divergentes, variando de 4,8 a 16,4%, sendo esta última frequência detectada para a população da reserva Patrial (P).

Em insetos haplodiplóides, com sistema complementar de determinação sexual de loco único (multialélico) é esperado que o endocruzamento produza maiores quantidades de machos diplóides, uma vez que as chances deste loco se encontrar em homozigose são maiores (Unruh e Messing, 1993). Além disto, é também esperado que em populações de tamanhos reduzidos, as chances de endocruzamento sejam potencialmente maiores. Assim, os resultados obtidos com as análises de machos diplóides não sugerem efeitos de endocruzamento, nem

declínios acentuados nos tamanhos das populações analisadas. Nem tampouco na diversidade alélica para o loco de determinação sexual das populações analisadas para as duas espécies (*E. pleosticta* e *E. fimbriata*). Isso porque, seria esperado um maior número destes machos em tais condições. A distinção encontrada na estrutura das „populações’, de ambas as espécies, dos dois fragmentos maiores e mais conservados (D e G), revelada pela análise bayesiana, bem como os dados de diversidade genética nestes dois locais sugere que as subpopulações de cada um destes dois fragmentos estão individualmente mais estruturadas em suas frequências alélicas e estão sendo, provavelmente, capazes de se auto-sustentar. Para ambas as espécies estudadas, tal fato parece estar relacionado ao tamanho ‘populacional’ aparentemente maior destas espécies nestes dois fragmentos. No caso de *E. pleosticta*, o fato da amostra do fragmento H ter se agrupado com os indivíduos do fragmento G, formando um único *cluster* ou agrupamento, poderia ser atribuído à distância reduzida (cerca de 13 km) entre os fragmentos estes dois fragmentos. Por outro lado, apesar da proximidade geográfica (7 km) entre a reserva P e o fragmento G, as amostras destes locais formaram agrupamentos distintos. Neste caso, uma vez mais, os resultados sugerem que a subpopulação do fragmento P, pode estar sofrendo os efeitos de seu tamanho reduzido. Como destacado anteriormente, em populações pequenas, os efeitos da deriva genética são maiores (Frankham et al., 2008). Tais resultados corroboram aqueles obtidos pela AMOVA e ambos indicam uma partição importante na diversidade genética destas subpopulações. Assim, diante da ameaça na redução de polinizadores, incluindo populações de espécies de abelhas (Kevan e Phillips, 2001) os resultados obtidos neste trabalho sugerem que maiores esforços devem ser direcionados na tentativa de viabilizar um maior fluxo gênico entre as subpopulações de *E. pleosticta* e *E. fimbriata* presentes nos fragmentos de Mata Atlântica na região estudada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (processo no. 476254/2008-6), Klabin S.A. e CAPES (Procad no. 158/2007) pelo apoio financeiro, à UEL pelo apoio nas coletas e aos proprietários das reservas particulares, IBAMA e IAP pela autorização fornecida para as coletas de abelhas.

REFERÊNCIAS

- Ackerman, J. D. (1983) Specificity and mutual dependency of the orchid-euglossine bee interaction, *Biol. J. Linn. Soc.* 20, 301-314.
- Aguiar, W. M., Gaglianone, M.C. (2008) Comunidades de abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em remanescentes de Mata Estacional Semidecidual sobre o Tabuleiro no Estado do Rio de Janeiro, *Neotrop. Entomol.* 37, 118-125.
- Armbruster, W. S. (1993) Within-habitat heterogeneity in baiting samples of male euglossine bees: possible causes and implications, *Biotropica* 25, 122–128.
- Avise, J. C. (2004) Molecular markers, natural history and evolution. 2a. ed. Sunderland: Sinauer Associates
- Bawa, K. S. (1990) Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21, 399-422.
- Berkelhamer, R. C. (1982) Intraspecific genetic variation and haplodiploidy, eusociality, and polygyny in the Hymenoptera, *Evolution* 37, 540-545.
- Brosi, B. J. (2009) The effects of forest fragmentation on Euglossini bee communities (Hymenoptera: Apidae: Euglossini), *Conserv. Biol.* 142, 414-423.
- Dressler, R. L. (1982) Biology of orchid bees (Euglossini), *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 13, 373-394.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., Quattro J. M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data, *Genetics.* 131, 479-491.
- Excoffier, L., Laval, G., Scheneider, S. (2006) Arlequin ver 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. Computer software distributed by authors, [online] <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>. (accessed on 26 January 2006).
- Fahrig, L. (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity, *Ann Annu. Rev. Ecol. Syst.* 34, 487-515.
- Ferguson, A., Taggart, J. B., Prodohl, P. A., Mcmeel, O., Thompson, C., Stone, C., McGinnity, P., Hynes, R. A. (1995) The application of molecular markers to the study

and conservation of fish populations, with especial reference to *Salmo*, J. Fish Biol. 47, 103-126.

Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. (2008) Fundamentos da genética da conservação, Sociedade Brasileira de Genética, Riberão Preto.

Giangarelli, D. C., Freiria, G. A., Colatreli, O.P., Suzuki, K. M., Sofia, S.H. (2009) *Eufriesea violacea* (Blanchard) (Hymenoptera: Apidae): an orchid bee apparently sensitive to size reduction in forest patches, Neotrop. Entomol. 38, 610-615.

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

Kevan, P. G., Phillips, T. P. (2001) The economic impacts of pollinator declines: an approach to assessing the consequences, Conserv. Ecol. 5, 8, [on line] <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art8> (accessed on 15 January 2007).

López-Urbe, M. M., Almanza. A. T., Ordonez, M. (2007) Diploid male frequencies in Colombian populations of euglossine bees, Biotropica 39, 660-662.

Milet-Pinheiro, P., Schindwein, C. (2005) Do euglossine males (Apidae, Euglossini) leave tropical rainforest to collect fragrances in sugarcane monocultures?, Rev. Bras. Zool. 22, 853–858.

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

Morato, E. F. (1994) Abundância e riqueza de machos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em mata de terra firme e áreas de derrubada, nas vizinhanças de Manaus (Brasil), Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Ser. Zool. 10, 95-105.

Morellato, L. P. C., Haddad, C.F.B. (2000) Introduction: The Brazilian Atlantic Forest, Biotropica 32, 786-792.

Neff, J. L., Simpson, B. B. Bees, (1993) Pollination systems and plant diversity. In: Lasalle, J., Gauld, I.D. (eds.) Hymen. Biod. 143-147. Wallingford: C-A-B International.

Nemésio, A. (2009) Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of the Brazilian Atlantic Forest, Zootaxa 2041, 1-142.

Nemésio, A., Silveira, F. A. (2007) Orchid bee fauna (Hymenoptera: Apidae: Euglossina) of Atlantic Forest fragments inside an urban area in southeastern Brazil, *Neotrop. Entomol.* 36, 186-191.

Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, M. L. C. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellite, *Genet. Mol. Biol.* 29, 294-307.

Owen, R. E., Packer, L. (1994) Estimation of the proportion of diploid males in populations of Hymenoptera, *Heredity* 72, 219-227.

Packer, L., Owen, R. (2001) Population genetic aspects of pollinator decline. *Conserv. Ecol.* 5, 4.[on line] <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art4>. (accessed on 23 May 2007).

Pamilo, P., Varvio-Aho, S.-L., Pekkarinen, A. (1978) Low enzyme gene variability in Hymenoptera as a consequence of haplodiploidy, *Hereditas* 88, 93-99.

Powell, A. H., Powell, G. N. N. (1987) Population dynamics of male euglossine bees in Amazonian forest fragments, *Biotropica* 19, 176-179.

Primack, R. B., Rodrigues, E. (2001) *Biologia da conservação*, Londrina: Ed. Planta. P. pp. 99-104.

Pritchard, J. K., Wen, X., Falush, D. (2007) Documentation for structure software: Version 2.2. Software [on line] <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software>. 2007. (accessed on 22 April 2009).

Raw, A. (1989) The dispersal of euglossine bees between isolated patches of eastern Brazilian wet forest (Hymenoptera, Apidae), *Rev. Bras. Entomol.* 33, 103-107.

Rebêlo, J. M. M., Garófalo, C.A. (1991) Diversidade e sazonalidade de machos de Euglossini (Hymenoptera, Apidae) e preferências por iscas-odores em um fragmento de floresta no sudeste do Brasil, *Rev. Bras. Biol.* 51, 787-799.

Rebêlo, J. M. M., Silva, F. S. (1999) Distribuição das abelhas Euglossini (Hymenoptera: Apidae) no Estado do Maranhão, Brasil, *An. Soc. Entomol. Bras.* 28, 389-401.

Reed, D. H., Frankham, R. (2003) Correlation between fitness and genetic diversity, *Conserv. Biol.* 17, 230-237.

Roubik, D. W. (2004) Sibling species among *Glossura* and *Glossuropoda* in the Amazon region (Hymenoptera; Apidae: Euglossini) J. Kans. Entomol. Soc. 77, 235-253.

Roubik, D. W., Weight, L. A., Bonilla, M. A. (1996) Population genetics, diploidmales, and limits to social evolution of euglossine bees, Evolution 50, 931-935.

Santos, A. M., Sofia, S. H. (2002) Horário de atividade de machos de Euglossinae (Hymenoptera, Apidae) em um fragmento de floresta semidecídua no norte do estado do Paraná, Acta Scientiarum 24, 375-381.

Shoemaker, D. D., Costa, J. T. III., Ross, K. G. (1992) Estimates of heterozygosity in two social insects using a large number of electrophoretic markers, Heredity 69, 573-582.

Sofia, S. H., Paula, F. M., Santos, A. M., Almeida, F. S., Sodré, L. M. K. (2005) Genetic structure analyses of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae) populations from southern Brazilian Atlantic rainforest remnants, Genet. Mol. Biol. 28. 479-484.

Sofia, S. H., Santos, A. M., Silva, C. R. M. (2004) Euglossine bees (Hymenoptera, Apidae) in a remnant of Atlantic Forest in Paraná State, Brazil, Iheringia 94, 217-222.

Sofia, S. H., Suzuki, K. M. (2004) Comunidades de machos de abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em fragmentos florestais no sul do Brasil, Neotrop. Entomol. 33, 693-702.

Sork, V. L., Campbell, D., Dyer, R., Fernandez, J., Nason, J., Petit, R., Smouse, P., Steinberg, E. (1998) Current approaches: gene flow on ecological time scales (Summary of workshop discussions). In: Proceedings from a workshop on gene flow in fragmented, managed, and continuous populations. University of California, USA, pp. 5-9.

Souza, R. O., Cervini, M., Del Lama, M. A., Paxton, R. J. (2007) Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera, Apidae), Mol. Ecol. Notes 7, 1352–1356

Tonhasca Jr., A., Albuquerque, A. G. S., Blackmer, J. L. (2003) Dispersal of euglossine bees between fragments of the Brazilian Atlantic Forest, J. Trop. Ecol. 19, 990-102.

Torezan, J. M. Nota sobre a vegeta o da bacia do rio Tibagi. In: Medri, M. E. Bianchini, E., Shibatta O.A., Pimenta J.A (eds.). A Bacia do rio Tibagi. Edi o dos Editores. Londrina, pp. 103-107.

Unruh, T. R., Messing, R. H. (1993) Intraspecific biodiversity in Hymenoptera: Implications for conservation and biological control. In: Lasalle, J.; Gauld, I. D. (eds.) Hymenoptera and Biodiversity 27-52. Wallingford: C-A-B International.

Wright, S. (1951) The genetical structure of populations, *Ann. Eugen.* 15, 323-354.

Wright S (1978) *Evolution and the genetics of populations. v.4. Variability within and among natural populations.* University of Chicago Press, USA.

Zayed, A., Packer, L. (2001) High levels of diploid male production in a primitively eusocial bee (Hymenoptera: Halictidae). *Heredity* 87, 631–636.

Zayed, A., Roubik, D. W., Packer, L. (2004) Use of diploid male frequency data as an indicator of pollinator decline, *Proc. R. Soc. Lond. B.* 271, 9–12.

Zimmerman, J. K., Madrinan, S. R. (1988) Age structure of male *Euglossa imperialis* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) at nectar and chemical sources in Panama, *J. Trop. Ecol.* 4, 303-306.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- Os marcadores microssatélites mostraram-se eficientes para o estudo de estrutura genética das duas espécies de Euglossini analisadas, indicando a ocorrência de variação genética nas regiões microssatélite do genoma;
- Os seis locos de microssatélite analisados mostraram-se polimórficos para ambas as espécies estudadas;
- Os marcadores moleculares utilizados revelaram machos diplóides de *E. pleosticta* e *E. fimbriata*, bem como a ocorrência destes em baixas frequências nas populações estudadas;
- O efeito da fragmentação da Mata Atlântica no norte do Paraná, por meio dos marcadores microssatélites, indica restrição de fluxo gênico entre as amostras estudadas de cada espécie, com a formação de três populações distintas, resultantes de possíveis efeitos de deriva genética e/ou endogamia;

REFÊRENCIAS

- ACKERMAN, J. D. Specificity and mutual dependency of the orchid-euglossine bee interaction. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.20, p.301-314. 1983.
- AGUIAR, W. M.; GAGLIANONE, M. C. Comunidades de abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em remanescentes de Mata Estacional Semidecidual sobre o Tabuleiro no Estado do Rio de Janeiro. **Neotropical Entomology**, v.37, p.118-125. 2008.
- ALVARENGA, P. E.; FREITAS, R. F.; AUGUSTO, S. C. Diversidade de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em áreas de Cerrado do Triângulo Mineiro, MG. **Bioscience Journal (UFU)**, v.23, p.30-37, 2007.
- ARMBRUSTER, W. S. Within-habitat heterogeneity in baiting samples of male euglossine bees: possible causes and implications. **Biotropica**, v.25, p.122-128. 1993.
- ANJOS-DA-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.
- ANTONINI, Y. *et. al.* In: RAMBALDI, D. M.; OLIVEIRA, D. A. S. de. (eds). **Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a Biodiversidade e recomendações de políticas públicas**. Brasília: MMA/SBF. 2003. 324p.
- AUGUSTO, S. C.; GARÓFALO, C. A. Nesting biology and social structure of *Euglossa (Euglossa) townsendi* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). **Insects Sociaux**, v.51, p.400-409. 2004.
- AUGUSTO, S. C.; GARÓFALO, C. A. Nidificação de *Euglossa (Euglossa) melanostricha* Moure (Hymenoptera: Apidae) no solo do cerrado. **Neotropical Entomology**, v.36, p.153-156, 2007.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. 2a. ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. 2004.
- BAWA, K. S. Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v.21, p.399-422. 1990.
- BERKELHAMER, R. C. Intraspecific genetic variation and haplodiploidy, eusociality, and polygyny in the Hymenoptera. **Evolution**, v.37, p.540-545. 1983.

BROSI, B. J. The effects of forest fragmentation on Euglossini bee communities (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Biological Conservation**, v.142, p.414-423, 2009. CAMERON, S.A. Phylogeny and biology of neotropical orchid bees (Euglossini). **Annual Review of Entomology**, v.49, p.377-404. 2004.

CANE, J. H. Habitat fragmentation and native bees: a premature verdict? **Conservation Ecology**, v.5, p.2 (online) URL: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art3>. 2001.

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, p.1-29. 2006.

COOK, J. M. Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. **Heredity**, v.71, p.421-435. 1993.

COOK, J. M.; CROZIER, R. H. Sex determination and population biology of the Hymenoptera. **Trends in Ecology and Evolution**, v.10, p.281-286. 1995.

COWAN, D. P.; STAHLHUT, J. K. Functionally reproductive diploid and haploid males in an inbreeding hymenopteran with complementary sex determination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, p.10374-10379. 2004.

CROZIER, R. H. Evolutionary genetics of the Hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, v.22, p.263-288. 1977.

DODSON, C. H. *et al.* Biologically active compounds in orchid fragrances. **Science**, v.164, p.1243-1249. 1969.

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

ELTZ, T.; SAGER, A.; LUNAU, K. Juggling with volatiles: exposure of perfumes by displaying male orchid bees. **Journal of Comparative Physiology A**, v.191, p. 575-581. 2005.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p.2611-2620. 2005.

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.; LAVAL, G.; SCHENEIDER, S. 2006. **Arlequin ver 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis**. Computer software distributed by authors. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>. Downloaded 26 jan 2006.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Reviews of Ecology and Systematics**, v.34, p.487-515. 2003.

FERGUNSON, A.; TAGGART, J. B.; PRODOHL, P. A., MCMEEL, O.; THOMPSON, C.; STONE, C.; MCGINNITY, P.; HYNES, R. A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with especial reference to *Salmo*. **Journal of Fish Biology**, v.47, p.103-126. 1995.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**, 3. ed. Brasília: Ed. EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

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

GALINDO-LEAL, C. *et al.* 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, 2005, p.12-23.

GIANGARELLI, D. C. *et al.* *Eufriesea violacea* (Blanchard) (Hymenoptera: Apidae): an orchid bee apparently sensitive to size reduction in forest patches. **Neotropical Entomology**, v.38, p.610-615. 2009.

HASSELMANN, M. *et al.* Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. **Nature**, v.454, p.519-523. 2008.

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

KEVAN, P. G.; PHILLIPS, T. P. The economic impacts of pollinator declines: an approach to assessing the consequences. **Conservation Ecology**. v5, article 8. <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art8>. 2001.

LÓPEZ-URIBE, M. M.; ALMANZA, A. T.; ORDONEZ, M. Diploid male frequencies in Colombian populations of euglossine bees. **Biotropica**, v.39, p.660-662. 2007.

LASALLE, J.; GAULD, I.D. (eds.) **Hymenoptera and biodiversity**. Wallingford: C-A-B International. 1993.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics: design, analysis, and application**. Malden: Blackwell Publishing. 2004.

LYNCH M.; MILLIGAN B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, v.3, p.91-99. 1994.

MELO, G. A. R.; MARTINS, A. C.; GONÇALVES, R. B. Alterações de longo prazo na estrutura de assembléias de abelhas: conhecimento atual e perspectivas. In: **Anais do VII Encontro Sobre Abelhas**, Ribeirão Preto. 2006. p.150-155.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 2000.

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

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

MINCKLEY, R. L.; REYES, S. G. Capture of the orchid bee, *Eulaema polychroma* (Friese) (Apidae: Euglossini) in Arizona, with notes on northern distributions of other Mesoamerican bees. **Journal of Kansas Entomological Society**, v.69, p.102-104. 1996.

MORATO, E. F. Abundância e riqueza de machos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em mata de terra firme e áreas de derrubada, nas vizinhanças de Manaus (Brasil). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Zoologia**, v.10, n.1. p.95-105. 1994.

MORATO, E. F.; CAMPOS, L. A. O.; MOURE, J. S. Abelhas Euglossini (Hymenoptera, Apidae) coletadas na Amazônia Central. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.36, p.767-771. 1992.

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

MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858. 2000.

NEFF, J. L.; SIMPSON, B. B. Bees, pollination systems and plant diversity. In: LASALLE, J.; GAULD, I. D. (eds.) **Hymenoptera and Biodiversity**, pp.143-147. Wallingford: C-A-B International. 1993.

NEMÉSIO, A. Three new species of *Euglossa* Latreille (Hymenoptera: Apidae) from Brazil. **Zootaxa**, v.1547, p.21-31. 2007.

NEMÉSIO, A. Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of the Brazilian Atlantic Forest. **Zootaxa**, v.2041, p.1-142. 2009.

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

NEMÉSIO, A.; SILVEIRA, F. A. Orchid bee fauna (Hymenoptera: Apidae: Euglossina) of Atlantic Forest fragments inside an urban area in southeastern Brazil. **Neotropical Entomology**, v.36, p.186-191. 2007b.

NEVES, E. L.; VIANA, B. F. Comunidade de machos de Euglossinae (Hymenoptera: Apidae) das matas ciliares da margem esquerda do médio Rio São Francisco, Bahia. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, p.201-210. 1999.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellite. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.294-307. 2006.

O'TOOLE, C.; RAW, A. **Bees of the world**. London: Bradford. 1999.

OWEN, R. E.; PACKER, L. Estimation of the proportion of diploid males in populations of Hymenoptera. **Heredity**, v.72, p.219-227. 1994.

PACKER, L.; OWEN, R. Population genetic aspects of pollinator decline. **Conservation Ecology**, v.5, article 4. <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art4>. 2001.

PAMILO, P.; VARVIO-AHO, S.-L.; PEKKARINEN, A. Low enzyme gene variability in Hymenoptera as a consequence of haplodiploidy. **Hereditas**, v.88, p.93-99. 1978.

PARRA-H, A.; NATES-PARRA, G. Variación de la comunidad de abejas de las orquídeas (Hymenoptera: Apidae) en tres ambientes perturbados del piedemonte llanero colombiano. **Revista de Biología Tropical**, v.55, p.931-941. 2007.

PEARSON, D. L.; DRESSLER, R. L. Two-year study of male orchid bee (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) attraction to chemical baits in lowland south-eastern Peru. **Journal of Tropical Ecology**, v.1, p.37-54, 1985.

PEMBERTON, R. W.; WHEELER, G. S. Orchid bees don't need orchids: evidence from the naturalization of an orchid bee in Florida. **Ecology**, v.87, p.1995-2001. 2006.

PÉREZ-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**, pp. 343-366. Curitiba: Editora da UFPR. 2004.

PERUQUETTI, R. C.; CAMPOS, L. A. O. Aspectos da biologia de *Eufriesea violacea* (Blanchard) (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.14, p.91-97. 1997.

PERUQUETTI, R. C. *et al.* Abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância, riqueza e aspectos biológicos. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, p.101-118. 1999.

PLEASANTS, J. M. Structure of plant and pollinator communities. In: JONERS, C.E; LITTLE, R.J. **Handbook of experimental pollination biology**, New York: Van Nostrand Reinhold Company Inc., 1983, p.375-395.

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

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**, Londrina: Ed. Planta. P. 99-104, 2001.

PRITCHARD, J. K.; WEN, X.; FALUSH, D. **Documentation for structure software: Version 2.2**. Software de: <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software>. 2007.

RAYMOND, M. L.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, v.49, p.1280- 1283, 1995.

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

REBÊLO J. M. M. **História natural das euglossíneas – as abelhas das orquídeas**, São Luís: Lithograf, 2001.

REBÊLO, J. M. M., GARÓFALO, C. A. Diversidade e sazonalidade de machos de Euglossini (Hymenoptera, Apidae) e preferências por iscas-odores em um fragmento de floresta no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v.51, p.787-799. 1991.

REBÊLO, J. M. M.; SILVA, F. S. Distribuição das abelhas Euglossini (Hymenoptera: Apidae) no Estado do Maranhão, Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, p.389-401. 1999.

REED D. H., FRANKHAM R. Correlation between fitness and genetic diversity. **Conservation Biology**, v.17, p.230-237. 2003.

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.

ROUBIK, D. W. 2001. Ups and downs in pollinator populations: When is there a decline? **Conservation Ecology**, v.5: 2. URL: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art2>.

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

ROUBIK, D. W.; HANSON, P. E. **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, 2004.

ROUBIK, D. W., WEIGHT, L. A.; BONILLA, M. A. Population genetics, diploidmales, and limits to social evolution of euglossine bees. **Evolution**, v.50, p.931-935. 1996.

SANTOS, A. M., SOFIA, S. H. Horário de atividade de machos de Euglossinae (Hymenoptera, Apidae) em um fragmento de floresta semidecídua no norte do estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, v.24, p.375-381. 2002.

SCHLINDWEIN, C. A importância de abelhas especializadas na polinização de plantas nativas e conservação do meio ambiente. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 4., 2000, Ribeirão Preto. **Anais do Encontro Sobre Abelhas**, Ribeirão Preto: Edusp, 2000. p.131-141.

SHOEMAKER, D. D; COSTA, J. T. III; ROSS, K. G. Estimates of heterozygosity in two social insects using a large number of electrophoretic markers. **Heredity**, v.69, p.573-582. 1992.

SILVA, P. N. Documento sobre o Plano de Ação para a Iniciativa Internacional dos Polinizadores, produzido pela Conferência das Partes 6 da Convenção da Diversidade Biológica, realizada em 2002 em Haya – A Iniciativa dos Polinizadores. Disponível em: http://www.webbee.org.br/bpi/pdfs/cop_6_port.pdf. 2002.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras – sistemática e identificação**. Belo Horizonte: MMA e Fundação Araucária, 2002. 253p.

SOARES, F.S.; MEDRI, M.E. In: MEDRI, M. E. *et al.* (eds.) **A Bacia do rio Tibagi**, pp. 69-79. Londrina: Edição dos Editores. 2002.

SOFIA, S. H. *et al.* Genetic structure analyses of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae) populations from southern Brazilian Atlantic rainforest remnants. **Genetics and Molecular Biology**, v.28. p.479-484. 2005.

SOFIA, S. H.; SANTOS, A. M.; SILVA, C. R. M. Euglossine bees (Hymenoptera, Apidae) in a remnant of Atlantic Forest in Paraná State, Brazil. **Iheringia**, Porto Alegre, v.94, p.217-222. 2004.

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.

SOS Mata Atlântica. 2008. Atlas dos remanescentes florestais de Mata Atlântica período 2000-2005. Fundação SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais e Instituto Sócio-ambiental, São Paulo, Brasil. Disponível em: <http://www.sosmatatlantica.org.br>.

SORK, V. L.; CAMPBELL, D.; DYER, R.; FERNANDEZ, J.; NASON, J.; PETIT, R.; SMOUSE, P.; STEINBERG, E. Current approaches: gene flow on ecological time scales (Summary of workshop discussions). In: **Proceedings from a workshop on gene flow in fragmented, managed, and continuous populations**. University of California, USA, pp. 5-9. 2003.

SOUCY, S. L.; GIRAY, T.; ROUBIK, D. W. Solitary and group nesting in the orchid bee *Euglossa hyacinthine* (Hymenoptera, Apidae). **Insects Sociaux**, v.50, p.248-255.

SOUZA, R. O.; CERVINI, M.; DEL LAMA, M. A.; PAXTON, R. J. Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera, Apidae). **Molecular Ecology Notes**, v.7, p.1352-1356. 2007.

TABARELLI, M.; AGUIAR, A. V.; RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; PERES, C. A. Prospects for biodiversity conservation in the Atlantic Forest: Lessons from aging human-modified landscapes. **Biological Conservation**, doi:10.1016/j.biocon.2010.02.005. 2010.

TAKAHASHI, N. C.; PERUQUETTI, R. C.; DEL LAMA, M. A.; CAMPOS, L. A. O. A reanalysis of diploid male frequencies in euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). **Evolution**, v.55, p.1897-1899. 2001.

TSCHARNTKE, T.; BRANDL, R. Plant–insect interactions in fragmented landscapes. **Annual Review of Entomology**, v.49, p.405–430. 2004.

TONHASCA JR, A. **Ecologia e História Natural da Mata Atlântica**. 2006. Rio de Janeiro: Ed. Interciência.

TONHASCA JR, A.; ALBUQUERQUE A. G. S.; BLACKMER J. L. Dispersal of euglossine bees between fragments of the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Tropical Ecology** 19:990-102. 2003

TOREZAN, J. M. Nota sobre a vegetação da bacia do rio Tibagi. In: MEDRI *et al.* (eds.). **A Bacia do rio Tibagi**, pp.103-107. Londrina: Edição dos Editores. 2002. TOREZAN, J.M. (org.). **Ecologia do Parque Estadual Mata dos Godoy**. Londrina: Itedes. 2005.

UNRUH, T. R.; MESSING, R. H. Intraspecific biodiversity in Hymenoptera: Implications for conservation and biological control. In: LASALLE, J.; GAULD, I.D. (eds.) **Hymenoptera and Biodiversity**, pp. 27-52. Wallingford: C-A-B International. 1993.

WALDSCHMIDT, A. M. *et al.* Genetic of Euglossini bees (Hymenoptera) in fragments of the Atlantic forest in the region of Viçosa, MG. **Brazilian Journal of Biology**, v.65, p.541-549. 2005.

WHITELEY, A. R.; SPRUELL, P.; ALLENDORF, F. W. Ecological and life history characteristics predict population genetic divergence of two salmonids in the same. **Molecular Ecology**, v.13, p. 3675-3688. 2004.

WILLIAMS, N. H.; DODSON, C. H. Selective attraction of male euglossine bees to orchid floral fragrances and its importance in long-distance pollen flow. **Evolution**, v.26, p.84-95, 1972.

WILSON, E. O. **The insect societies**. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA. 1971. 548p.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Ann Eugenics** 15:323-354,1951.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations. v.4. variability within and among natural populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978.

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

ZAYED, A. Effective population size in Hymenoptera with complementary sex determination. **Heredity**, v.93, p.627-630. 2004.

ZAYED, A.; PACKER, L. High levels of diploid male production in a primitively eusocial bee (Hymenoptera: Halictidae). **Heredity**, v.87, p.631-636. 2001.

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

ZAYED, A.; ROUBIK, D. W.; PACKER, L. Use of diploid male frequency data as an indicator of pollinator decline. **Proceedings of the Royal Society B**, v.271, p.S9-S12. 2004.

ZIMMERMAN, J. K.; MADRINAN, S. R. Age structure of male *Euglossa imperialis* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) at nectar and chemical sources in Panama. **Journal of Tropical Ecology**, v.4, p.303-306. 1988.

ZUCCHI, R.; CAMARGO, J. M. F.; SAKAGAMI, S. F. Biological observations on a Neotropical bee, *Eulaema nigrita*, with a review on the biology of Euglossinae (Hymenoptera: Apoidea) - A comparative study. **Journal of Faculty Science Hokkaido University, Zoology**, v.17, p.271-380. 1969.

ANEXOS

ANEXO A – Tabela com frequências dos alelos de microssatélites encontrados nas amostras de machos de *Euglossa pleosticta* dos cinco fragmentos florestais estudados (D, G, P, 2C e AT) e seus respectivos. Tamanhos das amostras (N) são apresentados entre parênteses. pb = tamanho estimado em pares de bases do alelo observado.

FRAGMENTOS FLORESTAIS (<i>E. pleosticta</i>)							
Loco	pb	D	G	P	2C	AT	H
Alelo		[170 ha]	[580 ha]	[14, 6 ha]	[180 ha]	[66 ha]	[13,4 ha]
Egc 17		(74)	(45)	(20)	(55)	(24)	(51)
1	212	0,0270	–	–	–	–	–
2	213	0,0270	–	–	–	–	–
3	214	0,0541	–	–	–	–	–
4	215	0,0270	–	–	–	0,0417	–
5	216	0,0270	–	–	–	–	–
6	217	0,0676	–	–	–	–	–
7	218	0,0405	–	–	0,0182	–	–
8	219	0,0676	–	–	–	–	–
9	220	0,0405	–	–	0,0182	–	–
10	221	0,0405	–	–	–	–	–
11	222	0,0676	–	–	–	–	–
12	223	0,0135	–	–	–	–	0,0392
13	224	0,0541	–	–	–	–	–
14	225	0,0135	–	–	0,0364	0,0417	0,0392
15	226	0,0541	0,0222	–	0,1455	0,1667	0,0588
16	227	0,0135	0,1111	0,1000	0,0182	0,0417	–
17	228	0,0811	–	–	0,0364	–	–
18	229	0,0405	–	–	0,0182	–	–
19	230	–	0,0222	0,2000	0,1455	0,1667	–
20	231	0,0135	0,0222	–	–	–	–
21	232	0,0676	0,0444	–	–	0,0417	0,0196
22	233	0,0270	0,0667	0,2000	0,1636	0,0833	–
23	234	0,0541	0,0444	–	0,0182	0,1250	–
24	235	–	0,0889	0,1000	–	0,0417	0,0980
25	236	0,0270	0,0889	–	0,0364	–	0,1176
26	237	0,0135	0,0889	–	–	0,0417	0,0784
27	239	0,0135	0,0667	–	–	–	–
28	240	–	0,0444	0,1000	0,1636	0,0417	0,0588
29	242	0,0135	0,0222	–	–	–	0,0588
30	243	–	0,0222	0,1500	0,1091	0,0833	0,0588
31	244	–	0,0222	–	0,0182	–	0,0196
32	245	0,0135	–	0,1000	–	0,0417	0,0392
33	246	–	0,0444	–	0,0182	–	0,0784
34	247	–	0,0222	0,05	–	–	0,0392
35	249	–	0,0444	–	–	–	–
36	250	–	0,0222	–	0,0182	–	0,0196
37	252	–	0,0222	–	–	–	0,0392

Continuação (ANEXO A)

FRAGMENTOS FLORESTAIS (<i>E. pleosticta</i>)							
Loco Alelo	pb	D [170 ha]	G [580 ha]	P [14, 6 ha]	2C [180 ha]	AT [66 ha]	H [13,4 ha]
38	253	-	0,0444	-	-	-	0,0392
39	256	-	0,0222	-	-	0,0417	0,0784
Egc18		(74)	(45)	(20)	(55)	(24)	(51)
1	164	0,0270	-	-	-	-	-
2	165	-	-	0,0500	-	-	-
3	166	0,0405	-	-	-	-	0,0196
4	167	0,0135	0,0222	-	0,0909	-	0,0392
5	168	-	0,1556	-	-	-	-
6	169	0,0135	-	-	-	0,0833	-
7	170	-	-	-	0,0545	0,1250	0,0588
8	172	0,0405	-	-	-	-	-
9	173	0,0135	0,0444	-	-	-	0,0392
10	175	-	0,0222	-	-	-	-
11	185	-	0,0222	-	-	-	0,0392
12	187	0,0541	-	-	-	-	-
13	189	0,1622	-	-	-	-	-
14	190	0,0946	-	-	0,0182	-	-
15	191	0,0270	-	-	-	-	-
16	192	0,0946	-	0,0500	0,0727	-	-
17	193	0,0676	0,0889	0,2000	0,1273	0,1250	-
18	194	0,0405	-	0,1500	0,2909	0,3333	0,1373
19	195	-	0,1111	0,1000	0,0182	0,0833	-
20	196	0,0135	0,1556	0,0500	0,1636	-	0,0196
21	197	0,0676	0,0667	-	0,0364	-	0,0980
22	198	0,0676	0,0444	-	-	0,0417	0,1176
23	199	0,0270	-	-	-	-	-
24	200	-	0,1556	0,0500	0,0182	0,0417	0,0392
25	202	0,0541	0,0222	-	-	-	0,0784
26	203	0,0135	-	0,0500	0,0182	-	-
27	204	0,0135	0,0222	-	-	-	0,0588
28	205	0,0270	0,0222	-	-	0,1250	-
29	206	-	0,0222	-	0,0182	-	0,0588
30	208	-	-	0,2500	0,0364	0,0417	0,0196
31	211	-	-	-	0,0182	-	0,0588
32	212	-	-	0,0500	-	-	0,0196
33	213	-	-	-	0,0182	-	-
34	214	-	0,0222	-	-	-	0,0392
35	215	0,0270	-	-	-	-	0,0392

Continuação (ANEXO A)

FRAGMENTOS FLORESTAIS (<i>E. pleosticta</i>)							
Loco	pb	D	G	P	2C	AT	H
Alelo		[170 ha]	[580 ha]	[14, 6 ha]	[180 ha]	[66 ha]	[13,4 ha]
Egc24		(74)	(45)	(20)	(55)	(24)	(51)
1	188	0,0135	-	-	-	-	-
2	195	0,0405	-	0,1000	-	-	-
3	196	0,0946	-	-	-	-	-
4	197	0,1486	-	-	-	-	-
5	198	0,1757	-	-	-	-	-
6	199	0,0135	-	-	-	-	-
7	200	0,1622	-	-	-	-	-
8	201	0,0270	-	-	-	-	-
9	202	0,0811	-	-	-	-	-
10	203	0,0676	-	-	0,018182	-	-
11	204	0,0541	1	0,9	0,981818	1	1
12	205	0,0270	-	-	-	-	-
13	206	0,0676	-	-	-	-	-
14	207	0,0135	-	-	-	-	-
Egc 26		(74)	(45)	(20)	(55)	(24)	(51)
1	168	0,0676	-	-	-	-	0,0784
2	170	0,2297	-	0,0500	0,0500	-	-
3	172	0,0676	0,0222	0,0500	0,0500	-	0,0196
4	173	0,1622	-	-	-	-	0,0196
5	174	0,2838	0,8222	0,6500	0,6500	0,9167	0,7451
6	175	0,0541	0,0889	-	-	0,0417	0,0196
7	176	0,0811	-	0,3500	0,1000	0,0417	0,0784
8	177	0,0135	0,0222	-	-	-	0,0196
9	178	0,0405	0,0222	-	-	-	-
10	179	-	-	0,0500	0,0500	-	-
11	180	0,0135	0,0222	0,1000	0,1000	-	0,0196
Egc35		(74)	(45)	(20)	(55)	(24)	(51)
1	160	0,0135	-	-	-	-	-
2	165	0,0135	-	-	0,0182	-	-
3	168	0,0135	-	-	-	-	-
4	169	-	-	-	0,0182	-	-
5	170	-	-	0,0500	0,0727	-	-
6	172	0,0270	-	-	-	-	-
7	173	0,0676	0,0444	-	0,0182	-	0,1765
8	174	0,5811	0,8444	0,7500	0,6909	0,8750	0,3922
9	175	-	-	-	0,0727	0,0417	0,0784
10	176	0,2297	0,1111	0,1500	-	0,0833	0,0588
11	177	0,0135	-	-	0,1091	-	0,2353

Continuação (ANEXO A)

FRAGMENTOS FLORESTAIS (<i>E. pleosticta</i>)							
Loco Alelo	pb	D [170 ha]	G [580 ha]	P [14, 6 ha]	2C [180 ha]	AT [66 ha]	H [13,4 ha]
Egc35 (cont.)		(74)	(45)	(20)	(55)	(24)	(51)
12	178	0,0541	-	-	-	-	0,0196
13	179	0,0135	-	-	-	-	0,0392
14	180	-	-	0,0500	0,0182	-	-
Egc 51		(74)	(45)	(20)	(55)	(24)	(51)
1	198	-	0,177778	-	-	-	-
2	203	-	-	-	-	0,041667	-
3	205	-	-	-	-	0,083333	-
4	209	0,040541	-	-	-	0,166667	-
5	210	0,094595	-	-	-	0,166667	-
6	212	0,094595	-	0,1	-	-	-
7	213	0,081081	-	-	-	0,041667	-
8	214	0,121622	-	0,6	-	0,25	0,0196
9	215	0,391892	-	0,1	0,036364	0,25	0,0196
10	216	0,081081	-	0,2	0,2	-	-
11	217	0,081081	-	-	0,018182	-	0,1176
12	218	-	-	-	0,672727	0,041667	0,2549
13	220	-	0,688889	-	0,072727	-	0,3333
14	222	-	0,111111	-	-	-	0,0980
15	223	0,013514	0,022222	-	-	-	0,1176

ANEXO B – Tabela com as frequências dos alelos de microssatélites encontrados nas amostras de machos de *Euglossa fimbriata* dos cinco fragmentos florestais estudados (D, G, P, 2C e AT) e seus respectivos. Tamanhos das amostras (N) são apresentados entre parênteses. pb = tamanho estimado em pares de bases do alelo observado

FRAGMENTOS FLORESTAIS (<i>E. fimbriata</i>)						
Loco	pb	D	G	P	2C	AT
Alelo		[170 ha]	[580 ha]	[14, 6 ha]	[180 ha]	[66 ha]
Egc 17		(77)	(70)	(23)	(24)	(18)
1	182	0,0130	–	–	–	–
2	202	0,0130	–	–	–	–
3	204	0,0130	–	–	–	–
4	205	0,0130	–	–	–	–
5	206	0,0130	–	–	–	–
6	207	0,0260	–	–	–	–
7	208	0,0260	–	–	–	–
8	209	0,0260	–	–	0,0417	–
9	210	0,0130	0,0143	–	–	–
10	212	0,0130	–	–	–	–
11	213	0,0779	–	–	–	–
12	214	0,0649	–	–	–	–
13	215	0,0260	0,0429	–	–	–
14	216	0,0260	0,0286	–	–	0,0556
15	217	0,0130	–	0,0435	–	–
16	218	0,0390	–	0,0435	–	–
17	219	0,0130	0,0429	–	–	–
18	220	0,0130	0,0571	0,0435	0,0417	0,1111
19	222	0,0260	0,1000	0,1304	0,0417	0,0556
20	223	0,1169	0,0714	0,1739	0,0833	0,1111
21	224	–	0,0857	0,2174	0,4167	0,1111
22	225	0,0519	0,1000	0,1304	0,0833	0,0556
23	226	0,0390	0,1143	–	0,1667	0,0556
24	227	0,1688	0,0571	0,0435	0,0417	–
25	228	0,0519	0,0429	–	0,0417	–
26	229	–	0,0143	–	–	–
27	230	0,0649	0,0429	0,0870	–	0,1111
28	232	–	–	0,0435	–	0,0556
29	233	–	0,0286	–	0,0417	0,0556
30	234	–	0,0714	–	–	0,1111
31	235	0,0130	0,0143	–	–	–
32	236	–	0,0143	0,0435	–	0,1111
33	237	0,0130	0,0286	–	–	–
34	Co240	–	0,0143	–	–	–
35	245	0,0130	–	–	–	–
36	247	0,0130	–	–	–	–

Continuação (ANEXO B)

FRAGMENTOS FLORESTAIS (<i>E. fimbriata</i>)						
Loco	Pb	D	G	P	2C	AT
Alelo		[170 ha]	[580 ha]	[14, 6 ha]	[180 ha]	[66 ha]
Egc 18		(77)	(70)	(23)	(24)	(18)
1	175	—	—	0,0435	—	—
2	178	—	0,0143	—	—	—
3	180	—	—	0,0435	—	—
4	182	0,0130	0,0286	0,0435	0,0417	—
5	184	—	0,0143	0,0435	0,0417	0,0556
6	185	0,0260	0,0429	—	0,0833	0,0556
7	186	—	—	0,0435	0,0833	—
8	187	—	0,0429	0,0435	0,1667	—
9	188	—	0,0286	—	—	—
10	189	—	0,0286	0,0870	0,0833	0,1111
11	190	0,0779	—	0,0870	—	0,1667
12	191	—	0,0143	—	—	—
13	192	0,0390	0,2143	0,0435	0,0417	0,1111
14	193	0,0390	0,1429	0,0870	0,1667	0,0556
15	194	0,0779	0,1143	—	—	0,2222
16	195	0,2857	0,0429	0,0870	0,0417	0,1111
17	196	0,0260	0,1714	—	0,0833	0,1111
18	197	0,0649	—	0,0870	0,0833	—
19	198	0,0260	0,0429	0,0435	—	—
20	199	0,0130	—	—	—	—
21	200	0,0260	0,0286	0,0435	—	—
22	202	0,1429	—	—	0,0417	—
23	203	0,0390	—	—	—	—
24	204	0,0130	—	0,0435	—	—
25	205	0,0130	—	—	—	—
26	206	0,0130	—	—	0,0417	—
27	207	0,0260	—	—	—	—
28	210	0,0390	—	—	—	—
Egc 24						
1	196	0,0130	—	—	—	—
2	197	—	0,0143	—	—	—
3	200	0,0130	—	—	—	—
4	203	0,0649	0,0857	—	—	0,0556
5	204	0,0390	0,0429	0,2174	0,0833	—
6	205	0,0779	0,5571	—	—	0,3889
7	206	0,4545	0,0714	0,7826	0,8333	0,3889
8	207	0,1169	0,1286	—	—	—
9	208	—	—	—	0,0417	0,0556
10	209	0,0130	0,0714	—	—	0,1111

Continuação (ANEXO B)

FRAGMENTOS FLORESTAIS (<i>E. fimbriata</i>)						
Loco Alelo	PB	D [170 ha]	G [580 ha]	P [14, 6 ha]	2C [180 ha]	AT [66 ha]
11	210	–	–	–	0,0417	–
12	211	0,0779	0,0143	–	–	–
13	212	0,1299	0,0143	–	–	–
Egc 26						
1	160	0,0130	–	–	–	–
2	162	–	0,0143	–	–	–
3	163	0,0130	–	–	–	–
4	164	0,1299	0,1000	–	–	–
5	165	0,0519	0,0286	–	–	0,1111
6	167	0,4935	0,2286	–	0,1250	0,1667
7	168	0,0779	0,0857	0,1739	0,0833	0,0556
8	169	–	0,0571	0,0435	0,0833	–
9	170	0,1558	0,1286	–	0,1250	0,1667
10	172	0,0260	0,1429	0,3043	0,2500	0,1667
11	173	0,0260	0,0143	0,2174	0,1250	0,2778
12	174	–	0,0571	0,1739	0,0833	–
13	175	0,0130	0,0429	0,0870	–	–
14	176	–	0,0286	–	–	–
15	177	–	0,0286	–	0,0417	–
16	178	–	0,0429	–	–	–
17	179	–	–	–	0,0417	–
18	180	–	–	–	0,0417	0,0556
Egc 35						
1	170	0,0260	–	–	–	–
2	172	0,0779	0,0714	–	0,0833	0,0556
3	173	0,0649	0,1000	0,2174	–	0,1667
4	174	0,5844	0,6429	0,1304	–	0,3333
5	175	0,1429	0,0714	0,3913	0,0417	0,2778
6	176	0,0779	0,1143	0,2609	0,8750	0,0556
7	177	0,0260	–	–	–	0,0556
Egc 51						
1	215	0,1169	–	–	–	–
2	216	0,0909	–	–	–	–
3	217	0,1948	–	–	–	–
4	218	0,1429	–	–	–	–
5	219	–	–	0,0435	–	–
6	220	0,0909	–	–	–	–
7	221	0,0260	–	–	–	–
8	222	–	–	0,0435	–	–
9	223	0,0519	–	0,1304	–	–
10	224	0,2078	1,0000	0,6522	0,9167	1,0000
11	225	0,0779	–	0,0435	0,0417	–
12	226	–	–	0,0870	0,0417	–