



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FRANCIELLY MEDEIROS DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *EUGLOSSA PLEOSTICTA*  
(HYMENOPTERA: APIDAE) DE SETE FRAGMENTOS  
FLORESTAIS NO NORTE DO PARANÁ, SUL DO BRASIL**

---

Londrina  
2009

FRANCIELLY MEDEIROS DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *EUGLOSSA PLEOSTICTA*  
(HYMENOPTERA: APIDAE) DE SETE FRAGMENTOS  
FLORESTAIS NO NORTE DO PARANÁ, SUL DO BRASIL**

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. Sílvia Helena Sofia

Londrina  
2009

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

O48d Oliveira, Francielly Medeiros de.  
Diversidade genética de *Euglossa pleosticta* (Hymenoptera : Apidae) de sete fragmentos florestais no norte do Paraná, sul do Brasil / Francielly Medeiros de Oliveira. – Londrina, 2009.  
65f. : 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, 2009.  
Inclui bibliografia.

1. Abelha – Diversidade genética – Teses. 2. Marcadores moleculares – Teses. 3. Diversidade biológica – Conservação – 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 576.3:595.79641:577.1

FRANCIELLY MEDEIROS DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *EUGLOSSA PLEOSTICTA*  
(HYMENOPTERA: APIDAE) DE SETE FRAGMENTOS FLORESTAIS  
NO NORTE DO PARANÁ, SUL DO BRASIL**

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 – PR – Londrina – PR

---

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

---

Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 30 de março de 2009.

## **DEDICATÒRIA**

*Às cinco grandes mulheres da minha vida:  
Minha mãe, Filha, Vó, Madrinha  
e Minha Orientadora.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, à Coordenação, ao Departamento de Biologia Geral e à 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;

À profa. Dra. Claudete de Fátima Ruas e prof. Dr. Rogério Fernandes, membros da banca examinadora, pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho e pelas valiosas sugestões que foram dadas durante o 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 Sueli Miranda, Secretaria do Programa de Pós-Gradua o em Genética e Biologia Molecular.

Aos técnicos D rio e Melyssa pela ajuda permanente durante estes dois anos e ao secretário do Depto. de Biologia Geral Eduardo 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, Leandro, St phany, Bruno e Olavo - por todo o auxílio prestado.

Ao meu amigo Leandro pela amizade, carinho e cumplicidade.

Às minhas colegas Gabriele Antico Freiria e Alessandra Novaga Alves por todo o esforço concedido ao desenvolvimento deste trabalho e pelos momentos de descontração.

À profa. Dra. Gislayne Fernandes Lemes Trindade Vilas-Boas pelas valiosas 'dicas' sobre a técnica de PCR-RFLP, que em muito ajudaram na melhoria dos resultados alcançados;

Ao colega Eduardo Ruas pela disponibilidade e dicas que ajudaram a melhorar este trabalho;

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 apoio nas coletas;

Aos meus amigos do mestrado Clelton, Maikel, Luana, Daiane, Letícia, Hellen, Iara, Marquinhos, Vitor, Michele, Rafa, Vanessa, Jamili Marcela e Ju, pela amizade e toda a ajuda prestada.

À minha filhinha Alexia, que mesmo sem entender a minha ausência, me proporcionou carinho e forças para alcançar os meus objetivos.

A minha mãe Rosária, minha madrinha Dorinha e Padrinho Joaquim, pela confiança, amor, paciência e força nos momentos difíceis;

Aos meus tios Paulo e Florinda pela ajuda e carinho.

A toda a minha família: Minha Vózinha Lourdes, meus tios João, Cláudio, Dó, Ademir, Rock... Tias Neuzi, Silvia, Fia, Preta, Fátima... Primos Jean, Carlos, Rafael, Ralph Serginho... Primas Michele, Vanessa, Paola, Pâmela, Manu, Mariana, Dani e Madrinha Zilda pelo amor e carinho. À Margarethe por estar sempre ajudando a minha mãe durante a minha ausência.

Ao meu irmão que eu amo demais;

Ao meu Pai Alecio...

À Deus, Obrigada por Tudo!!!

OLIVEIRA, Francielly Medeiros, De. **Diversidade genética de *Euglossa pleosticta* (Hymenoptera: Apidae) de sete fragmentos florestais no norte do Paraná, sul do Brasil**. 2009. 65f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## RESUMO

As abelhas Euglossini apresentam distribuição intrínseca aos neotrópicos, onde são polinizadores importantes de um grande número de famílias de plantas. *Euglossa pleosticta* Dressler é uma espécie com ocorrência relatada exclusivamente para o território brasileiro, onde mostra uma ampla distribuição geográfica. Apesar de ser um constituinte importante das comunidades de Euglossini em remanescentes de Mata Atlântica no sul e sudeste do Brasil, não existem ainda estudos sobre a diversidade genética de populações de *E. pleosticta* presentes nos remanescentes deste bioma brasileiro tão severamente ameaçado. Neste estudo a diversidade genética de populações de *E. pleosticta* de sete fragmentos de florestais, localizados no estado do Paraná, foi investigada por meio de marcadores PCR-RFLP e microssatélites, obtidos a partir da análise de 157 machos desta espécie. Nas análises de PCR-RFLP, amplicons do gene 16S-(rDNA) e da região entre os genes citocromo C oxidase I e II (COI-COII) do DNAm de *E. pleosticta* foram cortados com as endonucleases *Asel*, *DraI* e *SspI*, resultando em nove haplótipos-compostos, dos quais quatro foram haplótipos exclusivos. Nas análises de microssatélites foram amplificados sete locos, resultando na identificação de 57 alelos, os quais variaram em número de seis a dez alelos por loco amplificado. A análise de variância molecular (AMOVA), aplicada aos dados mitocondriais, indicou estruturação não significativa e ausência de variação genética entre as sete amostras analisadas. Os valores estimados de divergência de nucleotídeos ( $\delta$ ), de 0,0000 a 0,0420, indicam baixa divergência de nucleotídeos entre as amostras. De modo distinto, as análises de microssatélites, revelaram uma partição significativa na variação genética entre os grupos de abelhas dos sete fragmentos florestais, com valores de  $F_{ST}$  (0,036 - 0,169) indicativos de baixa a alta diferenciação genética entre os 21 pares de amostras analisados. A falta de estruturação genética entre as amostras de *E. pleosticta*, revelada pelos marcadores mitocondriais, parece ser decorrente da maior conservação do genoma mitocondrial quando comparado às regiões de microssatélites. Os resultados sugerem que a fragmentação da Mata Atlântica na região estudada resultou na ocorrência de subpopulações de *E. pleosticta* nesta região.

**Palavras-chave:** Euglossini. *Euglossa pleosticta*. Fragmentos florestais. Microssatélites. 38 DNA mitocondrial.

OLIVEIRA, FRANCIELLY MEDEIROS, DE. **Genetic diversity of *Euglossa pleosticta* (Hymenoptera: Apidae) from seven Forest fragments in northern Paraná, southern Brazil**. 2009. 65f. Dissertation (Master's degree in Genetic and Molecular Biology). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

### ABSTRACT

The Euglossini bees show an intrinsic distribution to neotropics, where they are important pollinators of many plant families. *Euglossa pleosticta* Dressler is a euglossine bee found exclusively in Brazilian territory, where this species shows a wide geographic distribution. Despite these bees constitute an important component of the Euglossini fauna in Atlantic Forest remnants in southern and southeastern Brazil, there is no information about the genetic diversity of *E. pleosticta* populations present throughout this severely threaten Brazilian biome. In this study, the genetic diversity of *E. pleosticta* from seven forest fragments in northern Parana state was investigated using PCR-RFLP and microsatellites markers, produced by the analysis of 157 males of this species. In the PCR-RFLP analysis, amplicons of gene 16S-(rDNA) and the region between cytochrome oxidase I and II (COI COII) genes of mtDNA were cut with enzymes *Asel*, *DraI* e *SspI*, resulting in nine composite haplotypes, four of which were exclusive haplotypes. The microsatellites analysis involved the amplification of seven loci and identification of 57 alleles, which varied in number from 6 to 10 per loci. The analysis of molecular variance (AMOVA), applied to PCR-RFLP markers, showed no significant structuring of genetic variation among the seven samples analyzed. A low nucleotide divergence ( $\delta$ ), with values varying from 0.0000 to 0.0420, was also detected among these samples. In contrast, the microsatellites analysis revealed a significant partition in the genetic variation among all *E. pleosticta* samples, with values of  $F_{ST}$  (0,036 - 0,169) indicating genetic differentiation varying from low to high between pairs of samples. The absence of genetic differentiation between pairwise samples revealed by mitochondrial markers could be attributed to the higher conservation of this genome compared to microsatellites regions. The present findings suggest that the Atlantic Forest fragmentation across the studied region determined the occurrence of subpopulations of *E. pleosticta* in this region.

**Keywords:** Euglossini. *Euglossa pleosticta*. Forest fragments. Microsatellites. mtDNA.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Características dos sete fragmentos florestais estudados (A-G), incluindo tamanho em hectares (ha), localização, tipo de reserva e vegetação. São apresentados os totais de machos da espécie *E. pleosticta* coletados em cada fragmento (N) e o número de coletas em cada fragmento .....29
- Tabela 2** – Distância geográfica (km) entre os sete fragmentos florestais estudados.....29
- Tabela 3** - Padrões de fragmentos de restrição (estimado em pares de bases) observado para os segmentos das regiões de DNAm 16S e COI-COII, produzidos com as endonucleases *Asel*, *DraI* e *Sspl*, para as sete amostras de *E. pleosticta*. Letras A – D representam os haplotipos encontrados com cada enzima de restrição .....36
- Tabela 4** – Frequência e distribuição dos nove haplótipos-compostos de machos de *E. pleosticta* nos sete fragmentos florestais estudados (A-G), produzidos pela da restrição dos segmentos mitocondriais 16S e COI-COII com as endonucleases *Asel*, *DraI* e *Sspl*; e valores estimados de diversidade de haplótipos (h), e respectivos erros padrões (EP), diversidade de nucleotídeos (%) e número de indivíduos (N) .....37
- Tabela 5** – Frequências de alelos de microssatélites nas amostras de machos de *Euglossa pleosticta* dos sete fragmentos florestais estudados (A-G). Tamanhos das amostras são apresentados entre parênteses. pb = pares de bases do alelo observado. Para informações sobre as localidades consultar a Tabela 1 .....41
- Tabela 6** – Análise da Variância Molecular (AMOVA) e comparação da variância da frequência gênica ( $F_{ST}$ ), entre grupos de *E. pleosticta* dos sete fragmentos florestais estudados, baseados em marcadores PCR-RFLP (obtidos a partir da amplificação de segmentos de genes mitocondriais 16S e COI-COII) e

marcadores microssatélites (obtidos para os locos Egc 17, Egc 18, Egc 24, Egc 26, Egc 35, Egc 37 e Egc 51) .....44

**Tabela 7 –** Análise da Variância Molecular (AMOVA) e comparação da variância da frequência gênica ( $\Phi F_{ST}$ ) par a par, entre grupos de *E. pleosticta* dos sete ST fragmentos florestais estudados, baseados em marcadores PCR-RFLP (obtidos a partir da amplificação de segmentos de genes mitocondriais 16S e COI-COII) e marcadores microssatélites (obtidos para os locos Egc 17, Egc 18, Egc 24, Egc 26, Egc 35, Egc 37 e Egc 51) .....45

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 –** Localização geográfica dos fragmentos florestais estudados e as distâncias entre estes. Os números correspondem à distância em quilômetros (km) entre os sete fragmentos florestais estudados (A – G).....28
- Figura 2 –** Perfil eletroforético, em um gel de poliacrilamida 9%, mostrando os 4 haplótipos (A-D) obtidos para a região 16S digerida, com a enzima AseI, de machos de *E. pleosticta* coletados no fragmento de mata E (14,6 ha). Nas duas primeiras colunas aparecem os marcadores de peso molecular de 50 e 25 pb, respectivamente. À direita da figura são mostrados os pesos moleculares (pb) dos fragmentos de restrição que aparecem no gel.....34
- Figura 3 -** Estimativa de variação genética (%) de amostras de machos de *E. pleosticta* dos sete fragmentos florestais estudados (A-G), obtida com base na proporção de locos polimórficos, calculados a partir de marcadores PCR-RFLP gerados pela restrição de segmentos das regiões mitocondriais 16S (rDNA) e intergenica COI-COII.....39
- Figura 4 –** Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 8%, obtido com o primer Egc 26 (Souza et al., 2007), mostrando dois alelos de microssatélites encontrados para os 24 machos de *E. pleosticta* coletados no remanescente florestal F. M: Marcador de peso molecular de 10pb.....44

## SUMARIO

<b>1 INTRODUCAO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICO .....	22
<b>3 ARTIGO</b> .....	23
<b>CONCLUSOES</b> .....	55
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56

## 1 INTRODUÇÃO

Após um longo período de destruição, a Mata Atlântica encontra-se reduzida à cerca de 7% da floresta original. Esta é considerada a segunda maior formação de floresta tropical da América do Sul, sendo reconhecida por sua alta biodiversidade e endemismos (DI BITTETI et al., 2003; TONHASCA et al., 2003). Em ecossistemas tropicais, como é o caso da Floresta Atlântica, a diversidade de espécies vegetais é extremamente alta quando comparada com a de outras regiões (WILSON, 1988 *apud* SCHLINDWEIN, 2000).

No Paraná, sul do Brasil, as áreas de florestas foram ocupadas para a formação de cidades e desenvolvimento da agricultura, causando a devastação da Mata Atlântica. Atualmente, a região norte do estado do Paraná possui apenas entre 2 e 4% de sua cobertura vegetal original (SOARES; MEDRI, 2002; TOREZAN, 2002).

De acordo com Primack e Rodrigues (2001), comunidades biológicas podem ser bastante afetadas por atividades humanas, mesmo quando um habitat não está destruído ou fragmentado. Essas comunidades podem sofrer impactos e as populações de espécies serem levadas à extinção por fatores externos que não alteram a estrutura dominante da comunidade, sendo que este dano pode não ser imediatamente notado. Hoje, a Mata Atlântica se caracteriza por apresentar uma paisagem fragmentada, com pequenas manchas de floresta em meio a monoculturas, pastos, estradas e cidades. Além do efeito do isolamento, uma vez perdidas suas espécies, estas áreas isoladas são difíceis de serem recolonizadas (DI BITTETI et al., 2003).

Segundo Neff e Simpson (1993), para que a diversidade de plantas presentes em um ecossistema seja mantida, faz-se necessário a conservação da diversidade dos polinizadores que fazem parte deste ecossistema. Deste modo, a fragmentação de habitat ameaça a existência de espécies de modos mais sutis, podendo limitar o potencial de uma espécie para a dispersão e colonização. Muitas espécies não colonizam os fragmentos após a população original ter desaparecido, se a dispersão animal é reduzida de um habitat, plantas que dependem desses animais para dispersar suas sementes ou mesmo para a sua polinização, serão afetadas também (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). Muitas vezes, espécies

confinadas a um único fragmento precisam ser capazes de migrar além da extensão do habitat em busca de recursos escassos, como por exemplo, recursos alimentares com disponibilidade variável no tempo e no espaço (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

Em diversas comunidades vegetais do mundo as abelhas constituem o principal grupo de polinizadores (NEFF; SIMPSON, 1993; VINSON; FRANKIE; BARTHELL, 1993; MICHENER, 2000). Na região Neotropical, as abelhas da tribo Euglossini são importantes polinizadores das florestas tropicais e subtropicais da América Central e da América do Sul (TONHASCA et al., 2003). Estas abelhas são de extrema importância para estudos da fauna tropical, pois possuem relações particulares com plantas de diversas famílias, especialmente as Orchidaceae (DODSON et al., 1969; ZUCCHI et al., 1969; DRESSLER, 1982; WILLIAMS; WHITTEN, 1983; REBÊLO, 2001). De fato, machos Euglossini são os polinizadores primários de alguns grupos de orquídeas Neotropicais (DRESSLER, 1982; ACKERMAN, 1983; ROUBIK; HANSON, 2004). Assim, devido à íntima inter-relação entre os machos destas abelhas e as orquídeas, as euglossinas passaram a ser conhecidas popularmente como 'abelhas das orquídeas'.

A tribo Euglossini possui aproximadamente 200 espécies, distribuídas em cinco gêneros: *Aglae*, *Exaerete*, *Eulaema*, *Eufriesea* e *Euglossa* (DRESSLER, 1982; CAMERON, 2004). Os Euglossini formam um grupo distinto dentro da família Apidae, por apresentarem frequentemente tegumento metálico, glossa longa e, no caso dos machos, as tíbias das pernas posteriores modificadas para a coleta e possível metabolização de substâncias aromáticas (DRESSLER, 1982; ROUBIK; HANSON, 2004). Muitas espécies desta tribo são solitárias, mas algumas apresentam associações pequenas ou médias com comportamento do tipo comunal e eussocial (DRESSLER, 1982; GARÓFALO, 1992; REBÊLO, 2001; AUGUSTO; GARÓFALO, 2004).

Este grupo de abelhas era desconhecido até o final da década de 1960, quando algumas pesquisas empregando cromatografia a gás levaram à identificação de diversos compostos químicos presentes nas fragrâncias de orquídeas visitadas pelos machos (DODSON; HILLS, 1966; DODSON et al., 1969; WILLIAMS; WHITTEN, 1983). O conhecimento destes compostos (obtidos sinteticamente) permitiu o desenvolvimento de técnicas para a atração de machos euglossíneos, empregando iscas-odores.

Apesar de serem abelhas aparentemente sensíveis à fragmentação de habitats, particularmente em áreas de Mata Atlântica, ainda são poucos os relatos dos efeitos da fragmentação sobre a fauna de Euglossini (PERUQUETTI et al., 1999; TONHASCA; ALBUQUERQUE; BLACKMER; 2003; SOFIA et al., 2005; AGUIAR; GAGLIANONE, 2008). Alguns estudos têm indicado que a riqueza e a diversidade das comunidades de Euglossini podem ser afetadas de forma significativa pelo tamanho do fragmento e da cobertura e condições de conservação destes (SOFIA; SUZUKI, 2004; AGUIAR; GAGLIANONE, 2008). Foi demonstrado recentemente que a abundância destas abelhas se mostrou positivamente correlacionada com o tamanho dos fragmentos florestais estudados e negativamente relacionada com a forma (razão borda:área) destes (BROSI, 2009). Ainda segundo este autor, a fragmentação florestal parece afetar mais intensamente a fauna de Euglossini do que outros grupos de abelhas. A conservação mais efetiva destas abelhas aparentemente requer a presença de áreas de florestas (BROSI et al., 2008).

As Euglossini são abelhas reconhecidamente dotadas de grande capacidade de vôo (JANZEN, 1971). Embora áreas desmatadas possam constituir barreiras para o deslocamento de algumas espécies desta tribo (POWELL; POWELL, 1987), vários estudos mostram que tais abelhas são capazes de se deslocar entre fragmentos florestais (RAW, 1989; TONHASCA; ALBUQUERQUE; BLACKMER, 2003) ou mesmo transpor distâncias de cerca de 500 m sobre corpos d'água separando, por exemplo, ilha e continente (MURREN, 2002). Tonhasca, Albuquerque e Blackmer (2003) observaram que diversas espécies de Euglossini transitam livremente entre remanescentes maiores de floresta e fragmentos de mata espalhados em áreas de pastagens. Contudo, não se sabe exatamente qual a distância limite para os deslocamentos das diferentes espécies em ambientes fragmentados. Encontra-se bem estabelecido na literatura que fragmentos florestais podem funcionar como ilhas ou trampolins, contribuindo para o deslocamento de animais e manutenção do fluxo gênico das populações presentes em ambientes fragmentados (DI BITTETI et al., 2003; METZGER, 2004). Contudo, se de algum modo a fragmentação de habitats inibir ou limitar o fluxo gênico entre as abelhas de fragmentos florestais distintos, pode-se esperar em longo prazo um declínio na variação genética das populações afetadas de abelhas (MORATO, 1998). Tal possibilidade torna-se um problema ainda mais preocupante quando se considera o

fato de que estudos têm mostrado que diversas espécies de Hymenoptera apresentam normalmente uma variação genética menor quando comparada a insetos de outros grupos (BERKEHALMER, 1983; GRAUR, 1985; CRESPI, 1991; SHOEMAKER et al., 1992; PACKER; OWEN, 2001). Dentre os himenópteros, as abelhas, vespas e formigas são elementos fundamentais dos ecossistemas terrestres, onde desempenham papéis ecológicos importantes em ecossistemas naturais e agrícolas (ZAYED; PACKER, 2005). Neste grupo de insetos as abelhas destacam-se como polinizadores e são, na atualidade, foco de atenção em diversos estudos, os quais têm apontado um declínio mundial na diversidade e abundância de tais insetos (WILLIAMS; MINCKLEY; SILVEIRA, 2001; STEFFAN-DEWENTER; POTTS; PACKER, 2005).

A variabilidade genética pode ser compreendida por dois aspectos: diversidade alélica e heterozigossidade. Em populações pequenas isoladas a variabilidade genética pode ser substancialmente reduzida por meio da deriva genética e endogamia resultando na perda de alelos e declínio na heterozigossidade. Estas reduções podem resultar na diminuição da aptidão da população e eventual extinção desta (FERGUNSON et al., 1995). Encontra-se estabelecido que populações menores são mais vulneráveis à depressão endogâmica e a outros problemas associados com o tamanho reduzido da população (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). A depressão endogâmica é causada principalmente pelo aumento da homozigossidade de alelos recessivos raros; além disso, é um dos fatores prejudiciais da endogamia, pois os efeitos da endogamia podem se tornar quantitativos em termos de redução da heterozigossidade (HARTL, 2008). A endogamia não muda diretamente as frequências alélicas, mas pode levar à redução do valor adaptativo médio se gerar proles homozigotas por alelos deletérios. Ao aumentar a proporção de indivíduos da população que são homozigotos, a endogamia aumenta a frequência com que os alelos deletérios recessivos afetam os fenótipos (FREEMAN; HERRON, 2009). Assim, o principal efeito da endogamia é o aumento da frequência de genótipos homozigotos em uma população, em relação à frequência esperada em cruzamentos aleatórios. A quantidade de endogamia pode ser medida por meio da proporção real de genótipos heterozigotos na população, comparada à proporção de genótipos heterozigotos que ocorreriam em cruzamentos aleatórios (HARTL, 2008).

Uma das características dos himenópteros é o sistema haplodiplóide de determinação de sexo, no qual fêmeas se desenvolvem de ovos fecundados, sendo, portanto, organismos diplóides, enquanto machos são haplóides, com desenvolvimento a partir de ovos não-fecundados (CROZIER, 1977; COOK, 1993; UNRUH; MESSING, 1993). Este processo de reprodução, por partenogênese, no qual machos são produzidos a partir de ovos não fertilizados é conhecido como arrenotoquia (UNRUH; MESSING, 1993). De acordo com estes autores, embora a oogênese em fêmeas arrenótocas seja comparável à de outros insetos diplóides, e inclua recombinação cromossômica e permuta entre os cromossomos, a espermiogênese em machos haplóides é um processo ameiótico, sem pareamento entre os homólogos, recombinação e permuta. O sistema haplóide de machos de abelhas é uma característica distinta dos Hymenoptera e tem consequências importantes para a alocação de sexo e evolução do comportamento social dentro deste grupo de insetos (COOK; CROZIER, 1995). No sistema haplodiplóide de determinação de sexos, machos diplóides podem também ser produzidos em alguns himenópteros, sendo tais indivíduos normalmente estéreis e pouco viáveis (CROZIER, 1977; COOK; CROZIER, 1995; ZAYED; PACKER, 2005).

Enquanto em insetos diplóides o sexo de um indivíduo é determinado por um balanço entre cromossomos sexuais e autossômicos, os cromossomos sexuais propriamente ditos não ocorrem em himenópteros, sendo desta forma difícil de justificar para tais insetos o modelo de balanço cromossômico na determinação sexual (UNRUH; MESSING, 1993). Na verdade, o modo de determinação sexual experimentalmente demonstrado nestes insetos é o mecanismo de alelos (sexuais) múltiplos (ou mecanismo de Whiting) (WILSON, 1971; UNRUH; MESSING, 1993). Atualmente, o mecanismo proposto, e mais amplamente aceito, para explicar a determinação sexual em himenópteros, baseado nos estudos de P.H Whiting, é o da determinação sexual por um único loco, apresentando uma variedade de alelos (sexuais) ou sl-CSD (do inglês *single-locus complementary sex determination*) (ZAYED; PACKER, 2005). Em tal mecanismo, indivíduos diplóides heterozigotos desenvolvem-se em fêmeas e haplóides (hemizigotos) em machos. Este mecanismo já foi demonstrado para várias espécies de abelhas (UNRUH; MESSING, 1993). Entretanto, se em homozigose, nos cromossomos materno e paterno, os alelos sexuais resultarão no desenvolvimento de um macho diplóide (indivíduo homozigoto diplóide, portanto) (WILSON, 1971;

COOK, 1993). Em razão de machos diplóides serem não funcionais (estéreis) e com baixo valor adaptativo, existe uma forte seleção contra estes e ao mesmo tempo uma seleção para uma alta diversidade de alelos sexuais.

Enquanto em organismos diplóides, a depressão genética por endocruzamento aumenta o risco de extinção, no caso de organismos haplóides, é comumente aceito que, os alelos deletérios são mais rapidamente eliminados da população, tornando, deste modo, os organismos com sistemas haplodiplóides mais 'ímmunes' aos efeitos desta depressão genética e, teoricamente, com riscos reduzidos à extinção quando comparado aos organismos diplóides (HEDRICK; PARKER, 1997 *apud* ZAYED; PACKER, 2005). Contudo, o sistema de loco único de determinação sexual complementar (sl-CSD), impõe por meio da homozigose uma fonte não usual de carga genética em populações pequenas que resulta na produção de machos diplóides inviáveis ou efetivamente estéreis (ZAYED; PACKER, 2005). Como consequência deste fato, a taxa de extinção em populações haplodiplóides que mostra produção de machos diplóides pode ter uma ordem de grandeza maior que na ausência destes, conforme modelo (estocástico) utilizado por estes autores. Considerando-se ainda o fato dos machos diplóides serem oriundos de ovos fertilizados, tais machos podem ser vistos como tentativas mal sucedidas na produção de fêmeas. Assim, frequências elevadas de machos diplóides refletem uma redução na população de fêmeas e, por conseguinte no número efetivo da população (CROZIER, 1976). O aumento no número de machos diplóides em populações de algumas espécies de Euglossini tem sido reportado na literatura (ROUBIK; WEIGT; BONILHA, 1996; ZAYED; ROUBIK; PACKER, 2001, 2004). Contudo, as frequências de machos diplóides nas populações de Euglossini têm se mostrado variável entre diferentes espécies, sugerindo que algumas espécies sejam mais suscetíveis que outras a mudanças no ambiente e à pressão antropogênica (LÓPEZ-URIBE; ALMANZA; ORDONEZ, 2007).

A Biologia da Conservação trabalha contra a crise da biodiversidade e inclui uma nova área de investigação científica, conhecida como Genética da Conservação, que envolve dados moleculares e a genética de populações (PEREZ-SWEENEY et al., 2004). O estudo de populações e a conservação de populações a longo prazo têm como objetivos: evitar a endogamia em espécies que não são naturalmente endogâmicas, manter o maior potencial evolutivo possível (alta variabilidade genética), independente da fragmentação, além da análise genética

das populações e da identificação de sua estrutura genética com os fatores que a afetam, como tamanho efetivo da população, fluxo gênico e sistemas de acasalamento. Os níveis de fluxo gênico da população também auxiliam na análise da intensidade em que a fragmentação impede a troca gênica entre as populações (PEREZ-SWEENEY; RODRIGUES; MELNICK, 2004).

Atualmente, várias técnicas moleculares têm sido empregadas como ferramentas no estudo da biodiversidade molecular de diferentes organismos, o que tem auxiliado de modo significativo os estudos de genética da conservação. Algumas destas técnicas são baseadas nas análises do DNA mitocondrial dos animais investigados, outras se baseiam na análise no genoma total do organismo (CHENUIL, 2006).

Entre os principais tipos de marcadores moleculares disponíveis merecem destaque os marcadores microssatélites, os quais têm sido amplamente usados em estudos populacionais de diferentes organismos. Conhecidos também como repetições curtas em tandem (STRs) ou sequências simples repetidas (SSRs), os microssatélites representam um tipo de sequência genômica de DNA não codificante, as quais se encontram distribuídas em grande quantidade pelo genoma, apresentando altos níveis de polimorfismo alélico (OLIVEIRA et al., 2006). Na verdade, cada loco de microssatélite consiste de sequências curtas de nucleotídeos (usualmente, di, tri ou tetranucleotídeos) que estão arranjados em tandem em uma localização cromossômica particular (AVISE, 2004). Assim, a natureza da variação dos microssatélites corresponde ao número de cópias das unidades repetidas (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001), com tais variações representando os diferentes alelos (algumas vezes 20 ou mais) de um determinado loco dentro de uma população (AVISE, 2004).

O motivo para o elevado polimorfismo alélico relaciona-se ao fato de a taxa de mutação em regiões de microssatélite ser mais alta do que em outras partes do genoma, com variação de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  nucleotídeos por loco, por geração. Erros durante a recombinação, *crossing-over* desigual e deslizamento da polimerase na replicação ou no reparo do DNA podem explicar esta alta taxa de mutação (OLIVEIRA et al., 2006). Em consequência deste fato, particularmente, dentro do conjunto de técnicas que se utilizam da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR),

atualmente, a técnica de microssatélites é a mais difundida na análise de polimorfismos (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001).

Os microssatélites apresentam reconhecidamente herança mendeliana simples e são marcadores co-dominantes, possibilitando identificar heterozigotos em genomas diplóides (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004). Tais marcadores são importantes para estudos da variabilidade genética de populações, estudos de DNA forense, mapeamento genético, manejo e conservação de recursos biológicos entre outras aplicações (HANATAKA; GALETTI Jr, 2003).

O fator limitante para o emprego da técnica de microssatélites é a disponibilidade de informação (em termos de sequências de nucleotídeos) a respeito das regiões que possuam repetições para o organismo que se deseja estudar (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001; OLIVEIRA et al., 2006). Mas, pesquisas mostram que pares de *primers* determinados para uma espécie podem ser utilizados em outras espécies do mesmo gênero ou para espécies de gêneros próximos da mesma família, possibilitando a redução de custos elevados que o desenvolvimento de *primers* específicos de microssatélites muitas vezes impõe (OLIVEIRA et al., 2006). Em um estudo recente, Souza et al. (2007) desenvolveram vários *primers* de microssatélites com base no genoma de duas espécies de abelhas Euglossini. Tais *primers* se mostraram eficientes para amplificação de diferentes locos polimórficos de microssatélites em diversas espécies do grupo.

Dentro do conjunto de marcadores moleculares disponíveis para estudos populacionais incluem-se ainda os marcadores obtidos a partir da combinação das técnicas PCR e RFLP (*Polymerase Chain Reaction -Restriction Fragment Length Polymorphism*), conhecidos como marcadores PCR-RFLP, os quais são baseados nas análises dos padrões de fragmentos produzidos pela digestão de um determinado DNA com uma endonuclease específica. Saiki et al. (1985) utilizaram a técnica de PCR junto à de RFLP para detecção de polimorfismos. A detecção de polimorfismos por meio da técnica de PCR-RFLP pode ser utilizada na avaliação da estruturação e variação genética de populações, fornecendo informações relevantes para a conservação e manejo adequado de populações ameaçadas. Neste caso, a etapa de amplificação precede a digestão do DNA por enzimas de restrição (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001).

De acordo com Arias, Francisco e Silvestre (2003), nas décadas de 1970-80, a molécula de DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) passou a fazer parte de muitos

estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas e o entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos (HILLIS; MORITZ; MABLE, 1996; AVISE, 2004). O conhecimento de diversas sequências de DNAm de vários filos levou ao desenvolvimento de *primers* universais, que permitem o acesso ao genoma do DNAm de espécies desconhecidas, o sequenciamento e a comparação de genes homólogos de espécies próximas e de populações de uma dada espécie (PALUMBI, 1996).

O DNA mitocondrial (DNAm) animal é uma molécula de fita dupla circular e apresenta herança uniparental, via materna; sendo assim, este genoma reúne características ideais para estudos filogenéticos, tem estrutura genética simples e não possui modelos complexos de DNA repetitivo, elementos de transposição, pseudogenes e íntrons, com transmissão genética direta, não segue os padrões mendelianos de segregação e não sofre recombinação ou rearranjos, podendo servir para traçar uma genealogia materna (ATTARDI, 1985; ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001; ARIAS; FRANCISCO; SILVESTRE, 2003). Além disso, o DNA mitocondrial animal possui alta taxa evolutiva, devido a baixa eficiência no sistema de reparo das mitocôndrias e alta exposição a radicais livres gerados durante o processo de respiração. As regiões A+T são as que acumulam mais mutações, substituições de bases ou inserção/deleções, sendo que as inserções e deleções podem alterar o tamanho total da molécula. O gene da subunidade *citocromo oxidase c*, entre outros genes mitocondriais acumulam mais rapidamente substituições de bases; entretanto, genes codificadores para as subunidades ribossômicas, incluindo a região ribossomal 16S, estão entre os genes mais conservados (CALCAGNOTTO, 2001; ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001; ARIAS et al., 2006).

Em abelhas estes dois genes mitocondriais têm sido utilizados para estudos da estrutura genética de diferentes espécies, mas principalmente em estudos envolvendo a abelha *Apis mellifera* vários estudos têm se baseado em marcadores mitocondriais para o estudo da estrutura genética de populações (HALL; SMITH, 1991; BOUGA et al., 2005; COLLET; ARIAS; DEL LAMA, 2007; LÓPEZ-URIBE; DEL LAMA, 2007). Além disto, a região intergênica COI-COII tem também sido objeto de análise em estudos com populações de abelhas (COLLET et al., 2006; INSUAN et al., 2007). Na maioria destes estudos a técnica de PCR-RFLP foi a principal técnica utilizada para a obtenção dos marcadores moleculares, técnica esta

que tem se mostrado eficiente em estudo de populações de abelhas (BOUGA et al., 2005; COLLET; ARIAS; DEL LAMA, 2007).

Desta forma, considerando-se a escassez de estudos genéticos envolvendo espécies nativas de abelhas, bem como a eficiência de marcadores moleculares mitocondriais, obtidos a partir da técnica PCR-RFLP, e marcadores microssatélites aplicados a estudos de populações, torna-se necessário um maior uso de tais marcadores em estudos genéticos com estas abelhas. O uso de tais marcadores torna-se ainda mais interessante quando o foco principal for a obtenção de informações que possam contribuir para um manejo mais adequado e conservação de espécies.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obter, com base em marcadores moleculares, informações sobre a diversidade genética da espécie *Euglossa pleosticta*, uma espécie Euglossini com ampla distribuição geográfica no Brasil, comumente presente em fragmentos florestais, remanescentes de Mata Atlântica, na região sul e sudeste do Brasil.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A partir de marcadores mitocondriais PCR-RFLP e microsatélites, investigar a estrutura genética populacional de *E. pleosticta* de fragmentos florestais de Mata Atlântica no estado do Paraná, apresentando tamanhos e graus de conservação distintos;
- Avaliar a possível ocorrência de relação entre o tamanho dos fragmentos estudados e os níveis de variação genética para os diferentes grupos de *E. pleosticta* analisados.
- Comparar os resultados obtidos com os dois marcadores moleculares empregados neste estudo a fim de fornecer um quadro mais completo sobre os efeitos da fragmentação na espécie estudada.
- Fornecer informações que possam vir a subsidiar estratégias que visem uma maior conservação da espécie estudada e de remanescentes de Mata Atlântica mantidos na forma de fragmentos florestais.

### 3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

#### 3.1 DIVERSIDADE GENÉTICA DE ABELHAS *EUGLOSSA PLEOSTICTA* (HYMENOPTERA, APIDAE) DE SETE FRAGMENTOS DE MATA NO NORTE DO PARANÁ, SUL DO BRASIL

Trabalho a ser submetido ao Periódico Genetics and Molecular Biology

# DIVERSIDADE GENÉTICA DE ABELHAS *EUGLOSSA PLEOSTICTA* (HYMENOPTERA, APIDAE) DE SETE FRAGMENTOS DE MATA NO NORTE DO PARANÁ, SUL DO BRASIL

Título resumido: Diversidade genética de *E. pleosticta*

Francielli M. de Oliveira, Alessandra N. Alves, Gabriele A. Freiria, Silvia H. Sofia<sup>1</sup>.

## Resumo

Neste estudo a diversidade genética de populações de *Euglossa pleosticta* de sete fragmentos de Mata Atlântica foi investigada por meio de marcadores PCR-RFLP e microssatélites, obtidos a partir da análise de 157 machos desta espécie. Nas análises de PCR-RFLP, amplicons das regiões 16S-(rDNA) e COI-COII do DNAm foram cortados com as endonucleases *Asel*, *DraI* e *SspI*, resultando em nove haplótipos-compostos. Nas análises de microssatélites foram amplificados sete locos, resultando na identificação de 57 alelos distintos. A AMOVA, realizada a partir dos dados de PCR-RFLP, indicou estruturação não significativa na variação genética das amostras analisadas, com 100% da variação dentro dos grupos. Os valores estimados de divergência de nucleotídeos ( $\delta$ ), de 0,0000 a 0,0420, indicou baixa divergência de nucleotídeos entre as amostras. De modo distinto, as análises de microssatélites, indicaram uma partição significativa na variação genética entre os grupos de abelhas dos sete fragmentos florestais, com valores de  $F_{ST}$  (0,036 -0,169) indicativos de baixa a alta diferenciação genética entre os 21 pares. Os resultados para os locos de microssatélites analisados sugerem possíveis efeitos de deriva genética, restrição do fluxo gênico, aumento da endogamia ou ainda efeitos de gargalo de garrafa entre as abelhas dos diferentes fragmentos, reforçando a necessidade de uma maior atenção à estrutura genética da população de *E. pleosticta* em toda a região estudada para uma melhor conservação da diversidade genética.

**Palavras-chave:** Euglossini. *Euglossa pleosticta*. Fragmentos florestais. Microssatélites. 38 DNA mitocondrial. DNAm. Estrutura genética. Mata Atlântica. PCR-RFLP. Microssatélites.

---

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Biologia Geral. Caixa Postal 6001, 86051-990 - Londrina, Paraná, Brasil

E-mail: [shsofia@uel.br](mailto:shsofia@uel.br)

Phone: +55-43-33714437; Fax: +55-43-33714207

## 1 Introdução

As abelhas da tribo Euglossini formam um grupo monofilético primariamente Neotropical, representado por cinco gêneros (*Aglae*, *Eufriesea*, *Euglossa*, *Eulaema*, e *Exaerete*) e cerca de 200 espécies (Roubik e Hanson, 2004; Ramirez, 2005; Lopes et al., 2007). Dentre eles, o gênero *Euglossa* é o mais numeroso, com mais de 100 espécies descritas (Ramirez, 2005).

O grupo como um todo desempenha um papel importante na polinização de diversas espécies vegetais, incluindo mais de 650 espécies de orquídeas neotropicais (Dressler, 1982; Roubik e Hanson, 2004). De acordo com Tonhasca et al. (2003), se a dispersão de abelhas Euglossini for afetada pela fragmentação dos ecossistemas, a exemplo do que aconteceu com a Mata Atlântica, a polinização em tais ecossistemas pode ser prejudicada, pois várias espécies vegetais, incluindo orquídeas, dependem destes insetos para obter sucesso na polinização.

Nos últimos anos, alguns trabalhos têm demonstrado o efeito negativo da fragmentação sobre as populações de Euglossini (Aguiar e Gaglianone, 2008; Brosi, 2009; Giangarelli et al., 2009). Além disto, embora tenha sido demonstrado que algumas espécies desta tribo sejam capazes de transpor áreas desmatadas (Raw, 1989; Tonhasca et al., 2003) e coletar fragrâncias fora dos limites dos fragmentos (Milet-Pinheiro e Schindwein, 2005), aparentemente áreas fragmentadas podem constituir barreiras para determinadas espécies, impedindo o deslocamento destas para áreas circunvizinhas (Powell e Powell, 1987; Morato, 1994; Peruquetti et al., 1999). Tal fato poderia resultar na redução do fluxo gênico e da variabilidade genética, com um possível comprometimento a longo prazo da sobrevivência destas populações (Morato, 1998) e de populações de outras espécies, podendo gerar um efeito cascata nesses ecossistemas, devido a diminuição da capacidade adaptativa e conseqüentemente, resultando na extinção de tais populações.

Nas últimas décadas, várias técnicas moleculares têm sido empregadas como ferramentas no estudo da biodiversidade molecular de diferentes organismos, as quais vêm demonstrando um alto potencial para estimar o efeito da fragmentação dos habitats e a estruturação genética das populações (Waldschmidt et al., 2005). Algumas destas técnicas são baseadas nas análises do DNA

mitocondrial (DNAmt) dos animais investigados, enquanto outras se baseiam na análise no genoma total do organismo (Awise, 2004; Chenuil, 2006). Alguns estudos genéticos de populações têm combinado o uso de marcadores nucleares e análises do genoma mitocondrial, obtendo resultados positivos, principalmente porque estes dois marcadores revelam diferentes tipos de informação, tanto na capacidade de encontrar diferenciação genética, como também de detectar diferentes processos ecológicos e evolutivos (Haavie et al., 2000).

Em abelhas, assim como para a maioria dos animais, o DNAmt é uma molécula que apresenta herança citoplasmática uniparental, geralmente via materna (Meusel e Moritz, 1993; Hillis et al., 1996). Tal fato faz esta molécula particularmente útil para estudos de populações de espécies ou grupos de animais em que a coleta de fêmeas apresenta algumas dificuldades ou restrições. Nestes casos, a investigação do genoma mitocondrial dos machos pode fornecer informações relevantes sobre as populações das fêmeas. No caso específico de abelhas Euglossini, além da coleta de machos ser bem mais fácil e eficiente que a de fêmeas, ela não afeta de forma tão profunda as populações destes insetos (Becker et al., 1991), uma vez que são as fêmeas os organismos diretamente envolvidos com a produção da prole (Williams e Dodson, 1972; Dressler, 1982).

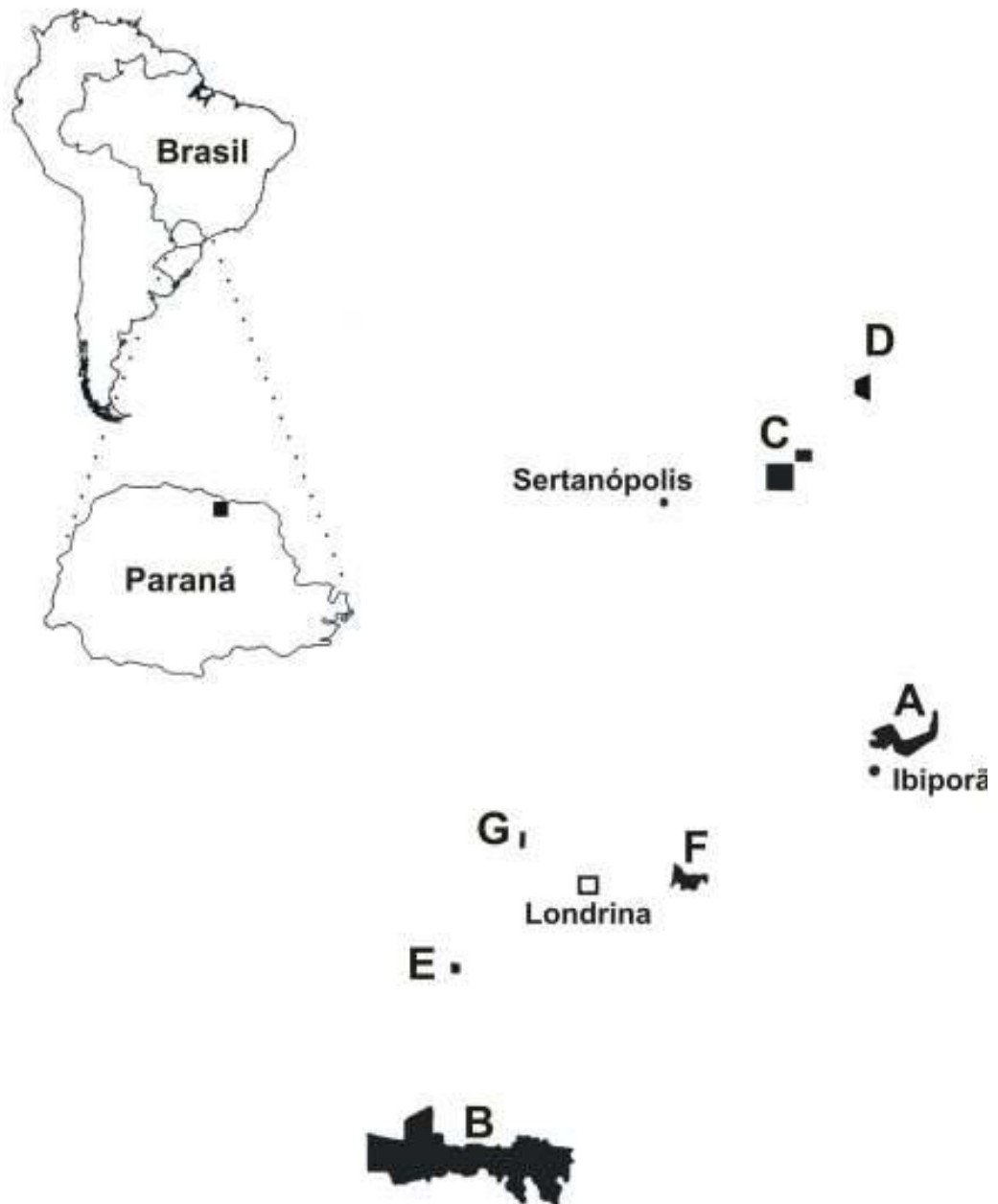
Em áreas de Mata Atlântica, ainda são poucos os relatos dos efeitos da fragmentação sobre a fauna de Euglossini (Peruquetti et al., 1999; Tonhasca et al., 2003). No sul e sudeste do Brasil, *Euglossa pleosticta* é um constituinte importante das comunidades de Euglossini em remanecentes deste bioma, sendo uma das espécies de ocorrência normalmente frequente. Apesar disto, não existem ainda estudos sobre a diversidade genética de populações desta espécie. Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar, com base em marcadores moleculares mitocondriais e nucleares, a diversidade genética de populações de *E. pleosticta* de sete fragmentos de Mata Atlântica no norte do estado do Paraná, sul do Brasil. Para a obtenção dos marcadores genéticos foram empregadas as técnicas de PCR-RFLP e microssatélites, duas técnicas moleculares que têm se mostrado eficazes para o estudo da estrutura genética de populações de diferentes espécies de abelhas (Widmer e Schmid-Hempel, 1999; Collet et al. 2006; Insuan et al., 2007).

## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Áreas de Estudo

As abelhas foram coletadas em sete fragmentos florestais na região norte do estado do Paraná, sul do Brasil (Figura 1). Originalmente, esta região era recoberta por Floresta Estacional Semidecidual, um dos ecossistemas associados de Mata Atlântica (Morellato e Haddad, 2000), restando atualmente pouco (<5%) desta vegetação nativa na região norte do estado.

Dos sete fragmentos estudados, o maior em tamanho (fragmento A), constitui uma reserva governamental (Parque Estadual “Mata dos Godoy”), com cerca de 580 ha de floresta madura 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). Outros quatro fragmentos estudados constituem reservas de mata em propriedades rurais particulares, são estes: fragmentos B, C, D e E com tamanhos variando de 180 a 14,6 ha (Tabela 1). Com exceção do fragmento B, com 170 ha de vegetação originalmente nativa ainda preservada, os outros quatro fragmentos de mata privados apresentam a vegetação consideravelmente alterada e representada por mata secundária. Todos estes cinco fragmentos encontram-se circundados por áreas agrícolas ou pastagens, que avançam até a borda destes fragmentos. Os últimos dois fragmentos estudados (fragmentos F e G) encontram-se localizados em área urbana, sendo o fragmento F uma reserva governamental (Parque Municipal “Arthur Thomas”), com 66 ha e o fragmento G, uma mata de 13,4 ha, localizada no campus da Universidade Estadual de Londrina cuja vegetação foi consideravelmente modificada por ação antrópica (Tabela 1). As distâncias aproximadas entre os sete fragmentos estão indicadas na (Tabela 2).



**Figura 1** – Localização geográfica dos fragmentos florestais estudados e as distâncias entre estes. Os números correspondem à distância em quilômetros (km) entre os sete fragmentos florestais estudados (A – G).

**Tabela 1** – Características dos sete fragmentos florestais estudados (A-G), incluindo tamanho em hectares (ha), localização, tipo de reserva e vegetação. São apresentados os totais de machos da espécie *E. pleosticta* coletados em cada fragmento (N) e o número de coletas em cada fragmento.

Fragmento Florestal	Tamanho (ha) (Categoria)	Localização (Coordenadas geográficas)	Reserva	Tipo de vegetação	N	Número de coletas
Faz. Doralice (A)	170 (grande)	Ibiporã (23°18' S; 50°59' W)	Particular	Madura	23	3
Pq. Mata dos Godoy (B)	580 (+ 2200) (grande)	Londrina (23°27' S; 51°14' W)	Governamental	Madura	23	2
Faz. Cachoeira 2C (C)	180* (grande)	Sertanópolis (22°58'S; 50°59'W)	Particular	Secundária	24	5
Faz. Santo Antônio (D)	70 ha (médio)	Sertaneja (22°57'S; 50°54'W)	Particular	Secundária	22	4
Estância Patrial (E)	14,6 (pequeno)	Londrina (23°22'S; 51°14'W )	Particular	Secundária	20	14
Pq. Arthur Thomas (F)	66 ha (médio)	Londrina (23°20' S; 51°08' W)	Governamental/ Urbana	Secundária	24	4
Horto/Uel (G)	13,4 (pequeno)	Londrina (23°19'S; 51°12'W)	Urbana	Secundária	21	15

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

**Tabela 2** – Distância geográfica (km) entre os sete fragmentos florestais estudados.

	A	B	C	D	E	F	G
A	***						
B	27,8	***					
C	33,8	50,4	***				
D	36,8	63,23	7,6	***			
E	26,3	7,35	49,5	56,7	***		
F	16,15	12,4	40,9	10,15	10,15	***	
G	23,3	12	43,1	50,6	6,1	6,6	***

## 2.2 Coleta das Abelhas e Extração de DNA

A captura dos machos teve como base a metodologia descrita por Sofia e Suzuki (2004). Para a atração das abelhas, foram utilizadas iscas-odores de três essências químicas, eucaliptol, eugenol e vanilina, as quais tem se mostrado eficientes na atração de machos de Euglossini na região estudada (Sofia *et al.*, 2004). Os machos atraídos as iscas foram coletados com uma rede entomológica e acondicionados vivos em frascos individuais. O material coletado foi identificado no laboratório sob estereomicroscópio (Zeiss), com base em uma coleção de referência. Após a identificação, as abelhas foram mantidas em *freezer*, a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , até a extração do DNA total.

Foi analisado um número variando de 20 a 24 machos de *E. pleosticta* de cada fragmento florestal, totalizando 157 indivíduos (Figura 2). Antes das extrações as abelhas foram lavadas em álcool 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 ressuspensionado em 100  $\mu\text{L}$  de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.3 Marcadores PCR -RFLP e Microsatélites

Para as amplificações, a concentração de DNA das amostras foi determinada em fluorímetro Hoefer, DyNA Quant 200 (Pharmacia) e, posteriormente diluída para uma concentração padrão de  $5\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ .

Para a obtenção de marcadores PCR-RFLP foram amplificadas as regiões 16S (rDNA) e intergênica COI-COII do genoma mitocondrial das abelhas. Os pares de *primers* 16SWb (3'-CACCTGTTTATCAAAAACAT-5') (Dowton e Austin, 1994) e 874-16S (3'-TATAGATAGAAACCAATCTG-5') (Cameron *et al.*, 1992) e, 5'-TCTATACCACGACGTTATTC-3' e 5'-GATCAATATCATTGATGACC-3' (Hall e Smith, 1991), desenvolvidos para a espécie de abelha *Apis mellifera*, foram empregados para as amplificações das regiões 16S e COI-COII, respectivamente.

As reações de amplificação das regiões 16S e entre os genes COI-COII, foram produzidas em um volume total de 25  $\mu\text{L}$ , contendo a concentração tampão de reação 1x, 0,2  $\mu\text{M}$  de dNTP, 3 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,5  $\mu\text{M}$  de cada primer, 1,5 U de Taq polimerase (VJR), 10 ng de DNA e água ultrapura para completar o volume da reação. As amplificações ocorreram em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.) e o protocolo de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 42°C e 45 s a 64°C; com uma extensão final de 4 min a 72°C. Posteriormente, alíquotas dos produtos da PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% e tampão de corrida TBE (Tris 0,89 mM, 0,89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA, pH 8,3), diluído 1:20 (v:v). Após eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio, visualizados e fotografados sob transluminador luz UV, usando-se o sistema da fotodocumentação digital Kodak EDAS 290. Marcador de 100 pb (Invitrogen) foi aplicado ao gel para a estimativa do peso molecular dos produtos amplificados.

Para a análise de restrição, amostras de 2  $\mu\text{L}$  dos produtos da PCR foram submetidas à digestão simples, com 16 endonucleases (*MspI*, *DraI*, *NdeI*, *SspI*, *AseI*, *XhoI*, *BclI*, *XbaI*, *HindIII*, *BsuRI*, *Eco321*, *BamHI*, *MobI*, *PvuII*, *PstI*, *EcoRI*), por um período de seis horas, conforme as recomendações do fabricante. Posteriormente, os fragmentos foram separados por eletroforese (8,3  $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) em géis de poliacrilamida de 9%, em tampão TBE 1x, corados com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), fotografados com câmera digital e analisados. Marcadores de pesos moleculares de 25 e 50 pb (Invitrogen) foram aplicados no mesmo gel que as amostras, para a estimativa dos tamanhos dos fragmentos de restrição.

Para a obtenção de marcadores microssatélites foi utilizado o protocolo de Souza et al. (2007), com algumas modificações. As reações de PCR, foram produzidas em um volume total de 15  $\mu\text{L}$ , contendo tampão de reação 1x, 0,25 mM de dNTP, 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,5  $\mu\text{M}$  de cada primer, 1 U de Taq polimerase (VJR), 10ng de DNA e água ultrapura para completar o volume da reação. As amplificações foram realizadas em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.), de acordo com o seguinte protocolo: uma desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguida de 29 ciclos de 30 s a 94 °C para desnaturação, 20 s a 56 °C/ 60 °C/62 °C □(sendo as temperaturas de anelamento otimizadas para cada primer de microssatélite

utilizado), 1 min a 72 °C para extensão, com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Nas amplificações foram utilizados 9 *primers* diferentes (Egc 17, Egc 18, Egc 24, Egc 26, Egc 30a, Egc 30b, Egc 35, Egc 37 e Egc 51) desenvolvidos para a espécie *Euglossa cordata* (Souza et al., 2007).

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de poliácridamida 8%, a 200 V por 2 horas e vinte minutos, corados com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) e fotografados com câmera digital. Um marcador de peso molecular de 10 pb (Invitrogen) também foi aplicado ao gel, para a posterior estimativa do peso molecular dos fragmentos.

Para ambos os tipos de marcadores empregados neste estudo, os pesos das bandas obtidas foram estimados com o auxílio do programa computacional *Fragment Length Calculator -FRAGLEN1 v.3.5* -(Ray, 2000).

## 2.4 Análise dos Dados

Nas análises dos marcadores mitocondriais PCR-RFLP, os diferentes perfis eletroforéticos obtidos foram designados com uma letra maiúscula, conforme a ordem de aparecimento destes. Assim, um código de múltiplas letras foi utilizado na discriminação do haplótipo-composto de cada indivíduo das amostras analisadas.

Para as análises computacionais, uma matriz binária foi construída com base na presença e ausência dos diferentes fragmentos de restrição identificados, na qual os valores 1 e 0 foram atribuídos à presença e ausência destes fragmentos, respectivamente. Em algumas ocasiões, as endonucleases produziram fragmentos de restrição de peso molecular pequeno e apenas os fragmentos maiores puderam ser computados com maior confiabilidade. Nestes casos, variações nos tamanhos dos fragmentos de restrição foram inferidas apenas com base nestes fragmentos de maior peso molecular.

A partir da matriz binária e utilização do programa computacional REAP (McElroy et al., 1992) foram estimados os graus de diversidade de haplótipos ( $h$ ) e de nucleotídeos ( $\pi$ ) dentro de cada amostra e o grau de divergência de nucleotídeos ( $\delta$ ) entre os pares de amostras das diferentes áreas de estudo.

A análise de variância molecular (AMOVA), realizada pelo programa computacional Arlequin 3.01 (Excoffier et al., 2005), foi empregada para o cálculo da variação genética dentro e entre os pares de amostras e para a estimativa dos valores de  $\Phi_{ST}$ , ou índice de fixação alélica (estimador análogo ao  $F_{ST}$  de Wright). Os componentes de variância, baseados na matriz de distância Euclidiana, foram testados estatisticamente por método não-paramétrico usando-se 1000 permutações e foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ . A AMOVA foi também aplicada aos dados de microssatélites para as estimativas destes mesmos parâmetros, a partir dos dados obtidos nas análises do genoma total dos machos das abelhas. Nas análises dos marcadores microssatélites os alelos de cada indivíduo foram comparados um a um, para cada loco, nos perfis eletroforéticos gerados com os diferentes *primers*. Cada alelo foi cuidadosamente identificado e posteriormente classificado numericamente, com base em seu respectivo peso molecular.

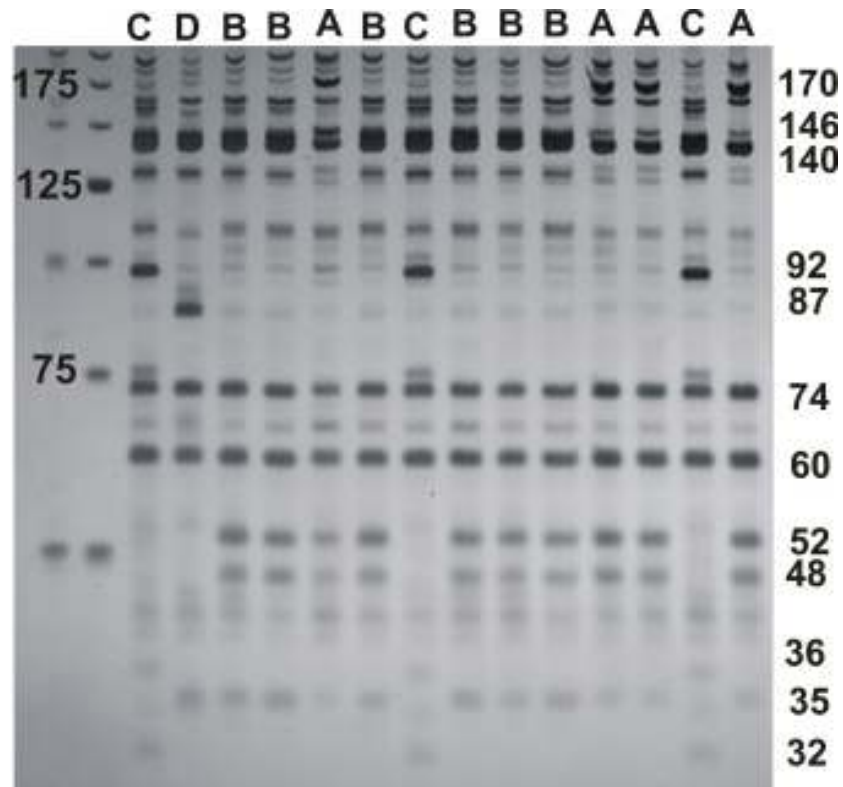
O programa TFGA 1.3 (Miller, 1997) foi empregado para a estimativa da proporção de locos polimórficos obtidos com base nos polimorfismos dos tamanhos dos fragmentos de restrição obtidos e para o cálculo da heterozigosidade (não-enviesada) esperada (Nei, 1978) para os diferentes locos de microssatélites analisados.

A determinação de uma possível associação entre a distância geográfica e valores de  $\phi_{ST}$  para os diferentes pares de amostras foi calculada pelo coeficiente de Spearman.

### 3 Resultados e Discussão

Os amplicons das duas regiões mitocondriais dos 157 machos de *E. pleosticta* analisados mostraram tamanhos aproximados de 620 pb (segmento do gene 16S) e 670 pb (segmento da região intergênica COI – COII).

Apenas as endonucleases DraI, AseI e SspI, das 16 endonucleases testadas, se mostraram efetivas na produção de fragmentos de restrição. Na Figura 2 é mostrado um perfil eletroforético dos fragmentos de restrição obtidos para a região 16S, digerida com a enzima AseI, de alguns indivíduos de *E. pleosticta* coletados no fragmento de mata E, com cerca de 15 ha (Tabela 1).



**Figura 2** – Perfil eletroforético, em um gel de poliacrilamida 9%, mostrando os 4 haplótipos (A-D) obtidos para a região 16S digerida, com a enzima AseI, de machos de *E. pleosticta* coletados no fragmento de mata E (14,6 ha). Nas duas primeiras colunas aparecem os marcadores de peso molecular de 50 e 25 pb, respectivamente. À direita da figura são mostrados os pesos moleculares (pb) dos fragmentos de restrição que aparecem no gel.

As três endonucleases que resultaram em fragmentos de restrição para as duas regiões mitocondriais amplificadas são enzimas de corte raro, que reconhecem sequências de seis pares de bases em sítios AT (AseI: 5'AT▽TAAT3' - 3'TAATΔTA5'; DraI: 5'TTT▽AAA3' - 3'AAAΔTTT5'; e SspI: 5'AAT▽ATT 3' - 3'TTAΔTAA5'). A eficiência destas três enzimas em reconhecer e cortar apenas regiões entre bases AT no genoma mitocondrial de *E. pleosticta* pode ser atribuída a reconhecida predominância destas duas bases no DNAm de abelhas (Crozier e Crozier, 1993; Silvestre et al., 2008), característica esta também observada para diversas espécies da tribo Euglossini (Dick et al., 2004). Tendo em vista o menor número de pontes de hidrogênios entre os pares de bases AT do que entre os pares CG, genomas ricos em bases AT são potencialmente mais propensos a incidência de inserções e deleções ('indels') (Arias e Infante-Malachias, 2001).

No caso da região 16S, *Asel*, *DraI* e *SspI* produziram entre 4 e 8 fragmentos de restrição, enquanto que para a região COI-COII somente as duas primeiras endonucleases foram capazes de reconhecer e cortar o segmento amplificado, produzindo entre 3 e 5 fragmentos de restrição para a espécie estudada (Tabela 3).

Para a região 16S, foram identificados 4 haplótipos distintos para a enzima *Asel* (A, B, C e D), 3 haplótipos com a enzima *DraI* (A, B e C) e 2 haplótipos com a *SspI*. As enzimas *DraI* e *VspI* (um isoesquizômero de *Asel*) se mostraram também eficazes na produção de fragmentos de restrição em segmentos dos genes mitocondriais 16S de outras três espécies de *Euglossa*: *E. cordata*, *E. securigera* e *E. townsendi* (López-Urbe e Del Lama, 2007).

As enzimas *Asel* e *DraI* revelaram, cada uma, 3 haplótipos distintos para a região intergênica (COI-COII). Os resultados apresentados na Tabela 3 revelam algumas diferenças encontradas no tamanho total dos fragmentos amplificados das regiões 16S e COI-COII, produzidas pela somatória dos vários fragmentos de restrição. Tais diferenças são provavelmente decorrentes da dificuldade em discriminar, no gel, fragmentos de restrição de tamanhos reduzidos.

López-Urbe e Del Lama (2007) analisando o genoma mitocondrial de três espécies de *Euglossa* encontraram polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição em segmentos dos genes 16S e citocromo B para duas delas (*E. cordata* e *E. securigera*). O sequenciamento de tais segmentos revelou que os polimorfismos encontrados eram decorrentes de substituições de nucleotídeos. Considerando-se que no presente trabalho nenhuma grande variação foi detectada no tamanho dos amplicons dos dois fragmentos de DNAmt amplificados, podemos assim atribuir as variações encontradas nos fragmentos de RFLP a possíveis ganhos ou perdas em sítios de restrição.

**Tabela 3** - Padrões de fragmentos de restrição (estimado em pares de bases) observado para os segmentos das regiões de DNAm 16S e COI-COII, produzidos com as endonucleases *AseI*, *DraI* e *SspI*, para as sete amostras de *E. pleosticta*. Letras A – D representam os haplótipos encontrados com cada enzima de restrição.

	16S								COI-COII						
	<i>AseI</i>				<i>DraI</i>			<i>SspI</i>		<i>AseI</i>			<i>DraI</i>		
	A	B	C	D	A	B	C	A	B	A	B	C	A	B	C
170	-	-	-	-	270	-	-	275	275	230	-	-	-	-	-
-	146	146	146	-	-	175	-	205	205	225	225	225	-	-	-
140	140	140	140	-	-	150	-	-	-	175	175	175	180	-	180
-	-	92	-	125	125	125	93	-	-	-	165	165	175	175	175
-	-	-	87	90	90	90	-	48	-	-	-	-	150	150	150
74	74	74	74	-	88	-	47	47	-	-	-	-	125	125	-
60	60	60	60	-	-	70	-	45	-	-	65	65	-	110	-
52	52	-	-	60	60	60	-	-	-	-	-	-	-	80	75
48	48	-	-	-	-	42	-	-	-	-	-	40	-	-	45
45	45	45	45	40	40	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	36	-	30	30	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	35	-	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	624	600	625	587	615	608	607	620	620	630	630	670	630	640	625

Quando combinados, os haplótipos dos indivíduos de *E. pleosticta* analisados resultaram em nove haplótipos-compostos diferentes (daqui por diante denominados apenas haplótipos) (Tabela 4). Do total de nove haplótipos observados, quatro (tipos I, II, VI e VII) foram compartilhados pelas amostras de abelhas dos sete fragmentos florestais estudados, um ocorreu entre as amostras de apenas dois fragmentos e outros quatro foram haplótipos exclusivos (Tabela 4). O haplótipo AAAAA, comum aos sete grupos de abelhas estudados, foi o que apresentou a maior frequência de incidência (35% -52,2%) entre as diferentes amostras. O segundo haplótipo mais comum (BAAAA), também presente entre as amostras de todos os remanescentes estudados, ocorreu em frequências de 20,8% a 52,1%. Os demais haplótipos ocorreram em frequências bem menores, entre 4,2 e 5,0%.

O polimorfismo de tamanho de fragmentos resulta de mutações nos sítios de restrição ou de inserções/deleções (indels), ou rearranjos entre os sítios de clivagem, como translocações e inversões, que alteram a distância entre os sítios de

restrição (Hillis et al., 1996). Segundo McLean et al. (1999) haplótipos ancestrais são geralmente mais frequentes e amplamente distribuídos entre populações. Com base neste pressuposto, os haplótipos AAAAA e BAAAA seriam provavelmente os mais antigos nas sub-populações de *E. pleosticta* das regiões estudadas, enquanto que, os haplótipos menos frequentes, incluindo os quatro exclusivos, teriam se originado, ao longo das diferentes gerações, de haplótipos ancestrais, como o AAAAA.

O número de haplótipos por fragmento estudado variou de 4 a 6, com as amostras dos remanescentes A e C, duas reservas particulares com tamanhos entre 150 e 200 ha, apresentando o maior número de haplótipos (Tabela 4). Surpreendentemente, a amostra do fragmento B, uma reserva governamental com cerca de 580 ha de mata primária ainda bem preservada (Tabela 1), foi uma das que apresentou apenas 4 haplótipos.

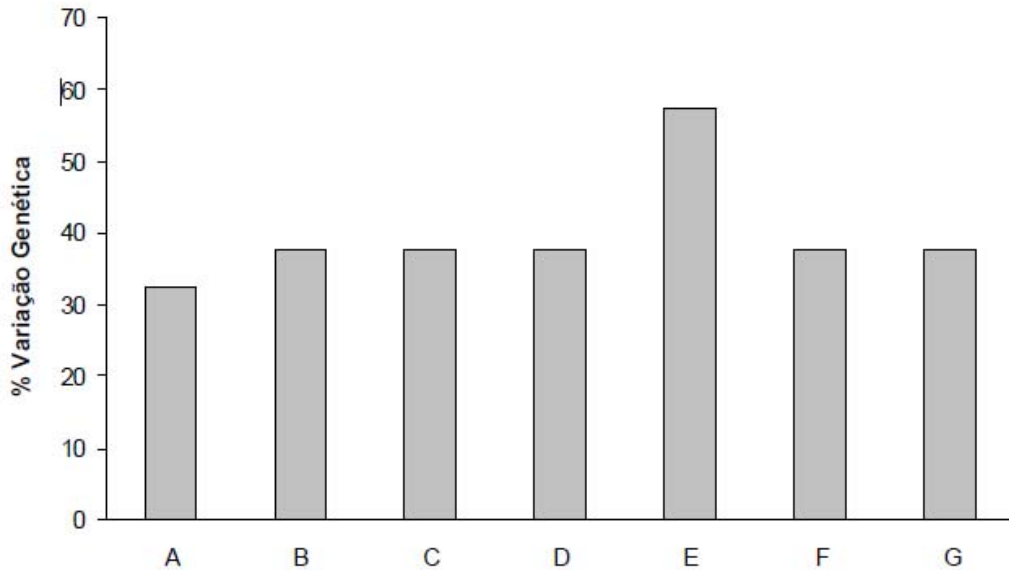
**Tabela 4** – Frequência e distribuição dos nove haplótipos-compostos de machos de *E. pleosticta* nos sete fragmentos florestais estudados (A-G), produzidos pela da restrição dos segmentos mitocondriais 16S e COI-COII com as endonucleases *Asel*, *DraI* e *SspI*; e valores estimados de diversidade de haplótipos ( $h$ ), e respectivos erros padrões (EP), diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ) e número de indivíduos (N).

HAPLÓTIPOS	TIPO	Fragmentos Florestais						
		A	B	C	D	E	F	G
A A A A A	I	0,391	0,348	0,416	0,454	0,350	0,458	0,476
B A A A A	II	0,434	0,521	0,208	0,364	0,350	0,333	0,285
B A A B A	III	-	-	0,042	-	-	-	-
B B A B A	IV	-	-	0,042	-	-	0,042	-
C B A A A	V	0,043	-	-	-	-	-	-
C B A B A	VI	0,043	0,086	0,083	0,045	0,150	0,125	0,095
C B A B B	VII	0,043	0,043	0,208	0,136	0,100	0,083	0,142
C B A C B	VIII	0,043	-	-	-	-	-	-
D C B B C	IX	-	-	-	-	0,050	-	-
Diversidade de haplótipos ( $h$ )		0,680	0,625	0,761	0,671	0,758	0,710	0,69
(EP)		(0,065)	(0,068)	(0,060)	(0,060)	(0,057)	(0,060)	(0,070)
Diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ )								
(%)		0,78	0,77	0,82	0,80	0,94	0,84	0,82
N		23	23	24	22	20	24	21

De um modo geral os valores estimados de diversidade de haplótipos ( $h$ ) dentro de cada amostra de *E. pleosticta* se mostraram mais ou menos próximos e pouco elevados, variando de 0,62 (amostra B) a 0,76 (amostra E) (Tabela 4). A diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ) dentro de cada amostra estudada foi também consideravelmente baixa, com valores variando de 0,77 (fragmento B) a 0,94% (fragmento E), e uma média de 0,83%. De forma similar, esta diversidade de nucleotídeos entre os diferentes pares de amostras também revelou valores baixos, variando de 0,75 a 0,88% (dados não mostrados). Os valores estimados de divergência de nucleotídeos ( $\delta$ ) entre os pares de amostras se mostraram bastante baixos, variando de 0,0000 a 0,0420 (amostras B-C), indicando, assim, baixa divergência de nucleotídeos entre os diferentes pares (dados não mostrados).

Ainda com base nos marcadores mitocondriais, a maior proporção de locos polimórficos ( $P = 57,5$ ) foi detectada para a amostra de abelhas do fragmento E, enquanto as demais amostras apresentaram valores mais ou menos similares de variação genética (Figura 3). Esta maior variação genética da amostra da área E (reserva particular de apenas 14,6 ha), pode ser atribuída à presença de dois sítios exclusivos de restrição apresentado por um indivíduo de *E. pleosticta* desta amostra, o qual exibiu os haplótipos simples D para a região 16S (cortada com a enzima AseI) e C (para a região intergênica, cortada com a enzima DraI) (Tabela 3).

A análise de variância molecular com base nos marcadores mitocondriais revelou ausência de estruturação na variação genética entre as amostras dos diferentes fragmentos florestais, com 100% da variação dentro dos grupos estudados (Tabela 6). Tais resultados corroboram aqueles obtidos com as estimativas de divergência de nucleotídeos, apresentados acima, entre as amostras de abelhas das sete áreas de estudo, os quais revelaram valores extremamente baixos de divergência de nucleotídeos entre estas amostras.



**Figura 3** - Estimativa de variação genética (%) de amostras de machos de *E. pleosticta* dos sete fragmentos florestais estudados (A-G), obtida com base na proporção de locos polimórficos, calculados a partir de marcadores PCR-RFLP gerados pela restrição de segmentos das regiões mitocondriais 16S (rDNA) e intergenica COI-COII.

Em relação às análises de marcadores microsatélites, foi observado que dos nove locos de microsatélites investigados, sete foram amplificados com sucesso e se mostraram polimórficos, com uma variação de 6 a 10 alelos identificados por loco, totalizando 57 alelos distintos identificados (Tabela 5). Para os locos Egc 30a e Egc 30b as amplificações não se mostraram eficientes, e estes foram excluídos das análises. Souza et al. (2007) analisando estes mesmos locos de microsatélites para quatro machos de *E. pleosticta* também encontraram polimorfismos para todos os locos analisados, com um número de alelos variando de dois a quatro alelos por loco.

Com exceção do loco Egc 35, alelos exclusivos foram encontrados para todos os locos analisados, em frequências variando de 4,16 (alelo a 9 do loco Egc18) a 36,84% (alelo 6 do loco Egc 26). Na Figura 4 é mostrado um perfil eletroforético, obtido para o loco Egc 26, mostrando os vários alelos de marcadores microsatélites encontrados para os 21 machos de *E. pleosticta* coletados no fragmento G (Horto/UEL).

No presente trabalho, os marcadores microsatélites revelaram heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) em todos os locos analisados, variando de 0,2410

(loco Egc 26, amostra D) a 0,8889 (loco Egc 18, amostra A). Tais valores de  $H_e$  se mostram mais ou menos similares aos obtidos com estes marcadores para esta e outras espécies de abelhas. No caso de *E. pleosticta*, para os quatro machos analisados desta espécie, Souza et al. (2007) encontraram valores de heterozigosidade esperada variando de 0,38 a 0,75. Com base em amostras de 67 machos e 67 fêmeas de outra espécie de Euglossa, *E. cordata*, estes mesmos autores encontraram, para os nove locos de microssatélites analisados, valores de heterozigosidade esperada variando de 0,51 a 0,92, enquanto Widmer e Schmid-Hempel (1999), a partir da análise de fêmeas das abelhas sociais da espécie *Bombus pascuorum*, encontraram para os seis locos de microssatélites analisados valores de heterozigosidade esperada variando de 0,045 a 0,872.

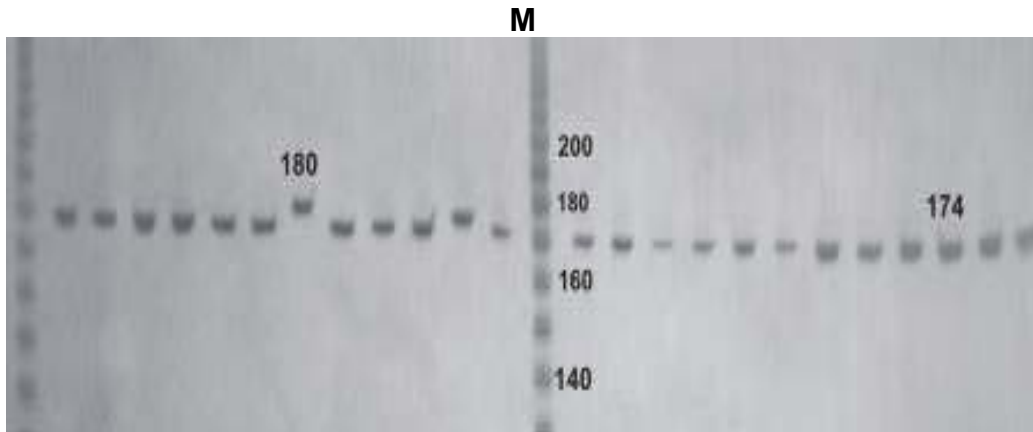
**Tabela 5** – Frequências de alelos de microssatélites nas amostras de machos de *Euglossa pleosticta* dos sete fragmentos florestais estudados (A-G). Tamanhos das amostras são apresentados entre parênteses. pb = pares de bases do alelo observado. Para informações sobre as localidades consultar a Tabela 1.

Fragmentos Florestais								
Loco Alelo	pb	A	B	C	D	E	F	G
Egc 17		(23)	(23)	(24)	(22)	(19 <sup>a</sup> )	(24)	(21)
1	248	0,2083	0,0909	0,2272	0,0454	0,1052	0,0416	0,1904
2	239	0,3333	0,0909	0,2272	0,1818	0,0526	0,0416	0,2857
3	236	0,2083	0,2727	0,1363	0,1363	0,0526	0,1666	0,1904
4	230	0,1666	0,2272	0,0909	0,1363	0,1578	0,2083	0,1904
5	224	0,0416	0,0454	0,2272	-	0,3684	0,3333	0,0476
6	221	0,0416	0,1818	0,0454	-	-	0,0833	0,0476
7	218	-	0,0909	0,0454	-	-	0,0833	-
8	215	-	-	-	0,3636	0,1578	0,0416	-
9	212	-	-	-	0,1363	0,1052	-	-
10	209	-	-	-	0,0454	-	-	-
$H_e$		0,7691	0,8330	0,8330	0,8245	0,8080	0,8156	0,8051
Egc 18		(23)	(23)	(24)	(22)	(19 <sup>a</sup> )	(24)	(21)
1	221	0,0434	0,0869	0,0416	0,0909	0,0526	0,0416	0,0952
2	212	0,1304	0,2608	0,0833	0,1818	0,2105	0,0416	0,1428
3	203	0,1304	0,0869	0,0416	0,0909	0,0526	0,8333	0,0952
4	197	0,1304	0,1739	0,0833	0,2727	0,1579	0,3333	0,0476
5	194	0,1739	0,0869	0,4166	0,0909	0,2105	0,0833	0,3333
6	188	0,1739	0,0434	0,1250	0,1818	0,1579	0,2083	0,0952
7	170	0,0869	0,2174	0,0416	0,0454	0,1579	0,2083	-
8	167	0,0434	0,0434	0,1250	0,0454	-	-	0,1904
9	164	-	-	0,0416	-	-	-	-
10	161	0,0869	-	-	-	-	-	-
$H_e$		0,8889	0,8464	0,7908	0,8499	0,8706	0,8014	0,8223

Continuação								
Fragmentos Florestais								
Loco Alelo	PB	A	B	C	D	E	F	G
Egc 24		(23)	(22*)	(22*)	(22)	(20)	(23*)	(20*)
1	210	0,0434	0,1304	0,0416	0,2727	0,2500	0,0416	0,0476
2	207	0,0869	0,2173	0,1250	0,3181	0,2000	0,0833	0,2380
3	204	0,2608	0,2608	0,1666	0,1363	0,2500	0,1250	0,3333
4	201	0,2608	0,3913	0,2083	0,2727	0,1500	0,2083	0,0476
5	198	0,2608	-	0,1666	-	0,0500	0,0416	0,1428
6	195	0,0869	-	0,1666	-	-	0,2083	0,1904
7	192	-	-	0,1250	-	-	-	-
8	186	-	-	-	-	-	0,2916	-
$H_e$		0,7961	0,7304	0,8582	0,7484	0,7641	0,8271	0,7666
Egc 26		(23)	(23)	(24)	(22)	(19*)	(24)	(21)
1	180	0,0869	0,0869	0,0416	0,1363	0,0526	0,0833	0,1904
2	174	0,0434	0,5652	0,2083	0,8636	0,1052	0,9166	0,5714
3	171	0,4343	0,3478	0,6250	-	0,1052	-	0,2380
4	165	0,2174	-	0,1250	-	0,1579	-	-
5	159	0,2608	-	-	-	0,2105	-	-
6	156	-	-	-	-	0,3684	-	-
$H_e$		0,7034	0,5643	0,5758	0,2410	0,7966	0,1560	0,5947
Egc 35		(23)	(23)	(24)	(22)	(19*)	(24)	(21)
1	180	-	0,0434	0,0416	0,0454	0,0526	0,0416	0,1428
2	174	0,1304	0,0869	0,0416	0,4090	0,2631	0,4166	0,0476
3	171	0,6521	0,4347	0,1666	0,5000	0,3684	0,5416	0,2857
4	165	0,1304	0,1739	0,2083	0,0454	0,1578	-	0,0952
5	159	-	0,1304	0,4166	-	0,1578	-	-
6	157	-	0,1304	0,1250	-	-	-	-
$H_e$		0,7536	0,7729	0,7518	0,5920	0,7624	0,5426	0,7201

Continuação								
Fragmentos Florestais								
Loco Alelo	PB	A	B	C	D	E	F	G
Egc 37		(23)	(22*)	(24)	(22)	(20)	(24)	(21)
1	203	0,4347	0,0454	0,0454	0,0454	0,1000	0,0416	0,0952
2	185	0,4347	0,0454	0,0909	0,0454	0,2000	0,0416	0,0476
3	173	0,0869	0,0454	0,3181	0,4090	0,1500	0,0833	0,1428
4	170	0,3043	0,1818	0,2727	0,1363	0,1500	0,0833	0,1904
5	167	0,4347	0,2727	0,0909	0,1818	0,1500	0,2916	0,1904
6	161	0,4347	0,2272	0,1818	-	0,2000	0,2500	0,1904
7	158	0,0869	0,1363	-	0,0454	0,1000	0,1250	0,0952
8	155	0,4347	0,0454	-	0,1363	-	0,0833	0,0476
9	149	0,1304	-	-	-	-	-	-
H <sub>e</sub>		0,8541	0,8330	0,8077	0,7738	0,8615	0,8298	0,8688
Egc 51		(23)	(23)	(24)	(21*)	(18*)	(24)	(21)
1	225	0,0434	0,1304	0,3333	0,0454	0,0555	0,1250	0,0952
2	219	0,0869	0,2174	0,6250	0,5909	0,1111	0,2500	0,0952
3	216	0,2174	0,2174	0,0416	0,1818	0,1666	0,4583	0,1428
4	213	0,1304	0,1304	-	0,0454	0,0555	0,1666	0,4285
5	210	0,3478	0,1739	-	0,1363	0,2222	-	0,2381
6	207	0,1304	0,1304	-	-	0,1666	-	-
7	203	0,0434	-	-	-	0,1111	-	-
8	200	-	-	-	-	0,1111	-	-
H <sub>e</sub>		0,8039	0,8425	0,5071	0,5807	0,8825	0,6986	0,7387

\*parcela perdida para o determinado loco.



**Figura 4** – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 8%, obtido com o primer Egc 26 (Souza et al., 2007), mostrando dois alelos de microssatélites encontrados para os 24 machos de *E. pleosticta* coletados no remanescente florestal F. M: Marcador de peso molecular de 10pb.

Quando baseada nos dados de microssatélites, embora a AMOVA tenha revelado uma maior variação genética dentro dos grupos (91,85%) de *E. pleosticta* do que entre estes grupos (8,25%), foi observado também uma estruturação significativa da variação genética entre as amostras analisadas, com um valor de  $F_{ST}$  de 0,0825 ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 6** – Análise da Variância Molecular (AMOVA) e comparação da variância da frequência gênica ( $F_{ST}$ ), entre grupos de *E. pleosticta* dos sete fragmentos florestais estudados, baseados em marcadores PCR-RFLP (obtidos a partir da amplificação de segmentos de genes mitocondriais 16S e COI-COII) e marcadores microssatélites (obtidos para os locos Egc 17, Egc 18, Egc 24, Egc 26, Egc 35, Egc 37 e Egc 51).

	Fonte de variação	Soma de Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem da Variação	$\Phi_{ST}$
PCR-RFLP	Entre grupos	9,469	-0,04817	1,85	-0,01846 <sup>ns</sup>
	Dentro de grupos	398,672	2,65781	101,85	
Microssatélites	Entre grupos	46,713	0,23213	8,25	0,08247*
	Dentro de grupos	387,383	2,58255	91,75	
Total		263,957	1,88905		

(5% de significância, ns= não significativo)

**Tabela 7** – Análise da Variância Molecular (AMOVA) e comparação da variância da frequência gênica ( $\Phi$  e  $F_{ST}$ ) par a par, entre grupos de *E. pleosticta* dos sete ST fragmentos florestais estudados, baseados em marcadores PCR-RFLP (obtidos a partir da amplificação de segmentos de genes mitocondriais 16S e COI-COII) e marcadores microssatélites (obtidos para os locos Egc 17, Egc 18, Egc 24, Egc 26, Egc 35, Egc 37 e Egc 51).

Comparativo	Fonte de variação	Porcentagem de variação		$\Phi_{ST}$		$F_{ST}$	
		PCR-RFLP	Microssatélite	PCR-RFLP	Microssatélite	PCR-RFLP	Microssatélite
A – B	Entre os Grupos	-3,86	3,69	-0,03855 <sup>ns</sup>		0,03689*	
	Dentro dos Grupos	103,86	96,31				
A – C	Entre os Grupos	1,6	6,08	0,01640 <sup>ns</sup>		0,06076**	
	Dentro dos Grupos	98,4	93,92				
A – D	Entre os Grupos	-2,94	14,03	-0,02936 <sup>ns</sup>		0,14029*	
	Dentro dos Grupos	102,94	85,97				
A – E	Entre os Grupos	0,55	4,83	0,00552 <sup>ns</sup>		0,04831*	
	Dentro dos Grupos	99,45	95,17				
A – F	Entre os Grupos	-2,8	14,24	-0,02797 <sup>ns</sup>		0,14239*	
	Dentro dos Grupos	102,8	85,76				
A – G	Entre os Grupos	-0,72	4,32	-0,00721 <sup>ns</sup>		0,04324*	
	Dentro dos Grupos	100,72	95,68				
B – C	Entre os Grupos	4,86	6,74	0,04856 <sup>ns</sup>		0,06744**	
	Dentro dos Grupos	95,14	93,26				
B – D	Entre os Grupos	-2,94	5,97	-0,02936 <sup>ns</sup>		0,05970*	
	Dentro dos Grupos	102,94	94,03				
B – E	Entre os Grupos	0,55	4,77	0,00552 <sup>ns</sup>		0,04771*	
	Dentro dos Grupos	99,45	95,23				
B – F	Entre os Grupos	-2,8	5,09	-0,02797 <sup>ns</sup>		0,05086*	
	Dentro dos Grupos	102,8	94,91				
B – G	Entre os Grupos	-0,72	1,92	-0,00721 <sup>ns</sup>		0,01918*	
	Dentro dos Grupos	100,72	98,08				
C – D	Entre os Grupos	-0,21	13,86	-0,00209 <sup>ns</sup>		0,13860*	
	Dentro dos Grupos	100,21	86,14				
C – E	Entre os Grupos	-3,27	9,40	-0,03275 <sup>ns</sup>		0,09402*	
	Dentro dos Grupos	103,27	90,60				
C – F	Entre os Grupos	-2,76	16,39	-0,02758 <sup>ns</sup>		0,16390*	
	Dentro dos Grupos	102,76	83,61				

Continuação da Tabela					
Comparativo	Fonte de variação	Porcentagem de variação		$\Phi_{ST}$	$F_{ST}$
		PCR-RFLP	Microssatélite	PCR-RFLP	Microssatélite
C – G	Entre os Grupos	-2,76	7,39	-0,02758 <sup>ns</sup>	0,07387*
	Dentro dos Grupos	102,76	92,61		
D – E	Entre os Grupos	-2,32	10,15	-0,02318 <sup>ns</sup>	0,10153*
	Dentro dos Grupos	102,32	89,95		
D – F	Entre os Grupos	-4,32	5,41	-0,04319 <sup>ns</sup>	0,05406*
	Dentro dos Grupos	104,32	94,59		
D – G	Entre os Grupos	-4,15	9,77	-0,04148 <sup>ns</sup>	0,09767*
	Dentro dos Grupos	104,15	90,23		
E – F	Entre os Grupos	-2,16	10,22	-0,02157 <sup>ns</sup>	0,10217*
	Dentro dos Grupos	102,16	89,78		
E – G	Entre os Grupos	-3,76	6,30	-0,03758 <sup>ns</sup>	0,06304*
	Dentro dos Grupos	103,76	93,70		
F – G	Entre os Grupos	-2,16	9,34	-0,02157 <sup>ns</sup>	0,09339*
	Dentro dos Grupos	102,16	90,66		

\* 5% de significância; \*\* 1% de significância; ns = não significativo - A: Faz. Doralice; B: Pq. Mata dos Godoy; C: Faz. Cachoeira 2C; D: Faz. Sto. Antônio; E: Estância Patrial; F: Pq. Arthur Thomas; G: Horto UEL.

As comparações, com base nos marcadores PCR-RFLP, realizadas entre os diferentes pares de amostras também indicaram, em todos os casos, ausência de diferenciação genética entre as amostras das diferentes localidades (Tabela 7). Além disto, quase todos os valores de  $\phi_{ST}$  encontrados foram negativos, provavelmente em razão de alguma imprecisão no algoritmo usado pelo programa computacional na estimativa dos valores de  $\phi_{ST}$  (Foster et al., 2006). De modo bastante distinto, a AMOVA aplicada aos dados de microssatélites nas 21 comparações entre pares de amostras revelou, em todos os casos, valores de  $F_{ST}$  estatisticamente diferentes de zero, indicando diferenciação genética entre as amostras de *E. pleosticta* dos diferentes fragmentos (Tabela 5). Os valores de  $F_{ST}$  obtidos nestas comparações variaram de 0,03698 (par A-B) a 0,1639 (par C-F). De acordo com Wright (1978), valores teóricos de  $F_{ST}$  variando conforme a seguinte escala: zero a 0,05 a 0,05; 0,05 a 0,15 e de 0,15 a 0,25 são indicativos de baixa, moderada e alta diferenciação genética, respectivamente.

O DNA mitocondrial animal tem sido apontado como um genoma adequado para estudos populacionais, em parte por apresentar uma alta taxa de evolução (10 vezes superior a de um gene de cópia única), fato este explicado pela baixa eficiência do sistema de reparo na mitocôndria e a alta exposição a radicais livres gerados durante o processo de respiração (Arias e Infante-Malachias, 2001). Por outro lado, é um genoma que praticamente não apresenta regiões não-codificadoras, fato já demonstrado para o genoma da espécie de abelha *Apis mellifera* (Crozier e Crozier, 1993) e outras de abelhas (Cha et al., 2007; Silvestre et al., 2008). Assim, embora o genoma mitocondrial tenha se mostrado adequado ao estudo da estrutura genética de diferentes espécies de abelhas (Collet et al., 2006; Insuan et al., 2007), marcadores mitocondriais como os detectados pela técnica de PCR-RFLP tendem a ser muito menos variáveis ou polimórficos que os marcadores microssatélites. Deste modo, os resultados obtidos no presente trabalho, com as análises de PCR-RFLP e microssatélites, parecem refletir as características inerentes dos dois tipos de genomas acessados aqui por estas duas técnicas moleculares. Embora alguns genes mitocondriais, a exemplo do gene das subunidades da citocromo oxidase c (aqui parcialmente amplificado nos segmentos das regiões COI e COII) acumulem mais rapidamente substituições de bases (Arias e Infante-Malachias, 2001), a falta de estruturação genética entre as amostras de *E. pleosticta*, revelada pelos marcadores mitocondriais, parece ser decorrente da maior conservação do genoma mitocondrial quando comparado às regiões de microssatélites.

Na literatura corrente existem vários estudos voltados à biologia da conservação que interpretam os baixos valores de  $\phi_{ST}$  como ocorrência de fluxo gênico, quando na verdade tais valores deveriam ser interpretados como a história evolutiva dos grupos estudados dentro de uma longa escala do tempo e não como processos em andamento (Sork et al., 2003). Em um estudo desenvolvido por Dick et al. (2004), baseado no sequenciamento de parte do gene COI de 14 espécies de Euglossini, representadas por populações distribuídas ao longo dos Andes e/ou da bacia Amazônica, foi observado a falta de estrutura filogeográfica para todas as populações estudadas. Tais resultados foram interpretados como a combinação de especiação Quaternária, expansão de população e/ou fluxo gênico ocorrendo em grandes distâncias, desde que as abelhas Euglossini são reconhecidas por sua grande capacidade de dispersão (Janzen, 1971; Dressler, 1982).

A partir dos valores de  $F_{ST}$  encontrados nas análises de microssatélites, foi testada a possível associação entre distância geográfica e os valores de distância genética (valores de  $F_{ST}$ ) detectados para os diferentes pares de amostras. Entretanto, nenhuma associação significativa foi detectada ( $rS = 0,09$ ) entre estes dois parâmetros.

Na região estudada, a fragmentação florestal da Mata Atlântica é um processo recente, com cerca de 80 anos de história (Torezan, 2002). Tal fato explicaria esta ausência de diferenciação genética, a partir da análise do genoma mitocondrial, entre as amostras de *E. pleosticta* dos sete fragmentos de mata. De modo diverso, a análise por meio de marcadores microssatélites, indicou estruturação significativa e alteração da variação genética possivelmente como consequência de um ou mais dos seguintes processos genéticos envolvendo as amostras de *E. pleosticta* dos sete fragmentos florestais estudados: deriva genética, efeito de gargalo de garrafa, aumento da endogamia e restrição no fluxo gênico. Embora alguns estudos tenham demonstrado que algumas espécies de Euglossini sejam capazes de transpor áreas desmatadas (Raw, 1989; Tonhasca et al., 2003), os resultados revelados com as análises de microssatélites sugerem dentre outros efeitos, limitação de fluxo gênico como um potencial fator determinando a ocorrência de diferenciação genética entre os 21 pares de amostras que mostraram diferenças significativas na quantidade de variação genética.

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 reduzido da população, ou ainda como resultado do efeito de “bottleneck” que pode conduzir à deriva genética. No presente trabalho, o maior esforço de coleta empregado nos dois fragmentos menores de mata (E e G) para se obter tamanhos de amostras similares aos dos outros cinco fragmentos florestais estudados (Tabela 1), sugere que estes fragmentos menores apresentam um número menor de indivíduos quando comparados aos demais grupos; embora, não se possa descartar a possibilidade de os machos destes locais estarem explorando outras fontes de recursos nestas áreas (Ambruster, 1993); embora esta última hipótese pareça pouco provável nestes dois casos. 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 de *E. pleosticta* estudadas. Segundo Primack e Rodrigues (2001) espécies podem se torna 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 habitat diminuirá com o passar do tempo, pois, é possível que fragmentos pequenos não possam sustentar subpopulações grande o suficiente para que esta sobreviva por um longo período. A redução no tamanho efetivo das populações 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). A produção destes machos, que são indivíduos inviáveis ou estéreis dentro das populações de abelhas e outros himenópteros, é consequência do sistema de determinação complementar de sexo apresentado pela maioria dos Hymenoptera, e impõe elevada carga genética às populações destes insetos haplodiplóides, com um aumento acentuado nos riscos de extinção destas (Zayed e Packer, 2005).

Diante da ameaça na redução de polinizadores, incluindo populações de espécies de abelhas (Kevan e Phillips, 2001), os resultados obtidos com os marcadores de microssatélites indicam a necessidade de uma maior atenção à diversidade genética das populações destes polinizadores, pois tais resultados indicam uma partição da diversidade genética entre as 'subpopulações' de *E. pleosticta* dos fragmentos florestais estudados. Sugere-se que maiores esforços sejam dirigidos para uma maior conservação e manejo dos fragmentos florestais existentes, de forma a garantir tanto a sobrevivência das populações desta espécie de Euglossini quanto a preservação da diversidade genética de tais populações.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Fundação O Boticário de Proteção à Natureza e Klabin S.A. e CAPES pelo apoio financeiro.

## Referências

- Aguiar WM e Gaglianone MC (2008) Comunidade de abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em remanescentes de Mata Estacional Semidecidual sobre Tabuleiro no Estado do Rio de Janeiro. *Neotrop Entomol* 37:118-125.
- Arias MC e Infante-Malachias ME (2001) RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA, in: Matioli F.M.C.F. (Ed.), *Biologia Molecular e Evolução*, Holos Editora, Ribeirão Preto, 143-152.
- Armbruster WS (1993) Within-habitat heterogeneity in baiting samples of male euglossine Bees: possible causes and implications. *Biotropica* 25:122-128.
- Becker P, Moure JS e Peralta FJA (1991) More about euglossine bees in Amazonian forest fragments. *Biotropica* 23:586-591.
- Brosi BJ (2009) The effects of forest fragmentation on euglossine bee communities (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Biol Conserv* 142:414-423.
- Cameron SA, Derr JN, Austin AD, Woolley JB e Wharton RA (1992) The application of nucleotide sequence data to phylogeny of the Hymenoptera: a review. *J Hym Res* 1:63-79.
- Cha SY, Yoon HJ, Lee EM, Yoon MJ Hwang JS, Jin BR, Han YS e Kim I (2007) the complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the bumblebee, *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae). *Gene* 392:206-220.
- Chenuil A (2006) Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetics* 127:101-120.
- Collet T, Ferreira KM, Arias MC, Soares AEE e Del Lama MA (2006) Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI-COII Patterns. *Heredity* 97:329-335.
- Crozier RH e Crozier YC (1993) The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics* 133:97-117.
- Dick CW, Roubik DW, Gruber KF e Bermingham E (2004) Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. *Mol Ecol* 13:3775-3785.
- Dowton M and Austin AD (1994) Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships. *Evolution* 91:9911-9915.
- Dressler RL (1982) Biology of orchid bees (Euglossini). *Annu Rev Ecol Syst* 13:373-394.

Excoffier L, Laval G e Schneider S (2005) Arlequin ver 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinf Online* 1:47-50.

Ferguson AJBT, Prodöhl PA, Mcmeel O, Thompson C, Stone C, McGinnity P e Hynes RA (1995) The application of molecular markers to the study and conservation of fish population, with special reference Salmo. *J Fish Biol* 47:103-126.

Foster CB, Aswath K, Chanock SJ, McKay HF e Peters U (2006) Polymorphism analysis of six selenoprotein genes: support for a selective sweep at the glutathione peroxidase 1 locus (3p21) in Asian populations. *BMC Genet* 7:56.

Francisco FO (2002) Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão *Plebeia remota*: análise do DNA mitocondrial e microssatélites. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, pp 147.

Giangarelli DC, Freiria GA, Colatreli OP, Suzuki KM e Sofia SH (2009) *Eufriesea Violacea* (Blanchard): A euglossine species potentially sensitive to forest patch deterioration in Brazil. *Neotrop Entomol* no prelo.

Hall HG e Smith D.R. (1991) Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci* 88:4548-4552.  
Hillis DM, Moritz C e Mable BK (1996) *Molecular Systematics*, Sinauer Associates, Massachusetts pp.655.

Insuan S, Deowanish S, Klinbunga S, Sittipraneed S, Sylvester HA e Wongsiri S (2007) Genetic differentiation of the giant honey bee (*Apis Dorsata*) In Thailand analyzed by mitochondrial genes and microssatellites. *Biochem Gen* 45:345-361.

Kevan PG e Phillips TP (2001) The economic impacts of pollinator declines: an approach to assessing the consequences. *Conserv Ecol* 5: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art8>.

López-Uribe MM e Del Lama MA (2007) Molecular identification of the species of the genus *Euglossa* Latreille (Hymenoptera: Apidae, Euglossini). *Neotrop Entomol* 36:712-720.

López-Uribe MM, Almanza MT e Ordonez M (2007) Diploid male frequencies in Colombian populations of euglossine bees *Biotropica* 39:660-662.

Matioli R e Passos-Bueno M R S (2001) Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos, in: Matioli, S. R. (Ed), *Biologia Molecular e Evolução*, Holos, Ribeirão Preto, pp. 153-161.

Mcelroy D, Moran P, Bermingham E e Kornfield I (1992) REAP: An integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. *J Hered* 83:157-158.

McLean JE, Hay DE e Taylor EB (1999) Marine population structure in an anadromous fish: lifehistory influences patterns of mitochondrial DNA variation in the eulachon, *Thaleichthys pacificus*. *Mol Ecol* 8:143-158.

Meusel MS e Moritz RFA (1993) Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. *Curr Genet* 24:539-543.

Miller MP (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, Northern Arizona University, Flagstaff.

Morato EF (1998) Estudos sobre comunidades de abelhas Euglossini. In: Anais do III Encontro Sobre Abelhas, Ribeirão Preto, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto 3:135-143.

Morato EF (1994) Abundância e riqueza de machos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em mata de terra firme e áreas de derrubada, nas vizinhanças de Manaus (Brasil). *Boletim Museu Para. Emílio Goeldi, sér. Zool.* 10:95-105.

Morellato LPC e Haddad CFB (2000) Introduction: the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 32:786-792.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB e Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.

Palumbi SR (1996) Nucleid Acids II: the polymerase chain reaction. In: Hills DM, Moritz C and Mable BK. *Molecular systematics*, Sinauer Associates, Massachusetts, pp 205-247.

Peruquetti RC, Campos LAO, Coelho CDP, Abrantes CVM e Lisboa LCO (1999) Abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância, riqueza e aspectos biológicos. *Rev Bras Zool* 16:101-118.

Powell AH e Powell GNN (1987) Population dynamics of male euglossine bees in Amazonian forest fragments. *Biotropica* 19:176-179.

Pruett CL e Winker K (2008) The effects of sample size on population genetic diversity estimates in song sparrows *Melospiza melodia*. *J Avian Biol* 39:252-256.

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

Ray JD (2000) Fragment Length Calculator: a Windows 95 program for calculating DNA fragment length. *J Hered* 91:177-178.

Roubik DW e Hanson PE (2004) *Orchid bees of Tropical America: Biology and field guide*, INBio Press, Heredita, Costa Rica.

Roubik DW, Weigt LA e Bonilla MA (1996) Population genetics, diploid males, and limits to social evolution of euglossine bees. *Evolution* 50:931-935.

Schлиндwein C (2000) A importância de abelhas especializadas na polinização de plantas nativas e conservação do meio ambiente. In: *Anais do Encontro Sobre Abelhas*, Edusp, Ribeirão Preto, SP, pp 131-141.

Silvestre D, Downton M e Arias MC (2008) The mitochondrial genome of the stingless bee *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): sequence, gene organization and a unique tRNA translocation event conserved across the tribe Meliponini. *Genet Mol Biol* 31:451-460.

Sofia SH, Paula FM, Santos AM, Almeida FS e Sodr e LMK (2005) Genetic structure analyses of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae) populations from southern Brazilian Atlantic rainforest remnants. *Gen Mol Biol* 28:479-484.

Sofia SH, Santos AM e Silva CRM (2004) Euglossine bees (Hymenoptera, Apidae) in a remnant of Atlantic Forest in Paraná State, Brazil. *Iheringia* 94:217-222.

Sofia SH e Suzuki KM (2004) Comunidades de machos de abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) e fragmentos florestais no sul do Brasil. *Neotrop Entomol* 33:693-702.

Sol e-Cava AJ (2001) Biodiversidade molecular e genética da conserva o. In: Matioli S R (ed.), *Biologia Molecular e Evolu o*. Holos, Ribeirão Preto, pp 171-190.

Sork VL, Campbell D, Dyer R, Fernandez J, Nason J, Petit R, Smouse P e Steinberg E (2003) 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*. Univ. California, Santa Barbara, pp 5-9.

Souza RO, Cervini M, Del Lama MA e Paxton RJ (2007) Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera, Apidae). *Mol Ecol Notes* 7:1353-1356.

Tonhasca AJr, Blackmer JL e Albuquerque GS (2003) Dispersal of euglossine bees between fragments of the Brazilian Atlantic Forest. *J Trop Ecol* 19:99-102.

Torezan JM (2002) Nota sobre a vegetação da bacia do rio Tibagi. In: Medri ME, Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JA (ed) *A Bacia do Rio Tibagi*. Editora dos Editores, Londrina, pp 103-107.

Waldschmidt AM, Lopes LA, Marco PJr e Campos LAO (2005) Genetic of Euglossini bees (Hymenoptera) in fragments of the Atlantic forest in the region of Viçosa, MG. *J Biol* 65:541-549.

Widmer A and Schmid-Hempel P. (1999) the population genetic structure of a large temperate pollinator species, *Bombus pascuorum* (Scopoli) (Hymenoptera: Apidae). *Mol Ecol* 8:387-398.

Williams NH e Dodson CH (1972) Selective attraction of male euglossine bees to orchid floral fragrances and its importance in long-distance pollen flow. *Evolution* 26:84-95.

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

Zayed A e Packer L (2005) Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *Proc Natl Acad Sci* 102:10742-10746.

Zayed A, Roubik DW e Packer L (2004). Use of diploid male frequency data as an indicator of pollinator decline. *Proc R Soc Lond B* 271:S9-S12.

Zimmerman JK e Madrinan SR 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 da espécie em estudo, indicando a ocorrência de variação genética para o genoma nuclear haplóide analisado.
- As duas regiões mitocondriais analisadas não mostraram diferenciação genética entre as amostras.
- Os marcadores moleculares utilizados revelaram resultados divergentes nas análises da estrutura genética de populações de *E. pleosticta*.
- 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, com a formação de uma meta-população, por possíveis efeitos de deriva genética e/ou endogamia.
- Faz-se necessário ressaltar a importância na conservação de remanescentes de Mata Atlântica estudados para a manutenção da diversidade genética da espécie estudada.

## REFERÊNCIAS

- 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. Comunidade de Abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em remanescentes de Mata Estacional Semidecidual sobre Tabuleiro no Estado do Rio de Janeiro. **Neotropical Entomology**, v.37, p.118-125. 2008.
- AIZEN, M.A.; FEISENGER, P. Habitat fragmentation, native insect pollinators, and feral honey bees in Argentine "Chaco Serrano". **Ecological Applications**, v.4, p.378-392. 1994.
- ARIAS, M.C.; BRITO, R. M.; FRANCISCO, F.O.; MORETTO G.; DE OLIVEIRA, F. F.; SILVESTRE, D; SHEPPARD, W. S. Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. **Apidologie**, v.37 p. 259–274. 2006.
- ARIAS, M.C.; FRANCISCO, F.O.; SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. In: MELO, A.R.; ALVES-DOS-SANTOS, I. **Apoidea Neotropica: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Editora UNESC, Criciúma, p.305-309. 2003.
- ARIAS, M.C.; INFANTE-MALACHIAS, M.E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In MATIOLI, S.R. (ed)., **Biologia Molecular e Evolução**, Ribeirão Preto: Holos, p. 143-152. 2001.
- ARMBRUSTER, W.S. Within-habitat heterogeneity in baiting samples of male euglossine bees: possible causes and implications. **Biotropica**, v.25, p.122-128. 1993.
- ATTARDI, G. Animal mitochondrial DNA: na extreme example genetic economy. **International Review Cytology**, v.93, p.93-145. 1985.
- AUGUSTO, S.C.; GARÓFALO, C.A. Nesting biology and social structure of *Euglossa* (*Euglossa*) *townsendi* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossini), **Insecta Sociata**, v.51, p.400-409. 2004.
- AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. 2a. ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. 2004.
- BECKER, P.; MOURE, J.S.; PERALTA, F.J.A. More about Euglossine bees in Amazonian forest fragments. **Biotropica**, v.23, p.586-591. 1991.

BOUGA, M.; HARIZANIS, P.C.; KILIAS, G.; ALAHOTIS, S. Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR-RFLP analysis of three DNAm segments, **Apidologie**, v.36, p.335-344. 2005.

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

BROSI, B.J.; DAILY, G.C.; SHIH, T.M.; OVIEDO, F.; DURÁN, G. The effects of forest fragmentation on bee communities in tropical countryside. **Journal of Applied Ecology**, v.45, p.773-783. 2008.

CALCAGNOTTO, D. Taxas de evolução e o relógio molecular. In: MATIOLI, F.M.C.F. (ed.) **Biologia Molecular e Evolução**, 2001. p.52-63.

CAMERON, S.A; DERR, J.N.; AUSTIN, A.D.; WOOLLEY, J.B.; WHARTON R.A. The application of nucleotide sequence data to phylogeny of the Hymenoptera: a review, **Journal Hymenoptera Research**, v.1, p.63-79. 1992.

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

CHA, S.Y.; YOON, H.J.; LEE, E.M.; YOON, M.J.; HWANG, J.S.; JIN, B.R.; HAN, Y.S.; KIM, I. The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the bumblebee, *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae). **Gene**, v.392, p.206-220. 2007.

CHENUIL, A. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects, **Genetica**, v.127, 101-120. 2006.

COLLET, T.; ARIAS, M.C.; DEL LAMA, M.A. 16S DNAm variation in *Apis mellifera* detected by PCR-RFLP, **Apidologie**, v.38, p.1-8. 2007.

COLLET, T.; FERREIRA, K.M.; ARIAS, M.C.; SOARES, A.E.E.; DEL LAMA, M.A. Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI-COII patterns. **Heredity**, v.97, p.329-335. 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.

CROZIER, R.H. Counter-intuitive property of effective population size. **Nature**, v.262, p. 384. 1976.

CROZIER, R.H. Evolutionary genetics of the Hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, v.22, p.263-268. 1977.

CROZIER, R. H.; CROZIER Y.C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. **Genetics**, v.133, 97-117. 1993.

DI BITETTI, M.S.; PLACCI, G.; DIETZ, L.A. **Uma visão de biodiversidade da ecorregião Florestas do Alto Paraná – Bioma Mata Atlântica**: planejando a paisagem de conservação da biodiversidade e estabelecendo prioridades para ações de conservação. Washington, D. C.; World Wildlife Fund, 2003.

DICK, C.W.; ROUBIK, D.W.; GRUBER, K.F., BERMINGHAM, E. Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography, **Molecular Ecology**, v.13, p.3775-3785. 2004.

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

DODSON, C.H.; HILLS, H.G. Gas chromatography of orchid fragrances. **American Orchid Society Bulletin**, v.35, p.720-25. 1966.

DOWTON, M.; AUSTIN, A.D. Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships, **Evolution**, v.91, p.9911-9915. 1994.

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

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50. 2005.

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, p.220. 1998.

FOSTER, C.B.; ASWATH, K.; CHANOCK, S.J.; MCKAY, H.F.; PETERS, U. Polymorphism analysis of six selenoprotein genes: support for a selective sweep at the glutathione peroxidase 1 locus (3p21) in Asian populations. **BMC Genetic**, v.7, p.56. 2006.

FRANCK P., CAMERON E., GOOD G., RASPLUS J.-Y., OLDROYD B.P. Nest architecture and genetic differentiation in a species complex of Australian stingless bees. **Molecular Ecology**, v.13, p.2317–2331. 2004.

FRANCISCO, F.O. **Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão Plebeia remota: análise do DNA mitocondrial e microssatélites**. Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. P. 147. 2002.

FREEMAN, S.; HERRON, J.C. **Ánalyse evolutiva**, 4. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed. p. 270, 2009.

GARÓFALO, C.A. Comportamento de nidificação e estrutura de ninhos de *Euglossa cordata* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini), **Revista Brasileira de Biologia**, v.52, p.187-198. 1992.

GIANGARELLI, D.C.; FREIRIA, G.A.; COLATRELI, O.P.; SUZUKI, K.M.; SOFIA, S.H. *Eufriesea violacea* (Blanchard): a euglossine species potentially sensitive to forest patch deterioration in Brazil. **Neotropical Entomology**, no prelo. 2009.

HALL, H.G.; SMITH, D.R. Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA, **Proceedings Natural Academic Society**, v.88, p.4548-4552. 1991.

HANATAKA, T.; GALETTI Jr, P.M. RAPD Markers indicate the occurrence of structured population in a migratory freshwater fish species **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p.19-25. 2003.

HARTL, D.L. **Princípios de Genética de populações**, 3. ed. Ribeirão Preto, SP: Ed. FUNPEC. p. 41-42, 2008.

HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. **Molecular systematics**, Sinauer Associates, Massachusetts. 1996.

INSUAN, S.; DEOWANISH, S.; KLINBUNGA, S.; SITTIPRANEED, S.; SYLVESTER, H.A.; WONGSIRI, S. Genetic differentiation of the giant honey bee (*Apis dorsata*) in Thailand analyzed by mitochondrial genes and microsatellites. **Biochemical Genetics**, v.45, p.345-361. 2007.

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

KEVAN, P.G.; PHILLIPS, T.P. The economic impacts of pollinator declines: an approach to assessing the consequences. **Conservation Ecology** 5, <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art8>. 2001.

LÓPEZ-URIBE, M.M.; DEL LAMA, M.A. Molecular identification of the species of the genus *Euglossa* Latreille (Hymenoptera: Apidae, Euglossini). **Neotropical Entomology**, v.36, p.712-720. 2007.

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

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics: design, analysis, and application**, Blackwell Publishing, Malden, 326p., 2004.

MATIOLI, S.R.; PASSOS-BUENO, M.R.S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S. R. (ed). **Biologia Molecular e Evolução**, Ribeirão Preto: Holos, cap. 15, p.153-161. 2001.

MCELROY, D.; MORAN, P.; BERMINGHAM, E.; KORNFIELD, I. REAP: An integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. **Journal of Heredity**, v.83, p.157-158. 1992.

MCLEAN, J.E.; HAY, D.E.; TAYLOR, E.B. Marine population structure in an anadromous fish: lifehistory influences patterns of mitochondrial DNA variation in the eulachon, *Thaleichthys pacificus*. **Molecular Ecology**, v.8, p.143-158. 1999.

METZGER, J.P. Estrutura da paisagem: o uso adequado de métricas. In: CULLEN JR, L.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PADUA, C. **Métodos de estudo em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**, Curitiba: Editora da UFPR, 2004. cap.16. p.423-454.

MEUSEL, M.S., MORITZ, R.F.A. Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. **Current Genetic**, v.24, p.539-543. 1993.

MILLER, M.P. **Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data**. Northern Arizona University, Flagstaff. 1997.

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. p.95-105. 1994.

MORATO, E.F. Estudos sobre comunidades de abelhas Euglossini. In: III Encontro Sobre Abelhas, Ribeirão Preto. **Anais do 3º Encontro Sobre Abelhas**. Ribeirão Preto : Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 1998. v.3. p.135-143. 1998.

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

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

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858. 2000.

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

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

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

PALUMBI, S.R. Nucleid Acids II: the polymerase chain reaction. In: HILLS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. **Molecular systematics**. Sinauer Associates, Massachusetts. p.169-180. 1996.

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

PERUQUETTI, R.C.; CAMPOS, L.A.O; COELHO, C.D.P.; ABRANTES, C.V.M.; LISBOA, L.C.O. 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: **Handbook of Experimental Pollination Biology**. p.375-395. 1983.

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.

PRUETT, C.L.; WINKER, K. The effects of sample size on population genetic diversity estimates in song sparrows *Melospiza melodia*. **Journal of Avian Biology**, v. 39, p. 252-256. 2008.

RAY, J.D. Fragment Length Calculator: a Windows 95 program for calculating DNA fragment length, **Journal of Heredity**, v.91, p.177-178. 2000.

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.

ROUBIK, D.W.; HANSON, P.E. **Orchid bees of Tropical America: Biology and field guide**, INBio Press, Heredita, Costa Rica. 2004.

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

SAIKI, R.K. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, **Science**, v.230, p. 1350-1354. 1985.

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.

SILVESTRE, D.; DOWTON, M.; ARIAS M.C. The mitochondrial genome of the stingless bee *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): sequence, gene organization and a unique tRNA translocation event conserved across the tribe Meliponini. **Genetic Molecular Biology**, v.31, p. 451-460. 2008.

SOARES, F.S.; MEDRI, M.E., 2002. Alguns aspectos da colonização da bacia do rio Tibagi In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (eds.) **A Bacia do Rio Tibagi**, Londrina: Editora dos Editores, 2002. p. 69-79.

SOFIA, S.H.; PAULA, F.M.; SANTOS, A.M.,; ALMEIDA, F.S.; SODRÉ, L.M.K. 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**, v.94, p217-222. 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.

SOLÉ-CAVA, A.J. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In MATIOLI, S.R., **Biologia Molecular e Evolução**, Ribeirão Preto: Holos, cap. 17, p.171-190, 2001.

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.

SOUZA, R.O.; CERVINI, M.; DEL LAMA, M.A.; PAXTON, R.J. Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera, Apidae). **Molecular Ecology Notes**, p. 1-5. disponível on line (11/8/2007). 2007.

STEFFAN-DEWENTER, I.; POTTS, S.G.; PACKER, L. Pollinator diversity and crop pollination services are at risk. **Trends in Ecology and Evolution**, v.12, doi:10.1016/j.tree.2005.09.004. 2005.

SUZUKI, K.M. **Análise genética de duas espécies de abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em áreas urbanas**. 2004. 50p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

TONHASCA, A.JR.; BLACKMER, J.L.; ALBURQUERQUE, G.S. Abundance and diversity of euglossine bees in the fragmented landscape of the Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v.34, p.416-422. 2002.

TONHASCA, A.Jr.; BLACKMER, J.L.; ALBUQUERQUE, G.S. Dispersal of euglossine bees between fragments of the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Tropical Ecology**, v.19, p. 99-102. 2003.

TOREZAN, J.M. Nota sobre a vegetação da bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (eds.) **A Bacia do Rio Tibagi**, Londrina: Edição dos Editores, p.103-107. 2002.

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**. Wallingford: C-A-B International. p.27-52. 1993.

VINSON, S.B.; FRANKIE, G.W.; BARTHELL, J. Threats to the diversity of solitary bees in a Neotropical dry forest in Central America. in: LASALLE J., GAULD I.D. (Eds.) **Hymenoptera and biodiversity**. Wallingford: C-A-B International. p.53-81. 1993.

WALDSCHMIDT, A.M., LOPES, L.A.; MARCO P.JR.; CAMPOS, L.A.O. 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.

WIDMER, A.; SCHMID-HEMPEL, P. The population genetic structure of a large temperate pollinator species, *Bombus pascuorum* (Scopoli) (Hymenoptera: Apidae). **Molecular Ecology**, v.8, p.387-398. 1999.

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.

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

WILLIAMS, N.M.; MINCKLEY, R.L.; SILVEIRA, F.A. Variation in native bee faunas and its implications for detecting community changes. **Conservation Ecology**, v.5 (1)[disponível em: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art7/>]. 2001.

WILSON, E.O. **The insect societies**. Cambridge: Belknap Press. 548p. 1971.

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

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 National Academy of Sciences**, 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 of London**, 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.