



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIELE ANTICO FREIRIA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DA ABELHA *EUFRIESEA*
VIOLACEA (HYMENOPTERA, APIDAE, EUGLOSSINI)**

Londrina
2011



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agrônomo do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

GABRIELE ANTICO FREIRIA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DA ABELHA *EUFRIESEA*
VIOLACEA (HYMENOPTERA, APIDAE, EUGLOSSINI)**

GABRIELE ANTICO FREIRIA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DA ABELHA *EUFRIESEA*
VIOLACEA (HYMENOPTERA, APIDAE, EUGLOSSINI)**

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

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Sofia

Londrina
2011

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F866d Freiria, Gabriele Antico.

Diversidade genética da abelha *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) / Gabriele Antico Freiria. – Londrina, 2011.
ix, 63 f. : il. + anexos no final da obra.

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, 2011.

Inclui bibliografia.

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

CDU 595.799

GABRIELE ANTICO FREIRIA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DA ABELHA *EUFRIESEA VIOLACEA*
(HYMENOPTERA, APIDAE, EUGLOSSINI)**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Maria Cristina Arias
USP - Instituto de Biociências

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

Londrina, 18 de fevereiro de 2011.

À minha família e amigos

AGRADECIMENTOS

A Coordenação Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e ao

Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, pelas condições fornecidas para o desenvolvimento deste trabalho;

A minha orientadora Profa. Dra. Silvia Helena Sofia, pelos ensinamentos, exemplo profissional, orientação, carinho, humanidade. Mas principalmente, por ter aberto tantas portas em meu caminho e por ter despertado em mim, por meio do seu entusiasmo e dedicação, o gosto pelas abelhas;

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

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida;

Aos professores Dr. Rogério Fernandes de Souza e Dr. Paulo Maurício Ruas pelo apoio e 'dicas' importantes durante o desenvolvimento deste trabalho e pelas valiosas sugestões no meu Exame de Qualificação;

À professora Dra. Leda Maria K. Sodré, pelo carinho, ensinamentos, inúmeros conselhos, exemplo profissional e por ensinar genética com tanto amor e dedica o, despertando o gosto e interesse dos seus alunos;

À professora Dra. Fernanda Simões de Almeida pelos ensinamentos, prontidão para ajudar e carinho.

À Profa. Dra. Maria Cristina Arias e Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza, membros da banca examinadora, pela disponibilidade em participar da avalia o deste trabalho;

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

Aos técnicos D rio e Melyssa pela ajuda permanente durante estes dois anos e aos demais funcionários deste Departamento pelo apoio prestado;

Aos colegas queridos do LAGEA e aos agregados queridos: Alessandra, Karen, Douglas, Caconde, Bruna, Carolina, Henrique, Natália, Dalita,

Yuldi, Willian – por todo auxílio, ensinamentos e também pelos momentos de descontração;

À Juliana Bombarda, por todo esforço concedido ao desenvolvimento deste trabalho e pelo apoio;

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 colegas do mestrado;

Aos meus amigos, Bárbara, Carolina, Camila, Glauce, Isabela, Isabel, Leandro, Emanuele, Márcio, Natália, Tatiane, Wanessa, Rafael e Yuldi. Pelas pessoas incríveis que são e por todo carinho;

Aos meus avôs: Rita (na memória) e Antônio (na memória); Maria e José. Pelo exemplo de vida, amor e carinho;

À minha tia, Inez, por todo amor e carinho;

Ao meu irmão Gustavo, que é um grande irmão. Por me ajudar tanto e fazer tudo parecer simples, fácil de resolver e até mesmo engraçado;

Aos meus pais, Nelma e Ednaldo, pelo amor incondicional. Por compreenderem e respeitarem as minhas escolhas e pela motivação em todos os momentos;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

FREIRIA, G. A. **Diversidade genética da abelha *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini)**. 2011. 80f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. 2011.

RESUMO

Neste estudo seis 'populações' de *Eufriesea violacea* tiveram sua diversidade e estrutura genéticas estimadas, por meio de marcadores microssatélites e mitocondriais obtidos por PCR-RFLP. As coletas dos machos destas abelhas foram realizadas em remanescentes de Mata Atlântica localizados nos estados do Paraná (PR1, PR2 e PR3), São Paulo (SP1), Santa Catarina (SC1) e Rio Grande do Sul (RS1). As análises de microssatélites envolveram a amplificação de seis locos, que revelaram uma heterozigotidade média total esperada de 0,735, indicando uma alta diversidade genética para as amostras analisadas. A análise da variância molecular (AMOVA) revelou uma baixa diferenciação genética entre as áreas ($\Phi_{ST} = 0,04465$), assim como a análise de estruturação genética via estatística bayesiana. De modo diverso, as estimativas de D_{EST} indicaram diferenciação genética entre algumas localidades: PR1-SP1 ($D_{EST} = 0,168$); PR2-PR3 ($D_{EST} = 0,227$); PR3-SP1 ($D_{EST} = 0,315$). A frequência de machos diplóides encontrada foi de 3,08%. Os marcadores mitocondriais foram obtidos com base na amplificação de um segmento, de 400 pb, da região 16S do DNAm_t e restrição com duas endonucleases (*DraI* e *Asel*). Foram encontrados quatro haplótipos compostos distintos (AB, BA, BC e AD). No remanescente PR1 foi observada a presença de dois haplótipos, ambos em frequências elevadas e não muito distintas (BC: 57,5%; AD: 42,5%). Nos fragmentos PR2 e SC1 houve a dominância dos haplótipos, AB (97,5%) e BC (2,5%), respectivamente. Os haplótipos BA (2,5%) e AD (2,5%) foram encontrados em menor frequência nos fragmentos PR2 e SC1, respectivamente. Nos remanescentes PR3, SP1 e RS1 apenas um haplótipo foi encontrado, respectivamente, AB, AB e BA. A análise da variância molecular (AMOVA) indicou forte diferenciação genética ($\Phi_{ST} = 0,82112$) entre as amostras dos remanescentes estudados. A análise, com base nestes marcadores mitocondriais, entre os pares de amostras dos seis fragmentos florestais sugere a existência de três grupos, assim constituídos: um agrupamento formado por abelhas dos fragmentos PR2, PR3 e SP1, outro agrupamento reunindo as amostras das áreas PR1 e SC1 e, o fragmento SC1 aparecendo isoladamente. O mesmo agrupamento foi evidenciado pela análise bayesiana. A discordância entre as análises reforça a ideia que as diferentes taxas evolutivas do genoma mitocondrial e locos de microssatélites, podem fornecer informações diferentes, as quais devem ser consideradas e analisadas com cuidado na tentativa de conhecer melhor a estruturação genética das populações.

Palavras-chave: *Eufriesea violacea*. Marcadores microssatélites. DNAm_t. PCR-RFLP. Estrutura e diversidade genética. Macho-diploide.

FREIRIA, G. A. **Genetic diversity of the orchid bee *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini)**. 2011. 80f. Master Dissertation in Genetics and Molecular Biology. Universidade Estadual de Londrina, PR. 2011.

ABSTRACT

In this study six 'populations' of *Eufriesea violacea* had their genetic structure and diversity estimated using microsatellite markers and mitochondrial obtained by PCR-RFLP. The samplings of male bees were carried out in Atlantic Forest remnants located in the states of Paraná (PR1, PR2, and PR3), São Paulo (SP1), Santa Catarina (SC1) and Rio Grande do Sul (RS1). The microsatellite markers involved amplification of six loci, which showed an average total expected heterozygosity of 0.735, indicating a high genetic diversity for the samples. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed a low genetic differentiation between areas ($\Phi_{ST} = 0.04465$), as well as analysis of genetic structure via bayesian statistics. Otherwise, the estimates of D_{EST} indicated genetic differentiation between some localities: PR1-SP1 ($D_{EST} = 0.168$); PR2 to PR3 ($D_{EST} = 0.227$), PR3-SP1 ($D_{EST} = 0.315$). The frequency of diploid males found was 3.08%. Mitochondrial markers were obtained through the amplification and restriction (with *DraI* and *AselI*) on a 16S-mtDNA gene segment of 400-bp size. Four distinct compounds haplotypes (AB, BA, BC and AD) were found. In the remnant PR1 was observed the presence of two haplotypes, both found in high and not very different frequencies (BC: 57.5%, AD: 42.5%). In the fragments PR2 and SC1 was the dominance of haplotypes, AB (97.5%) and BC (2.5%), respectively. Haplotypes BA (2.5%) and AD (2.5%) were found less frequently in fragments PR2 and SC1, respectively. In the remaining PR3, SP1 and RS1 only one haplotype per area was found, as follows: AB, AB and BA, respectively. Analysis of molecular variance (AMOVA) indicated high genetic differentiation ($\Phi_{ST} = 0.82112$) between samples from six forest fragments. The analysis, based on these mitochondrial markers, between pairs of samples these fragments suggests the existence of three groups of bees, as follows: a group formed by individuals from fragments PR2, PR3 and SP1; another group clustering bees from PR1 and SC1 areas and, a sample from SC1 area appearing separately. This same group was evidenced by Bayesian analysis. The disagreement between the analysis between nuclear and mtDNA reinforces that the idea of different evolutionary rates of mitochondrial genome and microsatellite loci may provide different information, which should be carefully considered and analyzed in an attempt to better understand the genetic structure of populations.

Keywords: *Eufriesea violacea*. Microsatellite markers. MtDNA. PCR-RFLP. Genetic structure and diversity. Diploid male.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição geográfica de dez espécies de *Eufriesea* e relação dos estados brasileiros nos quais estas espécies são encontradas no bioma Mata Atlântica, segundo Nemésio (2009).22

ARTIGO

Tabela 1 - Localização, formação florestal, tamanho e estado de conservação dos locais de coleta de *E. violacea*.37

Tabela 2 - Distância geográfica (km) entre os seis fragmentos florestais estudados.39

Tabela 3 - Heterozigosidade média total esperada (H_T) e desvio padrão associado ($\pm dp$), heterozigosidade intra-loco e heterozigosidade média esperada (\bar{H}_{media}) e desvio padrão associado ($\pm dp$) para as diferentes populações de *E. violacea* provenientes dos seis fragmentos florestais estudados.46

Tabela 4 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) e variância da frequência alélica (Φ_{ST}) das populações de *E. violacea* dos seis fragmentos florestais estudados para marcadores microsatélites47

Tabela 5 - Valores de Φ_{ST} par a par abaixo da diagonal, valores de D_{EST} par a par acima da diagonal. Todos os valores de Φ_{ST} foram significativos ($p < 0,01$).....48

Tabela 6 - Número de indivíduos analisados (N), número de machos diplóides (M_{2n}), número de locos que revelaram machos diplóides, probabilidade de um indivíduo ser diplóide (P_{het}), porcentagem de locos polimórficos (P %), frequência total (Φ_T %) de machos diplóides e frequência de machos diplóides encontrados por fragmento ($\Phi_{fragmento}$ (%))49

Tabela 7 - Padrões de fragmentos de restrição (estimado em pares de bases) observado para o fragmento da região 16S do DNAm_t, produzidos com as endonucleases *Asel* e *DraI*. As letras A-D

representam os haplótipos encontrados com cada enzima de restrição.....	51
Tabela 8 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) e variância da frequência gênica (Φ_{ST}) das populações de <i>E. violacea</i> dos seis fragmentos florestais estudados, para os marcadores mitocondriais obtidos por PCR-RFLP.....	53
Tabela 9 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) e comparação da variância da frequência gênica (Φ_{ST}) par a par, entre as amostras das 'populações' de <i>E. violacea</i> dos seis fragmentos florestais estudados; resultados obtidos por meio dos marcadores mitocôndrias (região 16S) PCR-RFLP.	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Macho (a) e fêmea (b) de *Eufriesea violacea*.....23
- Figura 2** - Distribuição geográfica de *Eufriesea violacea*. Estados brasileiros: RS = Rio Grande do Sul; SC= Santa Catarina; PR= Paraná; SP= São Paulo; RJ= Rio de Janeiro; ES= Espírito Santo; MG= Minas Gerais; MT= Mato Grosso; GO= Goiás; BA= Bahia.24

ARTIGO

- Figura 1** - Localização geográfica dos fragmentos florestais de Mata Atlântica estudados.36
- Figura 2** - Número de alelos obtidos para os locos de microssatélite (Eln 2J, Eln 7J, Eln 12b, Eln 12J, Egc 17 e Egc 18) em *E. violacea* nos seis fragmentos florestais estudados (**PR1**= Fazenda Santa Maria; **PR2** = Parque Estadual “Mata dos Godoy”; **PR3** = Fazenda Monte Alegre; **SP1** = imediações da Base da Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (ESCAS); **RS1** = Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPNP- Pró-Mata); **SC1** = Estação Experimental de Urussanga).....45
- Figura 3** - Diferentes números de populações (*K*) testados e os deltas(*K*) correspondentes.....48
- Figura 4** - Perfil eletroforético, em três geis de poliacrilamida 9%, mostrando os 4 haplótipos (A-D) obtidos para a região 16S digerida com a enzima *DraI*, em machos de *E. violacea* coletados nos fragmentos de mata Fazenda Santa Maria (PR1), Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPNP- Pró-Mata) (RS1) e imediações da Base da Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (ESCAS) (SP1). Nas canaletas indicadas com os códigos M1 e M2 estão, respectivamente, os marcadores de peso molecular de 25 e 50 pb. O peso molecular, em pares de base (pb), das diferentes

bandas dos marcadores de peso molecular e dos fragmentos de restrição estão indicados em verde e azul, respectivamente.50

Figura 5 - Frequência e padrão de distribuição dos quatro haplótipos-compostos de machos de *E. violacea* nos seis fragmentos florestais estudados (PR1-RS1), produzidos pela restrição de um segmento da região 16S do DNAm, com as endonucleases *Asel* e *DraI*. **PR1** = Fazenda Santa Maria; **PR2** = Parque Estadual “Mata dos Godoy”; **PR3** = Fazenda Monte Alegre; **SP1** = imediações da Base da Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (ESCAS); **RS1** = Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPNP- Pró-Mata); **SC1** = Estação Experimental de Urussanga.52

Figura 6 - Contribuição proporcional das diferentes populações ancestrais para cada um dos indivíduos dos diferentes fragmentos, considerando $K=3$. **PR1** = Fazenda Santa Maria; **PR2** = Parque Estadual “Mata dos Godoy”; **PR3** = Fazenda Monte Alegre; **SP1** = imediações da Base da Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (ESCAS); **RS1** = Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPNP- Pró-Mata); **SC1** = Estação Experimental de Urussanga.55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	AS ABELHAS EUGLOSSINI	17
2.2	BIOGEOGRAFIA E FILOGEOGRAFIA DE EUGLOSSINI	19
2.3	A DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO <i>EUFRIESEA</i> E DA ESPÉCIE <i>EUFRIESEA VIOLÁCEA</i>	21
2.4	GENÉTICA DE ABELHAS E MACHOS DIPLÓIDES	24
2.5	O DNA MITOCONDRIAL	26
2.6	MARCADORES MITOCONDRIAIS OBTIDOS POR PCR-RFLP	27
2.7	MARCADORES MICROSSATÉLITES	29
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVOS GERAIS	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	ARTIGO	32
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXOS	76
ANEXO A	- Freqüências dos alelos de microsatélite encontrados nas amostras de machos dos seis remanescentes florestais estudados (PR1, PR2, PR3, SP1, RS1 e RS3) para os seis locos analisados. pb = tamanho estimado em pares de base.	77
ANEXO B	- Análise da Variância Molecular (AMOVA) e comparação da variância da frequência gênica (Φ_{ST}) par a par, entre as populações de <i>E. violacea</i> dos seis fragmentos florestais estudados para marcadores microsatélites.	79
ANEXO C	- Machos diplóides encontrados e locos para os quais eles foram heterozigotos (permitindo a identificação como diplóides).	80

1 INTRODUÇÃO

A tribo Euglossini é um grupo de abelhas restrito a região neotropical e difere em vários aspectos de sua biologia dos demais Apoidea. Esta tribo está inserida dentro do grupo de abelhas corbiculadas, juntamente com Apini, Bombini e Meliponini, sendo todas elas pertencentes à família Apidae (MICHENER, 2000). Contudo, várias são as características que diferenciam as abelhas Euglossini dos demais Apidae corbiculados, entre estas merecem destaque: o comportamento peculiar dos machos de coletar fragrâncias, a presença de uma língua bastante longa, o tegumento frequentemente metálico e os diferentes níveis de organização social do grupo (DRESSLER, 1982; ROUBIK; HANSON, 2004).

Desde meados de 1960, quando Dodson *et al.* (1969) mostraram que os machos destas abelhas poderiam ser atraídos por essências químicas, o conhecimento sobre o grupo aumentou significativamente. Contudo, ainda existem muitas lacunas no conhecimento da biologia destas abelhas, também conhecidas por “abelhas das orquídeas” (DRESSLER, 1982).

Sem dúvida alguma, uma das principais lacunas é a falta de informações sobre a diversidade genética das populações das mais de 200 espécies que compõem a tribo. É sabido que as abelhas e outros himenópteros exibem naturalmente uma variação genética inferior a de outros grupos de insetos, o que está relacionado com o sistema haplodiplóide de determinação sexual (PAMILLO; VARVIO-AHO; PEKKARINEN, 1978; BERKEIHAMER, 1982; SHOEMAKER; COSTA; ROSS, 1992; PACKER; OWEN, 2001). Mesmo assim a conservação genética das abelhas tem recebido pouca atenção da comunidade científica (ZAYED; PACKER, 2005).

Esta menor variabilidade genética, naturalmente presente nas abelhas, aliada ao fato de alguns estudos apontarem os Euglossini como sensíveis à fragmentação florestal e a outras formas de interferência antrópica (BROSI, 2009; GIANGARELLI *et al.*, 2009) tornam os estudos sobre diversidade e estrutura genética em Euglossini necessários e relevantes.

Um grupo de marcadores considerados muito informativos para estimativas de diversidade e estrutura genética são os microssatélites. Devido a características como, alto polimorfismo e abundância no genoma (HILLIS, *et al.* 1996; AVISE, 2004).

Existem também poucos estudos filogeográficos envolvendo Euglossini, mesmo sendo estes estudos muito importantes, pois fornecem dados para o entendimento de padrões evolutivos e sobre a história de diversificação das espécies (AVISE, 2000). Os estudos filogeográficos baseados em ferramentas moleculares são praticamente inexistentes na tribo Euglossini. As únicas exceções são os trabalhos de Dick *et al.* (2004), no qual foram realizadas inferências filogeográficas de 14 espécies da tribo por meio do sequenciamento de um gene mitocondrial e, de Ramírez *et al.* (2010), baseado no sequenciamento de quatro locos do genoma de mais de 100 espécies de Euglossini, que permitiu inferências sobre a diversificação da tribo. Neste contexto, mais estudos se fazem necessários, pois os padrões de distribuição de muitas espécies de Euglossini são ainda pouco compreendidos.

Os marcadores mitocondriais têm se mostrado bastante promissores aos estudos filogeográficos, fato que está intimamente relacionado com algumas características do DNAm: herança exclusivamente materna (na maioria dos grupos), ausência de recombinação e sistema de reparo ineficiente que permite grande polimorfismo intraespecífico (AVISE *et al.*, 2004). O conjunto diversificado de técnicas disponíveis e aplicáveis ao estudo do genoma mitocondrial, constitui outro atrativo para análises genéticas envolvendo esta molécula.

Neste estudo, marcadores microssatélites e mitocondriais (PCR-RFLP) foram empregados na análise de populações da espécie *Eufriesea violacea* de quatro estados brasileiros – Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo – os quais abrangem uma porção representativa da área de ocorrência geográfica desta abelha, que se estende do estado do Espírito Santo à Argentina e Paraguai, sendo a maior parte desta restrita aos domínios de Mata Atlântica. Alguns estudos têm também apontado que *Eufriesea violacea* é uma espécie aparentemente sensível à degradação ambiental (SOFIA; SUZUKI, 2004;

GIANGARELLI *et al.*, 2009). Apesar disto, ainda são escassas as informações sobre a diversidade de suas populações presentes em remanescentes de Mata Atlântica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ABELHAS EUGLOSSINI

A região Neotropical é área de ocorrência de um grupo de abelhas peculiar, pertencente à tribo Euglossini (KIMSEY, 1987; ROUBIK; HANSON, 2004). Estas abelhas são restritas a esta região zoogeográfica, provavelmente, porque se originaram em um período geológico onde a América do Sul se encontrava isolada dos demais continentes (REBÊLO, 2001). Ao todo, são mais de 200 espécies descritas para esta tribo de Apidae, divididas em cinco gêneros: *Euglossa*, *Eulaema*, *Eufriesea*, *Exaerete* e *Aglae* (MICHENER, 2000; RAMIREZ *et al.*, 2002). Estudos recentes sugerem que algumas destas espécies podem ser sensíveis à fragmentação florestal e outras formas de degradação antrópica (BROSI, 2009; GIANGARELLI *et al.*, 2009).

Os Euglossini são extremamente importantes à polinização na sua área de ocorrência, o que está intimamente relacionado à grande capacidade de voo que muitas espécies possuem (DRESSLER, 1968; JANZEN, 1971; ROUBIK; HANSON, 2004). Apresentam relações particulares com plantas de diversas famílias, especialmente com as da família Orchidaceae (DODSON, 1969; WILLIAMS; WHITTEN, 1983; REBÊLO, 2001). Estima-se que pelo menos 650 espécies de orquídeas sejam polinizadas por machos de Euglossini (ACKERMAN, 1983). A íntima relação existente entre este grupo de abelhas e as orquídeas fez com que elas ficassem popularmente conhecidas como “as abelhas das orquídeas” (DRESSLER, 1982).

A tribo Euglossini forma junto com as tribos Apini, Bombini e Meliponini o grupo das abelhas corbiculadas (MICHENER, 2000). Estas abelhas são assim conhecidas, porque as fêmeas possuem uma estrutura em forma de ‘cesto’ ou corbícula nas pernas posteriores, que serve para que elas levem recursos como pólen e resina vegetal para os ninhos. Vários aspectos diferenciam os Euglossini dos demais Apidae corbiculados como: a presença de uma língua bastante longa, o

tegumento frequentemente metálico e os diferentes níveis de organização social encontrado dentro da tribo (ROUBIK; HANSON, 2004); dentre as abelhas corbiculadas, a tribo Euglossini é o único grupo onde o comportamento eussocial não é nitidamente encontrado (MICHENER, 2000); de modo diverso, dentro do grupo de Apidae corbiculados, todos os Apini e Meliponini são altamente sociais, ao passo que os Bombini são considerados primitivamente eussociais (RAMÍREZ *et al.*, 2002; SOUCY *et al.*, 2003). Alguns autores, contudo, identificaram a ocorrência de comportamento primitivamente eussocial para algumas espécies de Euglossini (AUGUSTO; GARÓFALO, 1994, 2009, 2010; GARÓFALO, 1985, 1992).

Outra peculiaridade dos Euglossini é o comportamento dos machos de coletar fragrâncias. Acredita-se que a coleta de fragrâncias esteja relacionada com atividades reprodutivas, no entanto, não se sabe exatamente, até o momento, o verdadeiro papel dos compostos aromáticos nestas atividades (WILLIAMS; WHITTEN, 1983; ELTZ *et al.*, 2007). Para coletar estes aromas, os machos escovam a fonte com os tarsos anteriores e transferem as substâncias coletadas para as tíbias posteriores que são modificadas para o armazenamento e metabolização dos compostos (DODSON, 1969; WILLIAMS; WHITTEN, 1983; ROUBIK; HANSON, 2004). As substâncias aromáticas são coletadas em flores de orquídeas e outras fontes florais e extraflorais (DRESSLER, 1982). Dentre as fontes de compostos aromáticos não-florais estão madeiras podres, frutos em decomposição, tronco de árvores e fezes (ACKERMAN, 1983; ELTZ *et al.*, 2007).

Devido ao comportamento de coletar compostos aromáticos, os machos de Euglossini são facilmente atraídos por terpenóides e hidrocarbonetos aromáticos sintéticos análogos àqueles presentes nas fragrâncias florais (DRESSLER, 1982; ELTZ *et al.*, 2005, 2007). A atratividade dos machos por compostos semelhantes aos que eles coletam nas flores permitiu que o conhecimento sobre o grupo aumentasse significativamente (CAMERON, 2004; ROUBIK; HANSON, 2004; NEMÉSIO, 2009). Contudo, ainda existem muitas lacunas no conhecimento da biologia dos Euglossini.

2.2 BIOGEOGRAFIA E FILOGEOGRAFIA DE EUGLOSSINI

A distribuição geográfica das espécies está intimamente associada com o clima, vegetação e competição com espécies que ocupam nichos ecológicos semelhantes. Locais para nidificação, fontes de resina, pólen e néctar são vitais para a distribuição das abelhas. Certamente, a distribuição das espécies também é influenciada por eventos geológicos (ROUBIK; HANSON, 2004). De acordo com Silveira *et al.* (2002), embora muitos estudos tenham descrito os padrões de distribuição geográfica de algumas espécies de abelhas, poucos estudos os relacionam com eventos geológicos.

A relação filogenética precisa dos Euglossini com as outras tribos do grupo das abelhas corbiculadas ainda é incerta (CAMERON, 2004). Enquanto a filogenia realizada com base na sequência de DNA de alguns genes sugere que a tribo Euglossini se encontra mais relacionada à Apini (CAMERON, 2004), os estudos morfológicos sugerem que as tribos Bombini e Euglossini são grupos evolutivamente mais próximos (REBÊLO, 2001; CAMERON, 2004). De acordo com Cameron (2004) estas incongruências, entre dados moleculares e morfológicos, dificultam o entendimento da origem da tribo Euglossini.

O registro fóssil indica que o gênero *Euglossa* e possivelmente o gênero *Eufriesea* existam há pelo menos 20 milhões de anos (Oligoceno-Mioceno) (ENGEL, 1999; ROUBIK; HANSON, 2004). Até o momento foram encontrados dois fósseis de abelhas Euglossini. Os dois estão preservados em âmbar e foram encontrados na República Dominicana. Um deles (*Paleoeuglossa melissiflora*) teve sua idade estimada entre 15 e 45 milhões de anos e foi considerado pelo seu descritor (POINAR, 1998) como um ancestral de *Eulaema/Eufriesea*. No entanto, Engel (1999) argumenta que este fóssil pertencente ao gênero *Eufriesea*. O outro fóssil (*Euglossa moronei*) foi descrito por Engel (1999) e teve sua idade estimada em 20 milhões de anos. Segundo Engel (1999) este fóssil representa uma espécie extinta do gênero *Euglossa*.

Os estudos biogeográficos, baseados em filogenia por meio de caracteres morfológicos, sugerem que um possível ancestral comum de Euglossini e

Bombini viveu no antigo supercontinente da Pangea. A população ancestral destas abelhas provavelmente se dividiu no final do Cretáceo (início do Triássico) quando este supercontinente se separou em dois blocos menores: a Laurásia ao norte e Gondwana ao sul (REBÊLO, 2001).

A separação fez com que a população ancestral ficasse sujeita a pressões seletivas diferentes nos dois novos continentes. O fato das abelhas Euglossini serem exclusivas da região neotropical enquanto os Bombini são primitivamente holoárticos, sendo abundantes em áreas temperadas frias, faz com que os pesquisadores acreditem que o grupo restrito ao sul deu origem aos Euglossini e o ao norte aos Bombini (REBÊLO, 2001). Dos continentes que possuem origem Gondwanica (América do Sul, África e Austrália), os Euglossini são encontrados apenas na América do Sul. Deste modo, acredita-se que o desenvolvimento da tribo se deu no começo do Terciário, depois da separação deste continente da África (REBÊLO, 2001). A separação deve ter ocorrido no Eoceno Superior aproximadamente entre 42 e 38 milhões de anos (MOURE, 1951 *apud* REBÊLO, 2001). Provavelmente os Euglossini ficaram restritos a América do Sul, durante todo o período de isolamento deste continente, impedidos de se dispersarem para a América do Norte porque o istmo do Panamá ainda estava aberto (REBÊLO, 2001).

Mais recentemente, um estudo amplo, baseado no sequenciamento de quatro locos do genoma de mais de 100 espécies de Euglossini, permitiu inferências sobre a diversificação da tribo (RAMÍREZ *et al.*, 2010). O estudo indica que os eventos de diversificação ocorreram durante o Mioceno e o Plioceno e que foram fortemente influenciados pela capacidade de dispersão destas abelhas através de barreiras geográficas. Além disto, o estudo identificou sete áreas de endemismo para os Euglossini na região Neotropical: 1) América Central; 2) Zona Endêmica do Panamá; 3) Choco; 4) Andes; 5) Amazônia; 6) Floresta Atlântica e 7) Corredor do Paraguai. Com a região Amazônica exibindo a maior riqueza de espécies e o Corredor do Paraguai a menor.

No que diz respeito aos estudos filogeográficos ainda existe muito por se fazer, à exceção do trabalho de Dick *et al.* (2004) não existe nenhum trabalho na literatura sobre filogeografia de espécies de Euglossini. De acordo com Avise

(2009) os estudos filogeográficos devem buscar associações entre o arranjo espacial e as linhagens genéticas. No estudo de Dick *et al.* (2004) foi realizada a análise de um segmento gene Citocromo Oxidase I (COI) do DNA mt de 14 espécies da tribo, coletadas na cordilheira dos Andes e na Bacia Amazônica. Os autores buscaram responder a seguinte pergunta: Qual o grau de separação evolutiva entre as populações que habitam as florestas tropicais do leste e as que habitam as áreas que margeiam o oeste da região norte da cordilheira dos Andes? (Dick *et al.*, 2004). O estudo revelou ausência de separação evolutiva entre as abelhas que habitam estas áreas. Os autores discutem que a semelhança encontrada pode estar associada à origem recente (Terciário) das espécies de Euglossini e a rápidas expansões populacionais.

2.3 A DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO *EUFRIESEA* E DA ESPÉCIE *EUFRIESEA VIOLACEA*

Dentre os cinco gêneros de Euglossini, *Eufriesea* é o mais amplamente distribuído. Nos limites ao norte, os registros indicam a ocorrência de *E. simillima* em Maguarichic e Barranca Del Cobre, no México. Enquanto no extremo oposto, ao sul, os registros indicam *E. tucumana* e *E. chalybeata*, respectivamente, em Tucumán e Córdoba, na Argentina (REBÊLO, 2001).

Contudo, as cerca de 60 espécies deste gênero apresentam padrões bem distintos de distribuição, podendo ser agrupadas de acordo com seis zonas biogeográficas: 1) Terras Baixas da América Central; 2) Zona Endêmica do Panamá; 3) Corredor da Venezuela; 4) Bacia do Amazonas; 5) Terras Altas do Brasil; 6) Corredor Paraguaio (KIMSEY, 1982). Com relação à localização desta última zona biogeográfica, o Corredor do Paraguai inclui o Paraguai e regiões do Brasil, Bolívia e Argentina próximas ao Paraguai. Seis espécies têm sua distribuição atribuída a este corredor: *E. violacea*, *E. chalybeata*, *E. combinata*, *E. mariana*, *E. tucumana* e *E. violacens* (KIMSEY, 1982). Em um estudo recente, foram descritas as distribuições

geográficas e áreas de ocorrência na Mata Atlântica de dez espécies do gênero *Eufriesea*. Os dados estão dispostos na Tabela I (NEMÉSIO, 2009).

Tabela 1 - Distribuição geográfica de dez espécies de *Eufriesea* e relação dos estados brasileiros nos quais estas espécies são encontradas no bioma Mata Atlântica, segundo Nemésio (2009).

Espécies	Distribuição Geográfica	Estados de ocorrência, na Mata Atlântica
<i>Eufriesea auriceps</i>	Paraíba ao Paraguai	Paraíba, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina
<i>Eufriesea atlantica</i>	Sergipe ao Rio de Janeiro, na região Leste do Brasil	Sergipe, Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo
<i>Eufriesea brasilianorum</i>	Espírito Santo	Espírito Santo
<i>Eufriesea dentilabris</i>	Espírito Santo ao Paraná	Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Paraná
<i>Eufriesea mussitans</i>	Amplamente distribuída pela região Neotropical, México ao Sudeste do Brasil	Pernambuco, Alagoas, Rio de Janeiro e São Paulo
<i>Eufriesea nigrohirta</i>	Estado da Bahia e Minas Gerais	Bahia e Minas Gerais
<i>Eufriesea smaragdina</i>	Espírito Santo a Santa Catarina	Minas, Espírito Santo, Paraná e Santa Catarina
<i>Eufriesea surinamensis</i>	México ao Estado de São Paulo	Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo
<i>Eufriesea violacea</i>	Amplamente distribuída pelo sudeste Brasileiro (ocorre também em Minas Gerais e no Mato Grosso do Sul) até o Paraguai e a Argentina	Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul
<i>Eufriesea aeneiventris</i>	Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro	Espírito Santo, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro

A espécie *E. violacea* (Figura I) tem sua ocorrência descrita para áreas presentes no Brasil, Paraguai e Argentina (Figura II). Estes dois últimos países representam, respectivamente, os limites oeste e sul da espécie (KIMSEY, 1982). No Brasil, a espécie já foi encontrada nos estados do Rio Grande do Sul, Santa

Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo (NEMÉSIO, 2009) (Tabela 1). Em vários outros estados do norte e nordeste do país, ainda não há registros de sua ocorrência, sugerindo que *E. violacea* teria sua distribuição mais relacionada com os estados do sul e sudeste. Deste modo, no Brasil, os limites norte e sul da espécie parecem ser os estados do Espírito Santo e Rio Grande do Sul, respectivamente (KIMSEY, 1982; NEMÉSIO, 2009).

Além de estar intimamente associada à Mata Atlântica (NEMÉSIO, 2009), um bioma extremamente ameaçado, a espécie *Eufriesea violacea* foi considerada sensível a degradação ambiental. Giangarelli *et al.* (2009), encontraram uma correlação positiva entre o tamanho/integridade dos fragmentos florestais e abundância de machos de *E. violacea*.

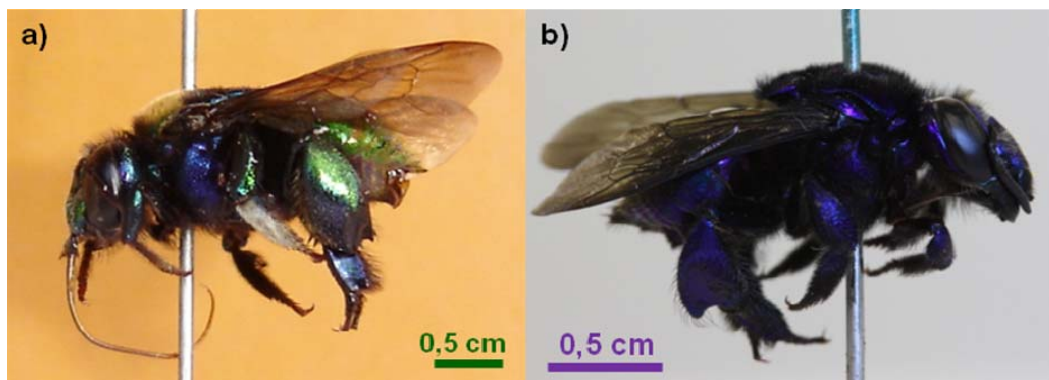


Figura 1 - Macho (a) e fêmea (b) de *Eufriesea violacea*.

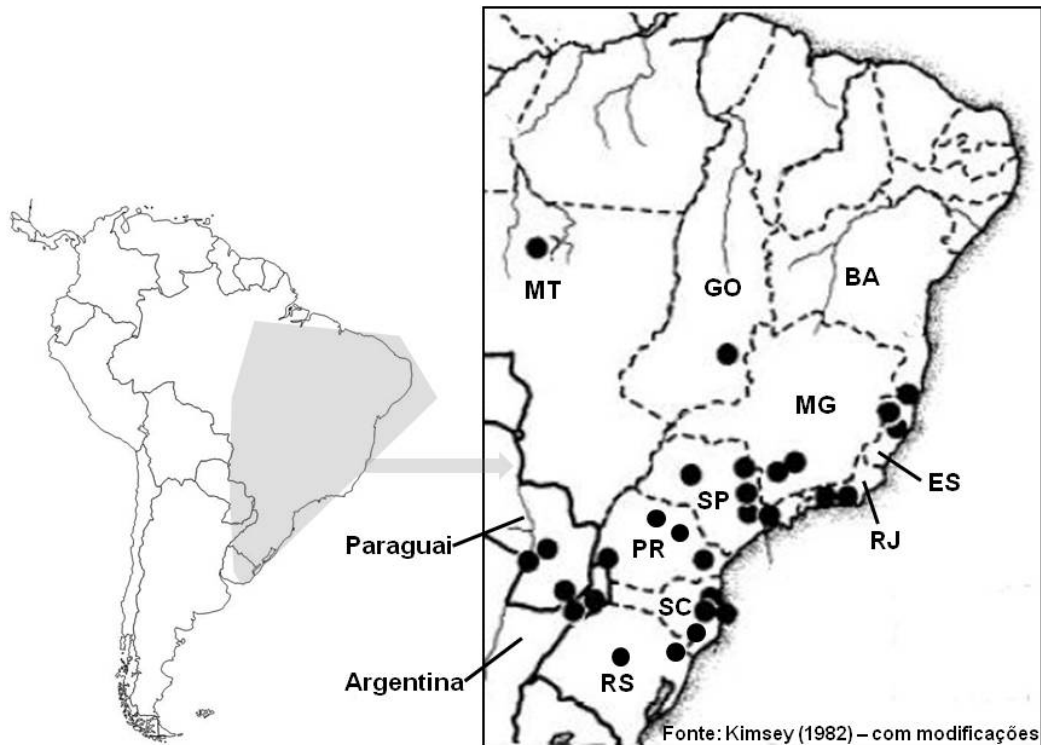


Figura 2 - Distribuição geográfica de *Eufriesea violacea*. Estados brasileiros: RS = Rio Grande do Sul; SC= Santa Catarina; PR= Paraná; SP= São Paulo; RJ= Rio de Janeiro; ES= Espírito Santo; MG= Minas Gerais; MT= Mato Grosso; GO= Goiás; BA= Bahia.

2.4 GENÉTICA DE ABELHAS E MACHOS DIPLÓIDES

O sistema de determinação do sexo em abelhas é o haplodiploide. Neste sistema, os ovos fecundados usualmente originam fêmeas, ao passo que os não fecundados dão origem a machos (UNRUH; MESSING, 1993). No entanto, a detecção de machos diplóides na natureza fez com que este sistema de determinação sexual, aparentemente muito simples, fosse revisado. Hoje é sabido que a determinação sexual em abelhas está intimamente relacionada com genes, não sendo determinada por um balanço cromossômico. É sabido que em praticamente em todos os casos conhecidos o sexo é determinado por genes (PIERCE, 2004). O que acontece é que estes genes estão situados em cromossomos específicos e nestes casos dizemos que a determinação do sexo é cromossômica. No entanto, não é o cromossomo que determina o sexo, mas sim os

genes que ele contém. Por exemplo, no caso da espécie humana é sabido que o gene fundamental para a determinação do sexo é o SRY, e que existem mulheres com cariótipo 22, XY. Nestas mulheres o cromossomo Y não apresenta o gene SRY (PIERCE, 2004).

Entretanto, o mecanismo exato de determinação sexual das abelhas ainda não foi completamente elucidado. Um modelo amplamente aceito e difundido para explicar tal determinação sexual se baseia nos estudos realizados por Whiting. De acordo com este modelo, o sexo é determinado por apenas um gene, ou seja, um único loco, o loco *sl-CSD* (do inglês *single-locus complementary sex determination*). Este loco apresentaria muitos alelos, uma variedade de alelos sexuais. Se, em um indivíduo diplóide, este loco estiver em homozigose ocorrerá o nascimento de um macho diplóide, caso contrário, nascerá uma fêmea (ZAYED; PACKER, 2005). Outros modelos propostos por diferentes autores foram revisados por Crozier (1977). Um destes, conhecido como o modelo do balanço gênico, proposto por Cunha e Kerr (1957 *apud* Crozier 1977), envolve genes que determinam características masculinizantes (*M*) e feminilizantes (*F*), com os genes *F* apresentando caráter parcialmente aditivo e os *M* parcialmente não aditivos. Sendo assim, indivíduos diplóides ($2F > M$) seriam fêmeas, e haplóides ($M > F$) machos. Segundo este modelo, um dos genes determinadores do sexo, 'xo', teria sofrido, ao longo da evolução, uma série de mutações culminando na fixação de vários alelos oriundos dele. Quando, em um indivíduo diplóide, um mesmo alelo se encontra presente (por exemplo, xo^1xo^1) o mesmo não teria a capacidade duplicadora do efeito feminilizante. No entanto, quando dois alelos estão presentes (por exemplo, xo^1xo^2) eles teriam a capacidade duplicadora do efeito feminilizante. Sendo assim na primeira situação ocorreria o nascimento de machos diplóides e na segundo o de fêmeas (KERR 1957 *apud* KERR, 1997).

A capacidade reprodutiva dos machos diplóides é quase zero, além disso, a cada macho diplóide produzido uma fêmea funcional deixa de ser produzida. Sendo assim, tais machos podem ser considerados um custo genético à população (ZAYED *et al.*, 2004; ZAYED; PACKER, 2005). Um modelo estocástico computacional empregado por Zayed e Packer (2005) sugere que a probabilidade de extinção em algumas populações haplodiplóides é aumentada na presença de

machos diplóides. Levando em consideração que o endocruzamento aumenta o número de homozigotos, alguns autores sugerem que populações com maior índice deste sistema de acasalamento apresentem mais machos diplóides (UNRUH; MESSING, 1993; ZAYED; PACKER, 2005).

Atualmente na literatura não existe um consenso acerca da frequência de machos diplóides em populações de espécies da tribo Euglossini. Um estudo realizado no Panamá (ROUBIK *et al.*, 1996) constatou uma frequência elevada (12-100%) de machos diplóides em nove espécies de Euglossini. Corroborando com estes resultados, Zayed *et al.* (2004) detectaram machos diplóides em uma frequência de 13-56% para a espécie *Euglossa imperialis*. López-Uribe *et al.* (2007) também encontraram altas frequências destes machos para cinco espécies da tribo (8-32%). Por outro lado, um estudo realizado por Takahashi *et al.* (2001) indicou uma baixa frequência de machos diplóides (0-2%) para 14 espécies de Euglossini. Do mesmo modo, em um estudo recente (SOUZA *et al.*, 2010) foi constatada uma frequência extremamente baixa de machos diplóides (0,005%), para 27 espécies da tribo.

2.5 O DNA MITOCONDRIAL

O DNA mitocondrial (DNAMt) animal é uma molécula de fita dupla circular, muito conservada em termos de arranjo e composição de genes. Praticamente, toda sua sequência de nucleotídeos é codificadora, sendo considerada uma molécula muito compacta (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001; AVISE, 2009). O DNAMt é transmitido via materna na maioria das espécies, de forma que não sofre recombinação e não segue os padrões mendelianos de segregação. Possui uma alta taxa de evolução, devido ao seu sistema de reparo ineficiente e a exposição aos radicais livres gerados durante o processo de respiração (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001; AVISE, 2009).

A alta taxa de evolução e a herança predominantemente materna tornam esta molécula muito atrativa aos estudos populacionais e evolutivos (ARIAS;

INFANTE-MALACHIAS, 2001; AVISE, 2009). Segundo Perez-Sweeney *et al.* (2004) a utilização de marcadores genéticos que são transmitidos por apenas um dos sexos é muito útil para a sistemática molecular e para a genética de populações, fornecendo dados sobre a evolução e dispersão dos organismos.

Atualmente esta molécula tem sido muito utilizada em estudos filogeográficos. Em uma revisão recente Avise (2009), um dos autores do termo filogeografia (AVISE *et al.*, 1987 *apud* AVISE, 2009), menciona que a maioria dos estudos filogeográficos existentes na literatura são baseados em análises do DNAm. Em Euglossini, até o momento, existe apenas um estudo filogeográfico (DICK *et al.*, 2004) e este estudo foi baseado na análise de um fragmento do DNAm.

2.6 A TÉCNICA DE PCR-RFLP

A descoberta das enzimas de restrição, no ano de 1968, tornou possível o desenvolvimento da técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição). A técnica de RFLP consiste na clivagem de moléculas de DNA por enzimas de restrição, os fragmentos gerados são separados por eletroforese e visualizados na forma de bandas. Cada banda corresponde a um grupo de moléculas do mesmo tamanho (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001). Esta técnica é utilizada em diversos tipos de estudos, inclusive populacionais (FRANCISCO, 2002; LOWE *et al.*, 2004; SUZUKI *et al.*, 2010).

O desenvolvimento da técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*), em 1985, aumentou muito a eficiência de detecção de polimorfismos no nível do DNA ou RNA (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001). Por meio da técnica PCR, milhões de cópias de um segmento específico de DNA podem ser geradas *in vitro*.

O trabalho de Saiki (1985) foi o primeiro a utilizar a técnica de PCR associada ao uso de enzimas de restrição (RFLP) para detecção de polimorfismos, a combinação entre estas duas técnicas foi utilizada para diagnóstico de anemia

falciforme. A técnica de PCR-RFLP tem sido utilizada para a avaliação de diversidade e estruturação genética de populações (LOWE *et al.*, 2004; SUZUKI, 2010). De acordo com Arias e Infante-Malachias (2001), as análises de populações por PCR-RFLP com base no genoma mitocondrial têm fornecido informações relevantes em estudos de estrutura populacional de diversas espécies. Alguns estudos também têm empregado dados obtidos por estes marcadores na investigação de processos geológicos ocorridos no passado.

Brito e Arias (2008) utilizaram marcadores mitocondriais obtidos por PCR-RFLP e microssatélites em estudo populacional de *Partamona mulata* e *Partamona helleri*. Para as duas espécies, as amostras das diferentes localidades se mostraram bastante semelhantes. No entanto, os autores encontraram apenas dois haplótipos no caso da primeira espécie e dez no caso da segunda. As análises demonstraram que a população de *Partamona mulata* provavelmente sofreu um gargalo de garrafa ou um processo de especiação recente. Já *Partamona helleri* parece ser uma espécie antiga que sofreu isolamento recente, provavelmente devido à fragmentação da Floresta Atlântica durante o Pleistoceno.

Francisco e Arias (2010) analisaram quatro 'populações' de *Plebeia remota* presentes nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, por meio de marcadores RFLP aplicados ao DNAm. Os autores encontraram diferenciação genética entre as abelhas das áreas estudadas e alegaram que a filopatria das fêmeas e as mudanças climáticas que ocorreram no Plioceno e Pleistoceno, as quais provavelmente ocasionavam fragmentação florestal nas áreas estudadas, podem estar relacionadas com a diferenciação genética encontrada.

Em um estudo recente, a estrutura genética de seis 'populações' de *Euglossa fimbriata* presentes em remanescentes de Mata Atlântica localizados no norte do Paraná foi analisada. Os autores fizeram uso de marcadores mitocondriais obtidos por PCR-RFLP aplicados a três genes mitocondriais: 16S, região intergênica Citocromo Oxidase I e II (COI-COII) e Cit b. As análises indicaram baixa estruturação genética para tais marcadores (SUZUKI *et al.*, 2010).

2.7 MARCADORES MICROSSATÉLITES

As regiões microssatélites são sequências que possuem unidades de 1 a 6 pares de base repetidas em *tandem*, sendo o número de vezes que estas unidades estão repetidas variável (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Os microssatélites também podem ser chamados de sequências simples repetidas (SSRs) ou repetições curtas em *tandem* (STRs) e estão dispersos pelo genoma da maioria dos eucariotos. A taxa de mutação dos microssatélites é 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). Os microssatélites geralmente se estendem de vinte a algumas centenas de pares de bases (CHISTIAKOV *et al.*, 2006).

Os marcadores microssatélites apresentam grande abundância pelo genoma, alto grau de polimorfismo, herança mendeliana simples e são marcadores que possibilitam a identificação de heterozigotos e homozigotos (marcadores co-dominantes) (HILLIS, *et al.* 1996; AVISE, 2004). Devido a estas características estes marcadores podem ser considerados muito úteis para estudos de mapeamento genético, estudos de DNA forense e de genética de populações (AVISE, 2004; PÉREZ-SWEENEY *et al.*, 2004)

A maior dificuldade no uso de tais marcadores consiste no alto custo de desenvolvimento de *primers* específicos. Entretanto, estudos mostram que pares de *primers* determinados para uma espécie podem ser utilizados em outras espécies do mesmo gênero ou até mesmo em espécies de gêneros diferentes pertencentes à mesma família. Isto possibilita a redução de custos no desenvolvimento desta técnica (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Atualmente, na literatura existem disponíveis *primers* de microssatélite para quatro espécies da tribo Euglossini: *Euglossa cordata*, *Eulaema nigrita* (SOUZA *et al.*, 2007), *Euglossa annectans* (PAXTON *et al.*, 2009) e *Eulaema meriana* (LÓPEZ-URIBE *et al.*, 2010). Estes *primers* se mostraram eficientes para diversas espécies de Euglossini. Alguns oligonucleotídeos desenhados para

Euglossa cordata e *Eulaema nigrita* (SOUZA *et al.*, 2007) se mostraram eficientes para amplificação de locos polimórficos da espécie *Eufriesea violacea*.

Devido ao fato destes *primers* estarem disponíveis na literatura há muito pouco tempo, os estudos populacionais envolvendo espécies de Euglossini baseados em marcadores microssatélites são esparsos. Recentemente, Cerântola *et al.* (2010) analisaram a estrutura genética de onze 'populações' urbanas de *Euglossa cordata* presentes no Estado de São Paulo. Os autores fizeram uso de marcadores microssatélites e isoenzimáticos. As análises indicaram ausência de diferenciação genética entre as áreas amostradas. Outro estudo populacional baseado nos marcadores microssatélites, foi realizado com as espécies *Euglossa pleosticta* e *Euglossa fimbriata* (ANDRADE, 2010). As análises indicaram a existência de diferenciação genética entre populações coletadas, respectivamente, em cinco e seis remanescentes de Mata Atlântica localizados no norte do Paraná.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar, por meio de marcadores microssatélites, a variabilidade e estrutura genética de *Eufriesea violacea* de seis remanescentes de Mata Atlântica localizados em quatro estados brasileiros: São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Traçar, com base em marcadores mitocondriais obtidos por PCR-RFLP, o perfil de haplotípico para a região 16S do DNAm, das 'populações' das seis localidades estudadas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a diversidade de alelos presentes em seis locos microssatélites nas abelhas dos diferentes fragmentos.
- Caracterizar a diversidade de haplótipos da região 16S do DNAm dos indivíduos coletados por meio de marcadores mitocondriais obtidos por PCR-RFLP.
- Obter, a partir da união dos dados destes dois marcadores estimativas da estrutura genética de *Eufriesea violacea* nas áreas estudadas.
- Obter informações genéticas que possam subsidiar estratégias de manejo da espécie nas áreas amostradas.

4 ARTIGO

Trabalho a ser submetido à revista **Apidologie**

Diversidade genética da abelha *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini)

Gabriele A. FREIRIA¹ e Silvia H. SOFIA*

Resumo

Seis 'populações' de *Eufriesea violacea* tiveram sua diversidade e estrutura genéticas estimadas, por meio de marcadores microssatélites e PCR-RFLP. As abelhas foram coletadas nos estados do Paraná (PR1, PR2 e PR3), São Paulo (SP1), Santa Catarina (SC1) e Rio Grande do Sul (RS1). Para os marcadores microssatélites a análise da variância molecular (AMOVA) e as análises de estruturação via estatística bayesiana indicaram ausência de diferenciação genética. No entanto, as estimativas de distância genética de Jost (D_{EST}) sugerem a existência de diferenciação entre três comparativos: PR1-SP1 ($D_{EST}=0,168$); e PR2-PR3 ($D_{EST}=0,227$); PR3-SP1 ($D_{EST}=0,315$). As estimativas de H_e indicaram alto nível de diversidade alélica (0,735). Com os marcadores mitocondriais obtidos por PCR-RFLP foi encontrada alta diferenciação genética ($\Phi_{ST}=0,821$) entre as áreas. As análises sugerem a existência de três grupos: 1) PR2-PR3-SP1; 2) PR1-SC1; 3) SC1.

Palavras-chave: Microssatélites. PCR-RFLP. Diversidade e estrutura genética.

1 Introdução

A importância ecológica e econômica das abelhas é imensa, tanto que seria muito difícil imaginar o mundo delas (Danforth, 2007). Estes insetos são os

¹ Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina

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

principais polinizadores das angiospermas, o grupo de plantas vasculares dominante nos ecossistemas terrestres. Elas atuam polinizando flores, tanto nas matas como em culturas vegetais (Danforth, 2007; Kremen *et al.*, 2007).

Atualmente existem cerca de 16.000 espécies de abelhas descritas (Michener, 2000), separadas em diferentes táxons. Entre estes grupos está o das abelhas corbiculadas (Apidae corbiculados) que é formado por quatro tribos: Apini, Bombini, Meliponini e Euglossini (Michener, 2000). A tribo Euglossini tem ocorrência restrita à região Neotropical e é muito peculiar quando comparada com as outras tribos do grupo (Roubik e Hanson, 2004). Uma das peculiaridades é o comportamento de coleta de compostos aromáticos pelos machos. Acredita-se que os compostos coletados, depois de metabolizados, são utilizados pelos machos na atração de fêmeas (Cameron, 2004; Eltz *et al.*, 2005, 2007). Quando se descobriu que os machos poderiam ser atraídos por compostos aromáticos sintéticos (Dodson *et al.*, 1969) houve um grande aumento no número de estudos envolvendo a tribo Euglossini (Cameron, 2004; Roubik e Hanson, 2004; Nemésio, 2009). Entretanto, vários aspectos da biologia destas abelhas, popularmente conhecidas como ‘abelhas das orquídeas’, ainda permanecem pouco estudados.

Sem dúvida alguma, uma das principais lacunas está na falta de informações sobre a diversidade genética das mais de 200 espécies que compõem o grupo. Alguns estudos recentes indicam que alguns Euglossini parecem ser sensíveis à degradação ambiental (Brosi, 2009; Giangarelli *et al.*, 2009). É sabido que as abelhas, assim como os himenópteros como um todo, exibem naturalmente uma variabilidade genética inferior a de outros grupos, o que está intimamente relacionado com o sistema de determinação sexual haplodiploide (Pamillo *et al.*, 1978; Berkeihamer, 1982; Shoemaker *et al.*, 1992; Packer e Owen, 2001). Mesmo assim, de acordo com Zayed e Packer (2005), a conservação genética destes organismos tem recebido pouca ou nenhuma atenção da comunidade científica e tem sido ignorada em decisões sobre conservação (Zayed e Packer, 2005). Levando em consideração estes fatores, fica evidente que mais esforços devem ser direcionados para um melhor conhecimento da diversidade e estrutura genética destas abelhas.

Outra importante lacuna, diz respeito à falta de estudos filogeográficos envolvendo estas abelhas mesmo sendo estes muito importantes, pois fornecem dados para o entendimento de padrões evolutivos e sobre a história de diversificação das espécies (Avisé, 2000). Até o momento apenas dois estudos abordando aspectos da filogeografia da tribo Euglossini foram desenvolvidos (Dick, *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2010). Contudo, ao se considerar a diversidade de espécies, padrões restritos de distribuição e o próprio grau de endemismo dessas abelhas, mais estudos são necessários para um melhor conhecimento da tribo.

Os marcadores microssatélites são considerados muito informativos para os estudos populacionais. Devido a algumas características como: abundância pelo genoma e alto polimorfismo (Avisé, 2004). Já as análises baseadas no DNA mitocondrial (DNAmt) têm se mostrado bastante informativas para estudos filogeográficos. Fato este que está relacionado com algumas características peculiares desta molécula como: herança exclusivamente materna (para a maioria dos grupos); ausência de recombinação (com raras exceções); ausência de um sistema de reparo eficiente (Avisé, 2009). O conjunto diversificado de técnicas disponíveis e aplicáveis ao estudo do genoma mitocondrial constitui outro atrativo para análises genéticas envolvendo esta molécula.

Neste estudo, marcadores microssatélites e mitocondriais (PCR-RFLP) foram empregados na análise de populações da espécie *Eufriesea violacea* de quatro estados brasileiros – Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo. Essas regiões abrangem uma porção representativa da área de ocorrência geográfica desta abelha, que se estende do estado do Espírito Santo à Argentina e Paraguai, sendo a maior parte desta restrita aos domínios de Mata Atlântica. Alguns estudos têm também apontado que *Eufriesea violacea* é uma espécie aparentemente sensível à degradação ambiental (Sofia e Suzuki, 2004; Giangarelli *et al.*, 2009). Apesar disto, ainda são escassas as informações sobre a diversidade genética das populações destas abelhas presentes em remanescentes de Mata Atlântica.

2 Materiais e Métodos

2.1 ÁREAS DE ESTUDO

As coletas de machos de *Eufriesea violacea* foram realizadas em seis remanescentes de Mata Atlântica, localizados nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

No estado do Paraná, as coletas foram realizadas em três áreas (Figura 1; Tabela 1). A primeira delas está localizada no município de Santa Terezinha de Itaipu, extremo-oeste do estado, na Fazenda Santa Maria (fragmento PR1). Esta fazenda possui uma reserva particular com cerca de 280 ha. A formação florestal presente neste remanescente é de Floresta Estacional Semidecidual. Um fato interessante é que esta fazenda faz parte do Corredor de Biodiversidade Santa Maria (CBSM) que, inclusive, recebe este nome devido à fazenda. O corredor possui 70 km de extensão e liga a faixa de proteção do reservatório da hidrelétrica de Itaipu ao Parque Nacional do Iguaçu, que é considerado a maior unidade de conservação do sul do Brasil, com área estimada de 185.265 ha (Melo *et al.*, 2006). O segundo remanescente localiza-se no Parque Estadual “Mata dos Godoy” (fragmento PR2), no município de Londrina (região norte do estado). O fragmento possui cerca de 580 ha de vegetação nativa preservada. Esta área possui conexão com um fragmento maior de 2.200 ha, que se encontra fora dos limites do parque (Sofia *et al.*, 2005). A altitude média na região é de 700 m e a formação vegetal encontrada é de Floresta Estacional Semidecidual (Torezan, 2005). O último fragmento do estado localiza-se no município de Telêmaco Borba (região centro-leste) na Fazenda Monte Alegre (fragmento PR3), que é propriedade da indústria de papel Klabin/SA. Nesta fazenda estão presentes três tipos de formação florestal distintas, a Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila Mista e Campos Naturais. Além de possuir áreas de reflorestamento com *Pinus* sp., *Eucalyptus* sp e *Araucaria angustifolia* (Reis *et al.*, 2005). As coletas foram realizadas um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual com cerca 217 ha. A altitude média nesta região é de 700 m.

No estado de São Paulo, as coletas foram realizadas nas imediações da Base da Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (ESCAS) (fragmento SP1), localizada no município de Nazaré Paulista (Figura 1; Tabela 1). O fragmento amostrado possui cerca de 9 ha e encontra-se conectado, por um pequeno trecho de plantação de *Pinus* sp., a um fragmento de 2.800 ha. Na região de estudo existe um mosaico de fragmentos com estados de conservação e tamanhos diferentes e que estão muitas vezes conectados por plantações de *Pinus* sp. A formação florestal original é de Floresta Ombrófila Densa e a altitude média nestas áreas é de 800 m. O município de Nazaré Paulista abriga cerca de 16.000 ha de remanescentes de Mata Atlântica em uma região onde existe sobreposição de duas áreas de preservação ambiental (APA). A APA Piracicaba/Juqueri Mirim e a APA Sistema Cantareira.

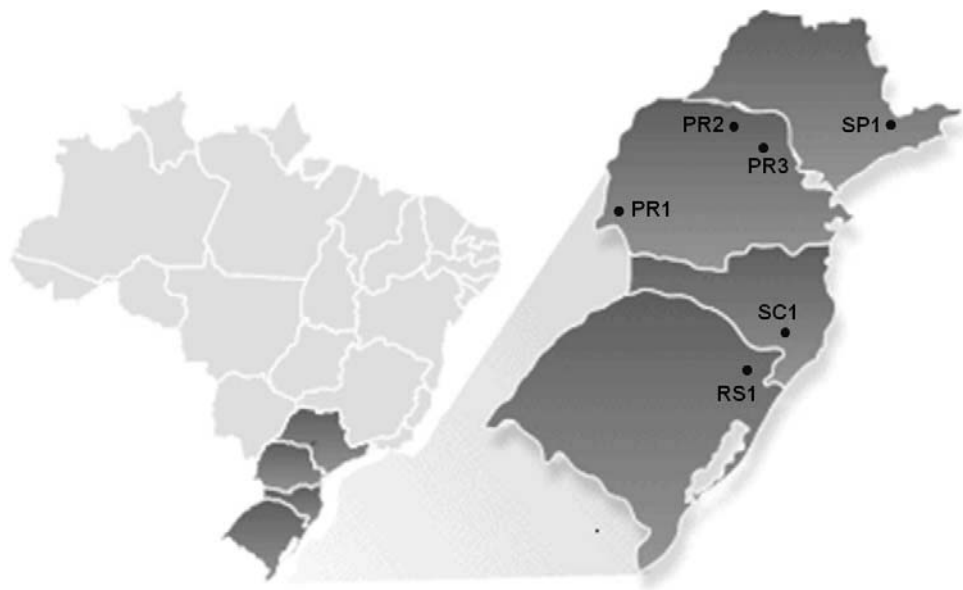


Figura 1 - Localização geográfica dos fragmentos florestais de Mata Atlântica estudados.

Tabela 1 - Localização, formação florestal, tamanho e estado de conservação dos locais de coleta de *E. violacea*.

Áreas de Estudo	Município (coordenadas geográficas)	Formação Florestal	Tamanho e estado de conservação
PR1	Santa Terezinha de Itaipu (25°25'S; 54°25'W)	Floresta Estacional Semidecidual	280 (perturbado)
PR2	Londrina (23°27'S; 51°14'W)	Floresta Estacional Semidecidual	580 ha (conservado)
PR3	Telêmaco Borba (24°05'S; 50°42'W)	Floresta Estacional Semidecidual	217 ha (perturbado)
SP1	Nazaré Paulista (23°14'S; 46°20'W)	Floresta Ombrófila Densa	2.809 ha* (conservado)
RS1	São Francisco de Paula (29°28'S; 50°9'W)	Floresta Ombrófila Mista	1.778 ha (conservado)
SC1	Urussanga (28°32'S; 49°18'W)	Floresta Ombrófila Densa	630 ha (conservado)

* Tamanho do fragmento= a soma de um fragmento menor de 9 ha com um fragmento grande de 2.800 ha, distantes 450 m entre si (conectados por uma plantação de *Pinus* sp.) e considerados como um único fragmento. **PR1** = Fazenda Santa Maria; **PR2** = Parque Estadual "Mata dos Godoy"; **PR3** = Fazenda Monte Alegre; **SP1** = imediações da Base da Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (ESCAS); **RS1** = Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPNP- Pró-Mata); **SC1** = Estação Experimental de Urussanga.

No Rio Grande do Sul (fragmento RS1), as coletas foram realizadas no Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPNP- Pró-Mata) (Tabela 1; Figura 1). Ele se localiza no Planalto das Araucárias, no Município de São Francisco de Paula. A área pertence à Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). A sua extensão é de cerca de 5.000 ha, onde se encontram duas regiões fitoecológicas distintas com formação vegetal do tipo

primária: Floresta Ombrófila Densa (1.355 ha) e Floresta Ombrófila Mista (1.778 ha). A área do CPNP Pró-Mata possui também remanescentes com vegetação florestal do tipo secundária (972 ha), áreas de capoeira (138 ha) e campos naturais (147 ha). A altitude média é de 912 metros. Os machos de *E. violacea* foram coletados no fragmento com cerca de 1.778 ha, onde existe Floresta Ombrófila Mista (Ferreira e Eggers, 2008; Pinheiro e Kux, 2003).

No estado de Santa Catarina, as coletas foram realizadas em uma área florestal com aproximadamente 35 ha de floresta nativa preservada, presente na Estação Experimental de Urussanga (fragmento SC1), localizada no município de Urussanga (Tabela 1; Figura 1). A estação pertence à Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S/A (EPAGRI). Esta área faz parte de um fragmento maior de cerca de 630 ha. A formação florestal que a compõe é de Floresta Ombrófila Densa, Submontana, que ocorre em cotas de altitude de 30 a 400m (Essinger, 2005).

As áreas de coleta de *E. violacea* estão separadas por distâncias geográficas consideráveis (Tabela 2). Os fragmentos PR2 e PR3, assim como os fragmentos RS1 e SC1, são os que se encontram mais próximos entre si, distando cerca de 130 km. Os fragmentos PR1 e SP1 são os mais distantes, estando separados em aproximadamente 800 km.

Tabela 2 - Distância geográfica (km) entre os seis fragmentos florestais estudados.

Fragmentos	PR1	PR2	PR3	SP1	RS1	SC1
PR1	-					
PR2	400 km	-				
PR3	400 km	130 km	-			
SP1	850 km	500 km	450 km	-		
RS1	600 km	700 Km	600 km	800 km	-	
SC1	620 Km	650 km	500 Km	700 Km	130 km	-

PR1 = Fazenda Santa Maria; **PR2** = Parque Estadual “Mata dos Godoy”; **PR3** = Fazenda Monte Alegre; **SP1** = imediações da Base da Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (ESCAS); **RS1** = Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPNP- Pró-Mata); **SC1** = Estação Experimental de Urussanga.

2.2 COLETAS DAS ABELHAS

A metodologia de coleta dos machos foi baseada em Sofia e Suzuki (2004), com algumas modificações. Os machos foram atraídos a iscas-odores de três essências químicas - eucaliptol, eugenol e vanilina – as quais têm se mostrado eficientes na atração de machos de *E. violacea* (Sofia *et al.*, 2004). Os machos atraídos às iscas eram capturados com rede entomológica e acondicionados vivos em recipientes plásticos individuais. Posteriormente as abelhas foram mantidas em *freezer*, à temperatura de -20°C , até a extração do DNA total.

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Antes das extrações, as abelhas foram lavadas em álcool 70% para remoção de contaminantes, como pólen ou fungos (Pascual *et al.*, 2006). Posteriormente, os machos inteiros foram picotados com auxílio de uma tesoura. Para a extração do DNA total do material picotado foi realizada digestão com SDS e

proteínase K, seguida de purificação com: fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, conforme metodologia descrita por Sofia *et al.* (2005). O DNA foi ressuspêndido em 100 µL de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e armazenado a -20°C. A concentração de DNA das amostras foi determinada em espectrofluorímetro de microplaca (VICTOR 3 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer) utilizando-se o corante Hoechst 33258 e DNA padrão (Invitrogen). Posteriormente, para o processo de amplificação via PCR, o DNA foi diluído para uma concentração de 0,5 ng.µL⁻¹.

2.4 OBTENÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

O tamanho amostral para os marcadores microssatélites foi de 53 machos para o fragmento Fazenda Santa Maria e de 60 machos para os demais fragmentos. Para obtenção dos marcadores microssatélites foram utilizados seis pares de *primers*: Eln 12b, Eln 2J, Eln 7J, Eln 12J, Egc 18 e Egc 17, descritos por Souza *et al.* (2007). Os protocolos utilizados nas reações de amplificação também foram baseados no descrito por estes autores: 0,25 mM de dNTPs, 1,5 ou 2,0 mM de MgCl₂, 1 mM de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*), 1x tampão (JVR), 1 U de enzima DNA polimerase (*Taq* JVR) e 1 ng de DNA, em um volume final de 15 µL. As amplificações foram feitas em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.) e o protocolo de amplificação empregado foi: uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 29 ciclos de 30 s a 94°C, 30s a 51 (Eln 12J), 54 (Eln 2J; Eln 12b; Eln 7J), 56 (Egc 17) ou 57°C (Egc 18) e 1 min a 72 °C; com uma extensão final de 10 min a 72°C. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese (15,4 V. cm⁻¹) em géis de poliacrilamida 8% em tampão TBE 1x, corados com nitrato de prata (AgNO₃), fotografados com câmera digital e analisados. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 10 pb (Invitrogen), para identificação dos alelos.

O tamanho amostral para os marcadores mitocondriais obtidos por PCR-RFLP foi de 40 machos para cada um dos seis fragmentos estudados. As análises de PCR-RFLP foram baseadas no protocolo de Suzuki *et al.* (2010). Para a obtenção dos marcadores mitocondriais, por PCR-RFLP, foi amplificado um segmento da região 16S (DNAMt) do genoma mitocondrial. O par de *primers* utilizado nas reações de amplificação foi: F:5'TAGCTGCAGTATATTGAC3' e R:5'-CGAGGTCGCAAACATCT-3'. Estes *primers* foram construídos por meio de sequências da região 16S das espécies *E. xantha* (número de acesso no genbank: AJ581091.1), *E. flaviventris* (AJ581090.1) e *E. caerulescens* (L22904.1), disponíveis no Genbank. A construção dos *primers* foi realizada com o auxílio do programa computacional *Gene Runner* 3.05.

As reações de amplificação foram produzidas em um volume total de 25 µL, contendo tampão de reação 1x, 0,2 mM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0,5 mM de cada *primer*, 1,5 U de Taq polimerase (Invitogen), 1 ng de DNA e água ultrapura para completar o volume da reação. As amplificações foram feitas em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.) e o protocolo de amplificação empregado foi: uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 34 ciclos de 30 s a 94°C, 30s a 60°C e 1 min a 72 °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% com 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 a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio, visualizados e fotografados sob transluminador de luz UV, usando-se o sistema da fotodocumentação digital Kodak EDAS 290. Um marcador de 100 pb (Invitrogen) também foi aplicado ao gel para a estimativa do peso molecular dos produtos amplificados.

Para a análise de restrição, amostras de 2 µL dos produtos da PCR foram submetidas à digestão simples com duas endonucleases (*DraI* e *AseI*) por um período de seis horas. Outras endonucleases (*MspI*, *NdeI*, *XhoI*, *BclI*, *XbaI*, *HindIII*, *BsuRI*, *Eco321*, *BamHI*, *MobI*, *PvuII*, *PstI* e *EcoRI*) foram testadas, mas não reconheceram sítios de restrição na região amplificada. Posteriormente, os fragmentos foram separados por eletroforese (7,7 V.cm⁻¹) em géis de poli-acrilamida 9% em tampão TBE 1x, corados com nitrato de prata (AgNO₃⁻), fotografados com

câmera digital e analisados. Marcadores de pesos moleculares de 25 e 50 pb (Invitrogen) foram aplicados no mesmo gel, para a estimativa dos tamanhos dos fragmentos de restrição.

2.6 ANÁLISES DOS DADOS

Para as análises de PCR-RFLP, os padrões distintos de digestão produzidos por cada enzima de restrição para a região 16S do DNAm_t foram identificados por letras (A, B, C, etc). Estas letras indicaram o haplótipo simples de cada indivíduo. Como duas enzimas de restrição foram utilizadas os indivíduos foram indicados por mais de uma letra e este conjunto de letras representa o haplótipo composto de cada indivíduo. As frequências destes haplótipos foram estimadas para as amostras das diferentes áreas estudadas.

Na análise dos marcadores microssatélites, os diferentes alelos encontrados para cada loco estudado foram identificados por seus pesos moleculares.

Para cada um destes dois marcadores foram construídas matrizes de dados, para as análises de diversidade e estrutura genética das diferentes amostras. A análise da estrutura genética das populações foi realizada usando-se a estatística F (Wright, 1951) e análises de estruturação genética via estatística bayesiana. No caso da estatística F foi empregado o programa computacional ARLEQUIN 3.01 (Excoffier *et al.*, 2006), no qual a análise da estrutura genética populacional é feita via variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992). Esta análise serviu para gerar estimativas da variância genética em diferentes níveis hierárquicos (indicando como a diversidade genética encontra-se distribuída dentro e entre as populações) e do índice Φ_{ST} entre pares de populações, o qual pode ser usado como uma estimativa da distância genética entre elas (Excoffier *et al.*, 2006). A significância do Φ_{ST} (análogo de F_{ST}) foi estimada por meio de 1.000 aleatorizações e foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. Existe uma preocupação com o uso do F_{ST} e seus análogos. Alguns autores apontam que estas

estimativas podem subestimar a diferenciação genética quando aplicadas a locos muito polimórficos, como os de microssatélite (Hedrick, 2005; Meirmans, 2006; Jost, 2008). Este problema pode ser contornado utilizando algumas estimativas que fazem correções nos valores de F_{ST} e seus análogos (Hedrick, 2005; Jost, 2008). Uma destas estimativas foi proposta por Jost (2008) e é conhecida como 'Jost's (2008) actual differentiation' (D_{EST}). Levando em consideração esta preocupação, no caso dos marcadores microssatélites foram realizadas estimativas de D_{EST} além das estimativas de Φ_{ST} . As estimativas de D_{EST} foram realizadas utilizando-se o programa computacional SPADE (Chao e Shen, 2003).

O programa STRUCTURE versão 2.2 foi utilizado para a determinação da estrutura genética dos grupos amostrados, a partir de análises de estruturação via estatística bayesiana. Este programa define se os grupos analisados estão ou não estruturados em K populações. Foram testadas as possibilidades da existência de uma a dez populações, sendo que a análise para cada K foi repetida dez vezes. A escolha do K mais provável foi feita utilizando a metodologia descrita por Evanno *et al.* (2005). No presente estudo foi assumido o modelo 'sem mistura' de ancestralidade, o qual é mais apropriado para populações discretas (distintas quanto a origem dos seus indivíduos) e que também se mostra mais eficaz do que o modelo de 'mistura' em detectar estruturas mais 'frágeis' (menos evidentes) de populações (Pritchard *et al.*, 2007). Nestas análises foram empregadas 100.000 randomizações.

O programa TFPGA 1.3 (MILLER, 1997) foi utilizado para os cálculos da proporção de locos polimórficos (\bar{P}), usando-se o critério de 95%, de distância genética de Nei e de heterozigozidade esperada (intra-loco, média e total). Todos estes parâmetros genéticos foram estimados sem a inclusão dos dados de machos diplóides, tendo em vista que os programas utilizados não possibilitam a análise simultânea de planilhas contendo dados haploides e diplóides. Para as estimativas de alguns dos parâmetros mencionados acima, obtidos com o auxílio dos programas ARLEQUIN 3.01 e TFPGA 1.3, foram assumidos dois pressupostos: 1) as populações se encontram em equilíbrio de Hardy–Weinberg; 2) a ocorrência de frequências alélicas iguais entre ambos os sexos, com n correspondendo ao número total de locos analisados (Lopez-Urbe *et al.*, 2007).

A proporção de diploidia nas populações de machos adultos de *Euglossini* foi estimada a partir do modelo de 'probabilidade máxima', proposto por Owen e Packer (1994) para um loco com dois alelos segundo a fórmula: $\Phi = B_2/2pq.T_2$, onde B_2 representa o número de machos diplóides, $2pq$ a frequência de heterozigotos T_2 o número de machos analisados. Se existir um macho diplóide homozigoto para todos os locos analisados este macho não será identificado, isto pode ocorrer se os marcadores genéticos apresentarem baixa diversidade alélica (baixa heterozigosidade). Sendo assim, foi calculado o poder de resolução que os marcadores microssatélites tiveram em revelar machos diploides neste estudo, ou seja, a probabilidade de um indivíduo diplóide ser heterozigoto em um ou mais locos, P_{het} (Paxton *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2010).

Foi examinada a possibilidade de correlações entre: 1) Distância geográfica e os valores de Φ_{ST} ou D_{EST} para os diferentes pares de amostra; 2) Diferença de tamanho entre os fragmentos e os valores de Φ_{ST} ou D_{EST} para os diferentes pares de amostra; 3) Tamanho do fragmento e número de machos diploides encontrados na área. A existência destas correlações foi calculada pelo coeficiente de Pearson e de Spearman, utilizando, respectivamente, o programa Excel da Microsoft e o programa computacional *Paleontological Statistics* (Past) versão 2.06 (Hammer *et al.*, 2001).

3 RESULTADOS

3.1 MARCADORES MICROSSATÉLITES

Os seis locos analisados (Eln 2J, Eln 12b, Eln 12J, Eln 7J, Egc 17 e Egc 18) se mostraram polimórficos, num total de 46 alelos (Figura 2), com o número de alelos variando de 3 (Eln 12b) a 11 (Egc 18). O número de alelos encontrado em cada loco foi muito semelhante em todas as áreas amostradas (Figura 2). Com exceção do alelo 11, do loco Egc 18, presente apenas no fragmento PR3, todos os alelos encontrados foram compartilhados por pelo menos duas das localidades

amostradas (Anexo A). No entanto, houve diferença nas frequências alélicas nas diferentes áreas estudadas (Anexo A).

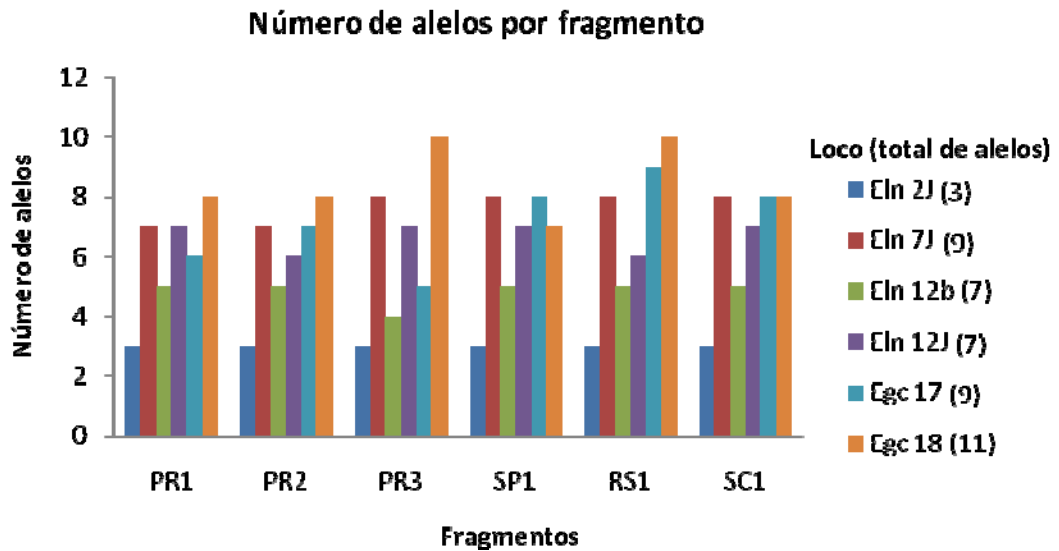


Figura 2 - Número de alelos obtidos para os locos de microsatélite (Eln 2J, Eln 7J, Eln 12b, Eln 12J, Egc 17 e Egc 18) em *E. violacea* nos seis fragmentos florestais estudados (**PR1**= Fazenda Santa Maria; **PR2** = Parque Estadual “Mata dos Godoy”; **PR3** = Fazenda Monte Alegre; **SP1** = imediações da Base da Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (ESCAS); **RS1** = Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPNP- Pró-Mata); **SC1** = Estação Experimental de Urussanga).

As estimativas de heterozigosidade média esperada não enviesada por remanescente estudado indicaram alto nível de diversidade alélica em todas as localidades, estes valores oscilaram de 0,530 a 0,858 (Tabela 3). A heterozigosidade média total esperada (H_T) foi de 0,735. As maiores heterozigosidades intra-loco esperadas foram detectadas para os locos Egc 18, Eln 12J e Eln 7J, os quais mostraram heterozigosidades médias de 0,843, 0,809 e 0,803, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Heterozigosidade média total esperada (H_T) e desvio padrão associado ($\pm dp$), heterozigosidade intra-loco e heterozigosidade média esperada (\bar{H}_{media}) e desvio padrão associado ($\pm dp$) para as diferentes populações de *E. violacea* provenientes dos seis fragmentos florestais estudados.

Loco	Fragmento						Média (H_T)	$\pm dp$
	PR1	PR2	PR3	SP1	RS1	SC1		
EIn2J	0,591	0,534	0,620	0,629	0,603	0,536	0,585	0,038
EIn7J	0,776	0,795	0,812	0,817	0,786	0,831	0,803	0,019
EIn12b	0,669	0,579	0,567	0,530	0,704	0,700	0,625	0,069
EIn12J	0,808	0,777	0,839	0,801	0,807	0,826	0,809	0,019
Egc17	0,749	0,691	0,661	0,695	0,841	0,822	0,743	0,068
Egc18	0,820	0,839	0,858	0,834	0,853	0,854	0,843	0,013
\bar{H}_{media}	0,736	0,702	0,726	0,718	0,766	0,761	0,735	0,023
$\pm dp$	0,081	0,113	0,114	0,111	0,087	0,113	0,097	-

PR1 = Fazenda Santa Maria; **PR2** = Parque Estadual "Mata dos Godoy"; **PR3** = Fazenda Monte Alegre; **SP1** = imediações da Base da Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (ESCAS); **RS1** = Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPNP- Pró-Mata); **SC1** = Estação Experimental de Urussanga.

Para as seis amostras estudadas, a análise da variância molecular (AMOVA) revelou uma baixa diferenciação genética entre as áreas ($\Phi_{ST} = 0,0439$; $p < 0,01$) e a maior parte da variação mostrou-se presente dentro dos grupos (95,61%) (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) e variância da frequência alélica (Φ_{ST}) das populações de *E. violacea* dos seis fragmentos florestais estudados para marcadores microsatélites.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem da Variação	Φ_{ST}
Entre as populações	5	24,409	0,09891	4,39	
Dentro das populações	347	451,877	2,15332	95,61	0,04392*
Total	352	476,286	2.25222		

* = $p < 0,01$

Nas comparações par a par, a AMOVA também indicou baixa diferenciação genética (Anexo B; Tabela 5). A diferenciação encontrada entre a maioria dos comparativos foi muito baixa ou ausente. Entretanto, em três comparativos a diferenciação encontrada foi moderada. Estes comparativos são: PR1-SP1 ($\Phi_{ST} = 0,06159$, $p < 0,01$); PR2-PR3 ($\Phi_{ST} = 0,08112$, $p < 0,01$); PR3-SP1 ($\Phi_{ST} = 0,10815$, $p < 0,01$) (Tabela 5).

Ao contrário dos valores de Φ_{ST} par a par, os valores de D_{EST} par a par (JOST, 2008) indicaram diferença moderada na maioria dos comparativos e diferenciação genética elevada entre os três comparativos mencionados anteriormente: PR1-SP1 ($D_{EST} = 0,168$); PR2-PR3 ($D_{EST} = 0,227$); PR3-SP1 ($D_{EST} = 0,315$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores de Φ_{ST} par a par abaixo da diagonal, valores de D_{EST} par a par acima da diagonal. Todos os valores de Φ_{ST} foram significativos ($p < 0,01$).

	PR1	PR2	PR3	SP1	RS1	SC1
PR1	-	0,099	0,100	0,168	0,096	0,070
PR2	0,043	-	0,227	0,088	0,056	0,114
PR3	0,039	0,081	-	0,315	0,137	0,047
SP1	0,061	0,037	0,108	-	0,090	0,137
RS1	0,034	0,021	0,047	0,033	-	0,045
SC1	0,026	0,040	0,019	0,046	0,017	-

PR1 = Fazenda Santa Maria; **PR2** = Parque Estadual "Mata dos Godoy"; **PR3** = Fazenda Monte Alegre; **SP1** = imediações da Base da Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (ESCAS); **RS1** = Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPNP- Pró-Mata); **SC1** = Estação Experimental de Urussanga.

A análise de estruturação via estatística bayesiana revelaram ausência de diferenciação genética entre as amostras dos diferentes remanescentes florestais estudados. O número de populações (K) mais provável foi igual a um (Figura 3).

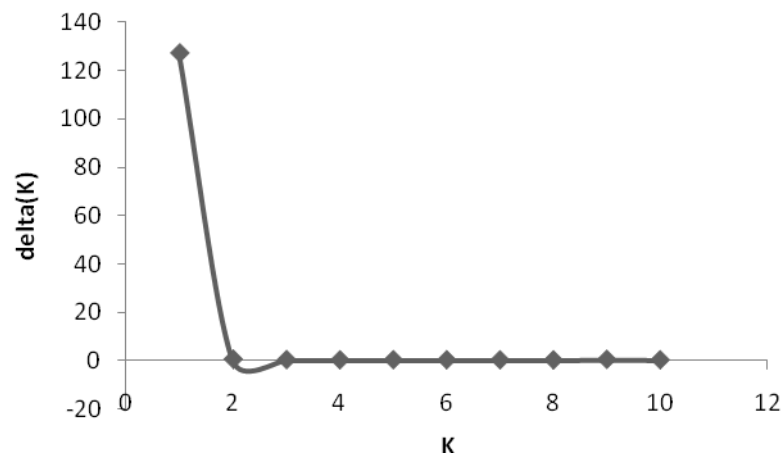


Figura 3 - Diferentes números de populações (K) testados e os deltas(K) correspondentes.

Do total de machos analisados, foi constatada a ocorrência de oito machos diplóides heterozigotos nas amplificações dos seis locos de microssatélites analisados (Eln 2J, Eln 12b, Eln 12J, Eln 7J, Egc 17 e Egc 18) (Tabela 6; Anexo C). Destes machos, três foram coletados na Fazenda Monte Alegre (217 ha) (PR3), dois na Fazenda Santa Maria (280 ha) (PR1), um no Parque Estadual Mata dos Godoy (580 ha) (PR2), um no CPCN - Pró-Mata (1778 ha) (RS1) e um no fragmento presente nas imediações da base da ESCAS (2809 ha) (SP1). A probabilidade de um indivíduo diplóide ser heterozigoto em um ou mais locos foi altíssima ($P_{het} > 0,999$), indicando que os marcadores microssatélites tiveram um poder muito grande em revelar machos diplóides no presente estudo.

Tabela 6 - Número de indivíduos analisados (N), número de machos diplóides (M_{2n}), número de locos que revelaram machos diplóides, probabilidade de um indivíduo ser diplóide (P_{het}), porcentagem de locos polimórficos (P %), frequência total (Φ_T %) de machos diplóides e frequência de machos diplóides encontrados por fragmento ($\Phi_{fragmento}$ (%))

N	M_{2n}	No. de locos	P_{het}	P (%)	Φ_T (%)	$\Phi_{fragmento}$ (%)					
						PR1	PR2	PR3	SP1	RS1	SC1
353	8	6	>0,99	100	3,1	4,6%	2,4%	6,9%	2,3%	2,2%	0%

PR1 = Fazenda Santa Maria; **PR2** = Parque Estadual "Mata dos Godoy"; **PR3** = Fazenda Monte Alegre; **SP1** = imediações da Base da Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (ESCAS); **RS1** = Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPNP- Pró-Mata); **SC1** = Estação Experimental de Urussanga.

Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre distância geográfica e os valores de Φ_{ST} ou D_{EST} e entre a diferença de tamanho entre os fragmentos e os valores de Φ_{ST} ou D_{EST} para os diferentes pares de amostra. Apesar disto, embora não significativa, foi encontrada uma correlação de - 0,698 entre tamanho do fragmento e número de machos diplóides encontrados, quando o coeficiente de relação de Spearman foi aplicado a estes parâmetros, indicando uma tendência a uma correlação negativa entre estes.

3.2 MARCADORES MITOCONDRIAIS OBTIDOS POR PCR-RFLP

O fragmento amplificado da região 16S do DNAm_t apresentou cerca de 400 pb. As enzimas *Asel* e *DraI* revelaram, respectivamente, dois e quatro haplótipos distintos oriundos da restrição desse fragmento. A Figura 4 mostra um perfil eletroforético dos fragmentos de restrição obtidos com a enzima de restrição *DraI*, de alguns indivíduos de *E. violacea* coletados nos fragmentos PR1, RS1 e SP1.

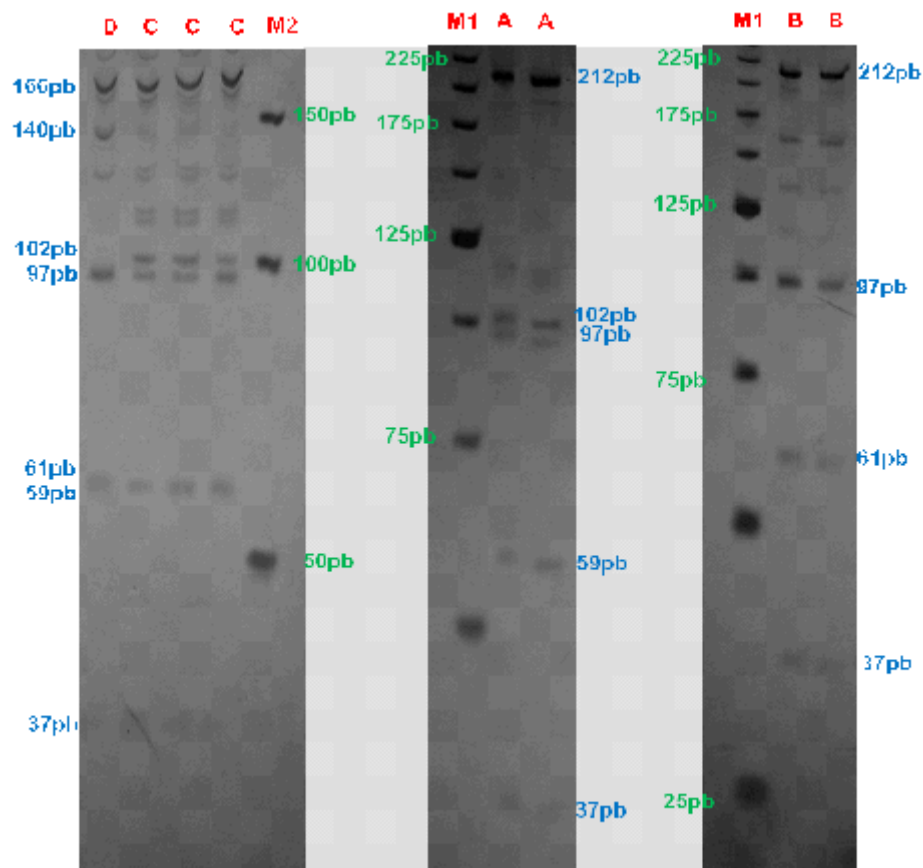


Figura 4 - Perfil eletroforético, em três geis de poliacrilamida 9%, mostrando os 4 haplótipos (A-D) obtidos para a região 16S digerida com a enzima *DraI*, em machos de *E. violacea* coletados nos fragmentos de mata Fazenda Santa Maria (PR1), Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPNP- Pró-Mata) (RS1) e imediações da Base da Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (ESCAS) (SP1). Nas canaletas indicadas com os códigos M1 e M2 estão, respectivamente, os marcadores de peso molecular de 25 e 50 pb. O peso molecular, em pares de base (pb), das diferentes bandas dos marcadores de peso molecular e dos fragmentos de restrição estão indicados em verde e azul, respectivamente.

Os resultados apresentados na Tabela 7 revelam algumas diferenças encontradas no tamanho total do fragmento amplificado da região 16S do DNAm_t, 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 e da dificuldade de estimar o tamanho dos fragmentos no gel. O número de fragmentos de restrição gerados pela endonuclease *AseI* foi, para cada abelha, de quatro ou cinco. Já com a endonuclease *DraI* este número variou de cinco a sete (Tabela 7).

Tabela 7 - Padrões de fragmentos de restrição (estimado em pares de bases) observado para o fragmento da região 16S do DNAm_t, produzidos com as endonucleases *AseI* e *DraI*. As letras A-D representam os haplótipos encontrados com cada enzima de restrição.

		16S				
<i>AseI</i>		<i>DraI</i>				
A	B	A	B	C	D	
108	108	212	212	-	-	
75	75	-	-	166	166	
-	69	-	-	-	140	
63	63	102	-	102	-	
41	41	97	97	97	97	
-	-	-	61	-	61	
-	-	59	-	59	-	
-	-	37	37	37	37	
Total	287	356	410	407	364	501

Quando combinados, os haplótipos dos machos de *E. violacea* resultaram em quatro haplótipos-compostos diferentes, daqui por diante

denominados apenas haplótipos (Tabela 8). No total foram observados quatro haplótipos distintos (AB, BA, BC, AD). O número máximo de haplótipos encontrados em um determinado remanescente foi dois. Apenas no remanescente da Fazenda Santa Maria (PR1) foi observada a presença de dois haplótipos em frequências elevadas e mais ou menos equivalentes (BC: 57,5%; AD: 42,5%). Nos remanescentes localizados no Parque Estadual “Mata dos Godoy” (PR2) e na Estação Experimental de Urussanga (SC1) houve a dominância de um dos haplótipos. No fragmento PR2 o haplótipo AB foi dominante (97,5%) e o haplótipo BA esteve presente em menor frequência (2,5%). No fragmento SC1 o haplótipo BC apresentou maior frequência (97,5%) e o AD menor (2,5%). Nos remanescentes PR3, SP1 e RS1 apenas um haplótipo foi encontrado, sendo estes, respectivamente AB, AB e BA (Figura 5).

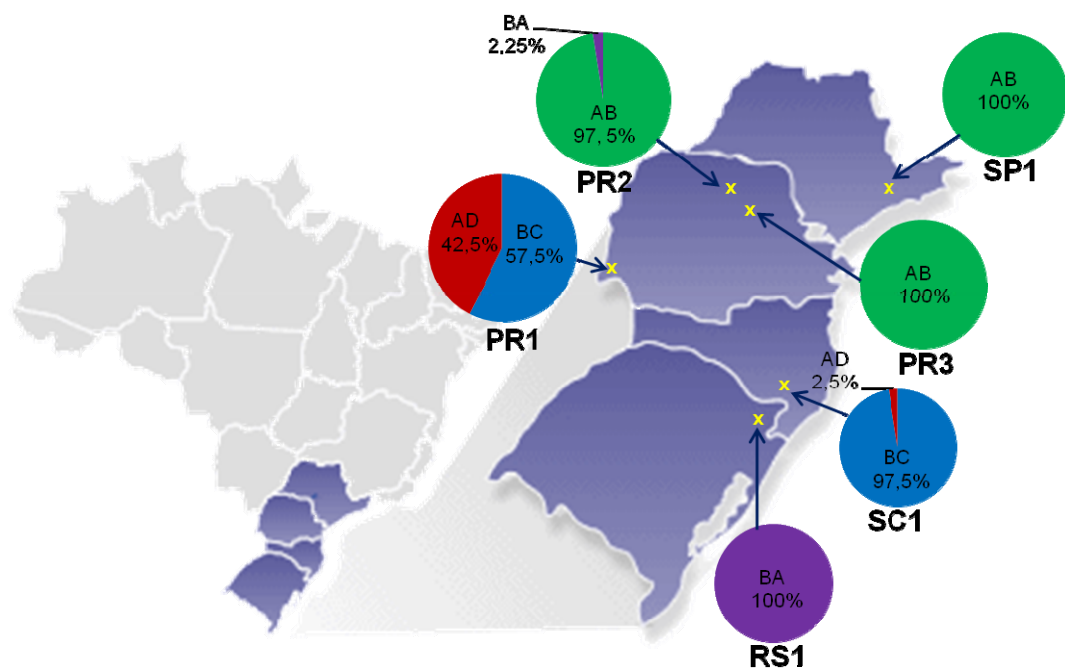


Figura 5 - Frequência e padrão de distribuição dos quatro haplótipos-compostos de machos de *E. violacea* nos seis fragmentos florestais estudados (PR1-RS1), produzidos pela restrição de um segmento da região 16S do DNAm_t, com as endonucleases *Asel* e *Dral*. **PR1** = Fazenda Santa Maria; **PR2** = Parque Estadual “Mata dos Godoy”; **PR3** = Fazenda Monte Alegre; **SP1** = imediações da Base da Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (ESCAS); **RS1** = Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPNP- Pró-Mata); **SC1** = Estação Experimental de Urussanga.

A análise da variância molecular (AMOVA) para os marcadores mitocondriais revelou forte estruturação genética ($\Phi_{ST} = 0,82112$) entre as amostras de *E. violacea* dos seis remanescentes estudados (Tabela 8) a maior parte da variação genética mostrou-se presente entre grupos (82,11%).

Tabela 8 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) e variância da frequência gênica (Φ_{ST}) das populações de *E. violacea* dos seis fragmentos florestais estudados, para os marcadores mitocondriais obtidos por PCR-RFLP.

Fonte de Variação	G.L.	Soma de Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem da Variação	Φ_{ST}
Entre as populações	5	280,762	1,39621	82,11	
Dentro das populações	234	71,175	0,30417	17,89	0,82112*
Total	239	351,938	1,70037		

* = $p < 0,01$

As comparações par a par mostraram forte diferenciação genética entre doze dos quinze comparativos realizados. Os outros três comparativos mostraram ausência de diferenciação. O maior valor de Φ_{ST} encontrado entre as áreas que se mostraram fortemente estruturadas foi de $\Phi_{ST} = 1$. Este valor foi encontrado em dois comparativos (PR3-RS1; SP1-RS1); o menor valor foi de $\Phi_{ST} = 0,349$ encontrado entre as áreas PR1 e SC1. Nos três comparativos que indicaram ausência de diferenciação genética os valores de Φ_{ST} encontrados foram, 0 (par PR3-SP1) e 0,019 (pares PR2-PR3; PR2-SP1) (Tabela 9).

Tabela 9 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) e comparação da variância da frequência gênica (Φ_{ST}) par a par, entre as amostras das 'populações' de *E. violacea* dos seis fragmentos florestais estudados; resultados obtidos por meio dos marcadores mitocôndrias (região 16S) PCR-RFLP.

Comparativo	Fonte de Variação		Φ_{ST}
	Entre (%)	Dentro (%)	
PR1-PR2	70,66	29,34	0,70664*
PR1-PR3	73,48	26,52	0,73477*
PR1-SP1	73,48	26,52	0,73477*
PR1-RS1	69,62	30,38	0,69619*
PR1-SC1	34,93	65,07	0,34925*
PR2-PR3	1,92	98,08	0,01923 ^{ns}
PR2-SP1	1,92	98,08	0,01923 ^{ns}
PR2-RS1	97,44	2,56	0,97436*
PR2-SC1	86,31	13,69	0,86308*
PR3-SP1	0	100	0 ^{ns}
PR3-RS1	100	0	1*
PR3-SC1	88,79	11,21	0,88788*
SP1-RS1	100	0	1*
SP1-SC1	88,79	11,21	0,88788*
RS1-SC1	91,43	8,57	0,91426*

* = $p < 0,01$; ^{ns} = não significativo. **PR1** = Fazenda Santa Maria; **PR2** = Parque Estadual "Mata dos Godoy"; **PR3** = Fazenda Monte Alegre; **SP1** = imediações da Base da Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (ESCAS); **RS1** = Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPNP- Pró-Mata); **SC1** = Estação Experimental de Urussanga.

A análise de estruturação genética via estatística bayesiana revelou a existência de grupos estruturados de populações (ou subpopulações). Considerou-

se três ($K = 3$) o número mais apropriado de populações ancestrais. Os resultados da contribuição das populações ancestrais são apresentados na Figura 6, a qual mostra três agrupamentos distintos: o primeiro formado pelas abelhas dos fragmentos PR1 e SC1; o segundo pelas abelhas das áreas PR2, PR3 e SP1; e o terceiro grupo formado pelas abelhas do fragmento RS1.

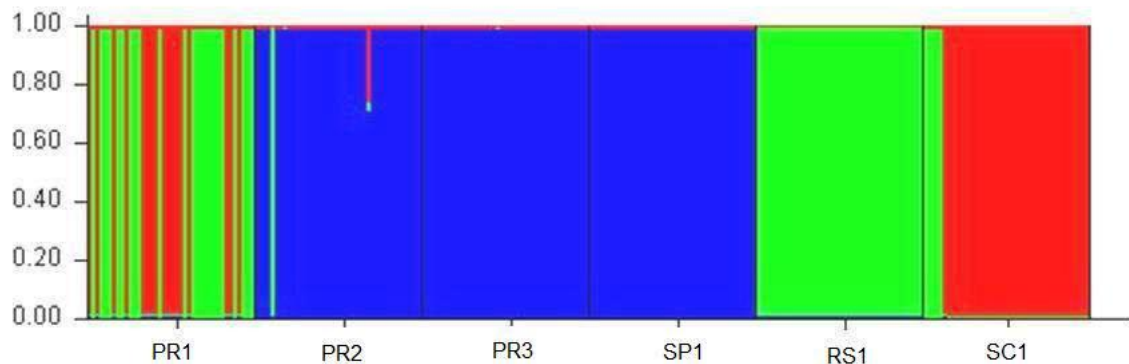


Figura 6 - Contribuição proporcional das diferentes populações ancestrais para cada um dos indivíduos dos diferentes fragmentos, considerando $K=3$. **PR1** = Fazenda Santa Maria; **PR2** = Parque Estadual “Mata dos Godoy”; **PR3** = Fazenda Monte Alegre; **SP1** = imediações da Base da Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (ESCAS); **RS1** = Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPNP- Pró-Mata); **SC1** = Estação Experimental de Urussanga.

Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre a distância geográfica e os valores de Φ_{ST} e entre a diferença de tamanho dos fragmentos e os valores de Φ_{ST} para os diferentes pares de amostra.

4 Discussão

4.1 Marcadores Microssatélites

Nesse estudo, o número de alelos para os diferentes locos analisados foi semelhante ao observado por Souza *et al.* (2007). Estes autores

fizeram análise de 53 machos desta espécie, o que representa um número bem similar às amostras dos diferentes fragmentos aqui estudados. A faixa de peso molecular dos alelos descritos por estes autores foi compatível com o do presente trabalho. Em ambos os estudos o loco Egc 18 foi o mais polimórfico.

Os valores de diversidade alélica não enviesada encontrados no presente trabalho foram elevados em todas as áreas estudadas. Sofia *et al.* (2005) analisando a diversidade genética de populações de *E. violacea* de três fragmentos florestais no norte do Paraná, com base em marcadores RAPD, também encontraram uma alta variação genética.

O valor de Φ_{ST} obtido bem como os valores de Φ_{ST} encontrados em doze dos quinze comparativos analisados indicam baixa diferenciação genética entre as amostras das diferentes localidades estudadas, apesar da considerável distância geográfica entre os fragmentos. Em três comparativos (PR1-SP1, PR2-PR3 e PR3-SP1) a diferenciação genética pode ser considerada moderada, conforme a escala de Wright (1951). Souza *et al.* (2010), ao estudar duas 'populações' de *E. violacea* presentes nos estados de Minas Gerais e São Paulo, distantes aproximadamente 530 Km, por meio da análise de dez locos de microssatélites também encontraram um valor de F_{ST} (0,025) que indicou ausência de estruturação genética.

No entanto, ao contrário dos valores de Φ_{ST} par a par, os valores de D_{EST} par a par (Jost, 2008) indicaram diferença moderada na maioria dos comparativos e alta diferenciação genética entre os três comparativos mencionados anteriormente: (PR1-SP1; PR2-PR3; PR3-SP1). Alguns estudos (Hedrick, 2005; Jost, 2008) têm argumentado que marcadores altamente polimórficos e com alta taxa de mutação, a exemplo dos microssatélites, podem resultar em uma análise enviesada para baixo nos níveis de diferenciação genética. Ou seja, podem produzir estimativas errôneas e subestimadas de F_{ST} , G_{ST} e seus análogos, quando são empregados os estimadores de diferenciação baseados nos modelos matemáticos propostos por Wright (1951) e Nei (1973). De acordo com alguns autores, as estimativas de G'_{ST} (Hedrick, 2005) e D_{EST} (Jost, 2008) foram desenvolvidas visando corrigir alguns problemas existentes nas de F_{ST} e análogos (Jost, 2008; Heller e Siegmund, 2009). Estes acreditam que tais estimativas possam contornar o

problema da não detecção de diferenciação genética e fornecer níveis de diferenciação populacional mais compatíveis com a realidade.

Em um estudo recente realizado com a espécie de abelha *Colletes floralis*, Davis *et al.* (2010) empregaram os marcadores microssatélites para avaliar a estrutura genética de doze 'populações' desta espécie coletadas ao longo da costa da Irlanda e da Escócia. Os valores de F_{ST} encontrados no estudo de Davis *et al.* (2010) indicam elevada diferenciação genética entre as amostras analisadas. Estes autores também empregaram estimadores de diferenciação genética propostos por Jost (2008), que indicaram um nível ainda maior de estruturação genética entre as localidades amostradas. No entanto, ao fazer uso das análises Bayesianas os autores encontram um menor grau de diferenciação entre as localidades, quando comparado com os níveis de diferenciação obtidos com as estimativas de F_{ST} e as propostas por Jost (2008).

No presente trabalho, assim como os valores Φ_{ST} , as análises de estruturação via estatística bayesiana indicaram ausência de diferenciação genética entre as amostras de *E. violacea* das diferentes localidades. É sabido que as abelhas da tribo Euglossini são detentoras de uma grande capacidade de voo em áreas de florestas contínuas (Janzen, 1971; Dressler, 1982) e são também capazes de se deslocar entre fragmentos florestais (Raw, 1989; Tonhasca *et al.*, 2003; Brosi, 2009). Tais características poderiam reforçar a hipótese de que a ausência de estrutura genética entre estas localidades é mantida pelo fluxo gênico entre as áreas. No entanto, as grandes distâncias presentes entre os remanescentes estudados, a falta de conexão existente entre eles e a presença de muitas áreas urbanas entre os mesmos torna a hipótese de ausência de estruturação genética devido a um atual fluxo gênico, uma explicação pouco provável. A origem recente da tribo Euglossini no cenário evolutivo apontada por alguns estudos (Dick *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2010) é outra hipótese que poderia explicar melhor tais resultados. No entanto, a discordância entre os valores de Φ_{ST} /análises de estruturação via estatística bayesiana e valores de D_{EST} aliada aos resultados obtidos com os marcadores mitocondriais obtidos por PCR-RFLP não dão suporte a esta hipótese.

Com relação aos machos diploides, o modelo de proposto por Whiting sugere que o sexo em abelhas seja determinado por apenas um loco

multialélico (loco *CSD*). Ainda, segundo este modelo, se em um indivíduo diploide este loco estiver em homozigose ocorrerá o nascimento de um macho diplóide, caso contrario nascerá uma fêmea (Zayed e Packer, 2005). Deste modo, é esperado que o endocruzamento produza maiores quantidades de machos diploides, uma vez que tal sistema de acasalamento aumenta o número de homozigotos na população (Unruh e Messing, 1993). É sabido que as chances de endocruzamento são aumentadas em populações pequenas. Então, seguindo esta linha de raciocínio, seria esperado que populações pequenas com altos níveis de endocruzamento apresentassem maiores frequências de machos diplóides. Alguns estudos alegam que a redução no tamanho efetivo das populações com consequente perda de diversidade alélica (especialmente no loco *CSD*) seriam as causas determinantes para o aumento de machos diplóides em populações de algumas espécies de Euglossini (Roubik *et al.*, 1996; Zayed *et al.*, 2004). Atualmente na literatura, existem dados discrepantes com relação à frequência de machos diplóides nas populações de espécies de Euglossini. Em alguns estudos foram encontradas altas frequências desses machos, chegando a 100% em alguns casos (Roubik *et al.*, 1996; Zayed *et al.*, 2004; López-uribe *et al.*, 2007). Por outro lado, outros estudos apontam a ocorrência deles em baixas frequências (Takahashi *et al.*, 2001; Cerântola *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2010). As frequências de machos diplóides da espécie *E. violacea* observadas no presente estudo foram intermediárias e parecem estar relacionadas com o tamanho dos fragmentos amostrados pois, apesar de não haver correlação significativa entre o tamanho dos fragmentos e o número de machos diplóides, foi detectada uma tendência a uma correlação negativa entre estes dois parâmetros. Neste sentido, mais estudos envolvendo um maior número de machos por fragmento devem ser realizados para o estabelecimento de um consenso acerca da frequência real de machos diplóides nas populações de Euglossini. Os nossos resultados indicam que estudos futuros devem dar mais atenção ao tamanho das áreas amostradas, ao número de machos analisados em cada localidade e a espécie analisada.

4.2 MARCADORES MITOCONDRIAIS OBTIDOS POR PCR-RFLP

Ao contrário do observado para os marcadores microssatélites com as análises de estruturação via estatística bayesiana e as estimativas de Φ_{ST} , os resultados parciais para os marcadores mitocondriais apontam para uma acentuada diferenciação genética entre as amostras de *E. violacea* das diferentes localidades. Esta foi devido à grande diferença encontrada entre onze dos quinze comparativos realizados (Tabela 9). Em apenas três (PR2-PR3; PR2-SP1; PR3-SP1) destes comparativos foi verificada ausência de diferenciação genética. Em um dos comparativos efetuados foi encontrada uma moderada diferenciação genética (par PR1-SC1). A interpretação das diferenças encontradas entre estes comparativos parece indicar a formação de três grupos entre as seis localidades. Um formado pelas abelhas dos fragmentos PR2, PR3 e SP1, outro formado pelas amostras dos fragmentos PR1 e SC1 e, o último contendo isoladamente a amostra da área RS1. Esta separação nestes mesmos três grupos foi evidenciada pelas análises de estruturação via estatística bayesiana efetuadas pelo programa *Structure 2.2*.

Se as estimativas de Φ_{ST} e análises de estruturação via estatística bayesiana estiverem mais próximas da realidade, a divergência encontrada entre os resultados com os diferentes marcadores pode estar relacionada às diferenças inerentes aos genomas mitocondrial e nuclear, a exemplo das taxas evolutivas e formas de herança genética destes. Um aspecto importante que deve ser considerado na tentativa de compreender melhor as discrepâncias encontradas entre estas duas análises, relaciona-se à origem materna do DNAm, que pode estar de algum modo refletindo o reconhecido comportamento filopátrico das fêmeas (Dodson *et al.*, 1969). As fêmeas tendem a se manter mais ligadas aos ninhos do que os machos, que o abandonam logo após o nascimento (emergência). Deste modo, a maior estruturação encontrada a partir das análises mitocondriais pode estar refletindo, em parte, a filopatria das fêmeas. O outro aspecto relevante diz respeito à diferença na taxa de evolução dos marcadores microssatélites e mitocondriais. De acordo com Wang (2010) a taxa de evolução dos marcadores microssatélites é de $\mu = 5 \times 10^{-4}$ o que faz com que estes marcadores sejam muito interessantes e informativos para estimativas sobre processos microevolucionários

recentes e em curso. Por outro lado, o DNA mitocondrial possui taxa de evolução de $\mu = 6 \times 10^{-8}$, o que tornaria os marcadores mitocondriais mais adequados para capturar processos microevolucionários mais antigos. Ainda segundo este autor, a diferença na taxa de mutação entre estes marcadores é da ordem de 10^4 , fazendo com que eles apresentem utilidade para inferências em escalas de tempo muito distintas. Sendo assim, a ausência de estruturação genética encontrada com os marcadores microssatélites pode estar associada a um passado evolutivo recente, como por exemplo, em um cenário onde todos os ecossistemas da Mata Atlântica se encontravam conectados com elevado grau de fluxo gênico. É sabido que esta era a situação vigente antes do intenso processo de degradação ao bioma Mata Atlântica ocasionado pelo homem.

De modo diverso, a estruturação genética observada nas análises mitocondriais pode estar atrelada a um passado mais remoto. Talvez as glaciações pleistocênicas possam ter fragmentado as populações de *Eufriesea violacea* ao longo de sua distribuição e o genoma mitocondrial ainda guarde um pouco desta história. Como mencionado, o estudo filogeográfico realizado por Dick *et al.* (2004) feito com base no sequenciamento de um segmento do gene COI do DNAm_t não apontou diferença para abelhas de diferentes gêneros da tribo Euglossini coletadas na região da bacia amazônica. Outros estudos com base no DNAm_t de diferentes grupos de animais presentes no bioma Mata Atlântica têm alegado estruturação genética associada a glaciações pleistocênicas. Como é o caso dos estudos a abelha *Plebeia remota* (Francisco e Arias, 2010) e com subespécies de jararacas (*Bothrops jararaca*) realizado por Graziotin *et al.* (2006).

Por outro lado, se compararmos os dados obtidos com os marcadores mitocondriais com valores encontrados por meio das estimativas propostas por Jost (2008) o quadro muda. Como mencionado, estas estimativas indicam alta diferenciação genética entre três localidades (PR1-SP1, PR2-PR3 e PR3-SP1). Entretanto não existe a formação dos mesmos agrupamentos obtidos por meio do DNAm_t. Pelo contrário, áreas que se mostraram extremamente semelhantes com os marcadores mitocondriais (PR3-SP1; PR2-PR3) se mostram distintas ao aplicar as estimativas de Jost (2008). Se estas duas análises estiverem corretas pode ser que elas estejam indicando restrições ao fluxo gênico de tempos

geológicos diferentes. Sendo assim, as estimativas obtidas por meio dos marcadores microssatélites poderiam estar refletindo restrições ao fluxo gênico ocasionadas pela fragmentação florestal e degradação antrópica, ao passo que a estruturação encontrada com os marcadores mitocondriais poderiam estar relacionada a um passado mais remoto, como com as fragmentações pleistocênicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Klabin S.A. e CAPES pelo apoio financeiro. À CAPES pela bolsa de mestrado cedida a aluna Gabriele A. Freiria. À UEL pelo apoio nas coletas e aos proprietários das reservas particulares, IBAMA e IAP pela autorização fornecida para as coletas das abelhas.

Referências Bibliográficas

- Avise, J.C. (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avise, J.C. (2004) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. 2a. ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Avise, J.C. (2009) Phylogeography: retrospect and prospect, *J. Biogeogr.* 36, 3-15.
- Berkelhamer, R.C. (1983) Intraspecific genetic variation and haplodiploidy, eusociality, and polygyny in the Hymenoptera, *Evolution* 37, 540-545.
- Brosi, B.J. (2009) The effects of forest fragmentation on Euglossini bee communities (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Conserv. Biol.* 142, 414-423.
- Cameron, S.A. (2004) Phylogeny and biology of Neotropical orchid bees (Euglossini). *Annu. Rev. Entomol.* 49, 377-404.
- Cerântola, N.C.M., OI, C.A., Cervini, M., Del Lama, M.A. (2010) Genetic differentiation of urban populations of *Euglossa cordata* from the state of São Paulo, Brasil. *Apidologie* doi: 10.1051/apido/2010055.
- Chao A, Shen T.J. (2003) Program SPADE (Species Prediction And Diversity Estimation). Computer software distributed by authors, [online] <http://chao.stat.nthu.edu.tw/softwareCE.html> (accessed on 24 January 2011).

Danforth, B. (2007) Bees. *Curr. Biol.* 5, 156-161. 2007.

Davis, E.S., Murray, T.E., Fitzpatrick, U., Brown, M.J.F.; Paxton, R.J. (2010) Landscape effects on extremely fragmented populations of a rare solitary bee, *Colletes floraris*. *Mol. Ecol.* doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04868.x.

Dick, C.W., Roubik, D.W., Gruber, K.F., 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.

Dodson, C.H., Dressler, R.L., Hills, H.G., Adams, R.M., Williams, N.H. (1969) Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science* 164, 1243-1249.

Dressler, R.L. (1982) Biology of orchid bees (Euglossini). *Annu. Ver. Ecol. S.* 13, 373-394.

Eltz, T., Roubik, D.W., Lunau, K. (2005) Experience-dependent choices ensures species-specific fragrance accumulation in male orchid bees. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 59, 149-156.

Eltz, T., Zimmermann, Y., Haftmann, J., Twele, R., Francke, W., Quezada-Euan, J.J.G., Lunau, K. (2007) Enflourage, lipid recycling and the origin of perfume collection in orchid bees. *Proc. R. Soc Lond. B.* 274, 2843-2848.

Essinger, L.N. (2005) Euglossini (Apidae, Hymenoptera) no sul de Santa Catarina). Dissertação de Mestrado. Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611-2620.

Excoffier L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data, *Genetics* 131, 479-491.

Excoffier, L., Laval, G., Scheneider, S. (2006) Arlequin ver 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. Computer software distributed by authors, [online] <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>. (accessed on 26 January 2006).

Ferreira, P.M.A., Eggers, L. (2008) Espécies de Cyperaceae do Centro de Pesquisa e Conservação na natureza Pró-Mata, município de São Francisco de Paula, RS, Brasil. *Acta Bot. Brasilica.* 22, 1, 173-185.

Francisco, F.O., Arias, M.C (2010). Inferences of evolutionary and ecological events that influenced the population structure of *Plebeia remota*, a stingless bee from Brazil. *Apidologie* 41, 216-224.

Giangarelli, D.C., Freiria, G.A., Colatreli, O.P.; Suzuki, K.M.; Sofia, S.H. (2009)

Eufriesea violacea (Blanchard): a euglossine species potentially sensitive to forest patch deterioration in Brazil, Neotrop. Entomol. 38, 610-615.

Grazziotin, F.G., Monzel, M., Echeverrigaray, S., Bonatto, S.L. (2006) Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest, Mol. Ecol. 15, 3969-3982.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan P.D. (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. [online] http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm (accessed on 30 January 2011).

Hedrick P.W. (2005) A standardized genetic differentiation measure. Evolution 59, 1633-1638.

Heller, R., Siegismund, H.R. (2009) Relationship between three measures of genetic differentiation G_{ST} , D_{EST} , and G'_{ST} : how wrong have we been? Mol. Ecol. 18, 2080-2083.

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

Jost, L. (2008) G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. Mol. Ecol. 17, 4015-4026.

Kremen C., Williams N.M., Aizen M.A., *et al.* (2007) Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of landuse change. Ecol. Lett. 10, 299–314.

López-Uribe, M.M., Almanza, M.T., Ordonez, M. (2007) Diploid male frequencies in Colombian population of Euglossine bees. Biotropica 39, 660-662.

Meirmans P.G. (2006) Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. Evolution 60, 2399-2402.

Melo, L.A.M.N., Soares, R.V., Siqueira, J.D.P., Kirchner, F.F. (2006) Modelagens de combustíveis florestais no Parque Nacional do Iguazu. Floresta 36, 3, 415-424.

Michener, C. D. (2000) The bees of the world. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.

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

Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. P. Natl Acad of Sci. 70, 3321–3323.

Nemésio, A. (2009) Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of Brazilian Atlantic Forest. Zootaxa 2041. 1-242.

- Owen, R. E., Packer, L. (1994) Estimation of the proportion of diploid males in populations of Hymenoptera. *Heredity*. 72, 219-227.
- Packer, L., Owen, R. (2001) Population genetic aspects of pollinator decline. *Conserv. Ecol.* 5, article 4. <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art4>.
- Pamilo, P., Varvio-Aho, S.L., Pekkarinen, A. (1978) Low enzyme gene variability in Hymenoptera as a consequence of haplodiploidy. *Hereditas* 88, 93-99.
- Pascual, A.N.T., Suzuki, K.M., Almeida, F.S., Sodré, L.M.K., Sofia, S.H. (2006) Evaluation of the RAPD Profiles from Different Body Parts of *Euglossa pleosticta* Dressler Male Bees (Hymenoptera: Apidae, Euglossina). *Neotrop. Entomol.* 35, 811-817.
- Paxton, R.J., Thorén P.A., Gyllenstrand N., and Tengo, J. (2000) Microsatellite DNA analysis reveals low diploid male production in a communal bee with inbreeding. *Biol. J. Linn. Soc.* 68, 483-502.
- Pinheiro, E.S., Kux, H.J.H. (2003) Uso de imagens *Quikbird* para o mapeamento de um setor da Mata Atlântica no RS: Estudo de Caso, CPCN Pró-Mata. in: *Anais XI SBSR*, Belo Horizonte, pp. 293-296.
- Pritchard, J.K., Wen, X., Falush, D. (2007) Documentation for structure software: Version 2.2. Software [online] <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software>. 2007 (acceded on 22 April 2009).
- Ramírez, S., Roubik, D.W., Skov, C., Pierce, N.E. (2010) Phylogeny, diversification patterns and historical biogeography of euglossine orchid bees (Hymenoptera: Apidae). *Biol. Journal. Linn Soc.* 100, 552-572.
- Raw, A. (1989) The dispersal of euglossine bees between isolated patches of eastern Brazilian wet forest (Hymenoptera, Apidae), *Rev. Bras. Entomol.* 33, 103-107.
- Reis, N.R., Peracchi, A.L., Fandiño-Mariño, H., Rocha, V.J. (2005) *Mamíferos da Fazenda Monte Alegre*. Eduel / Klabin. Londrina, Brasil.
- Roubik, D.W., Hanson, P.H. (2004) *Abejas de orquídeas de la América tropical. Biología y guía de campo (Orchid bees of Tropical América) Biology and field guide*. in: INBio Press, Santo Domingo de Heredia, Costa Rica.
- Roubik, D.W., WEIGHT, L.A., BONILLA, M.A. (1996) Population genetics, diploidmales, and limits to social evolution of euglossine bees. *Evolution* 50, 931-935.
- Shoemaker, D.D., Costa, J.T., Ross, K.G. (1992) Estimates of heterozygosity in two social insects using a large number of electrophoretic markers. *Heredity* 69, 573-582.
- Sofia, S.H., Paula, F.M., Santos, A.M., Almeida, F.S., Sodré, L.M.K. (2005) Genetic structure analyses of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae) populations from southern Brazilian Atlantic rainforest remnants. *Genet. Mol. Biol.* 28, 479-484.

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

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

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

Souza, R.O., Del Lama, M.A., Cervini, M., Mortari, N., Eltz, T., Zimmermann, Y., Bach, C., Brosi, B.J., Suni, S., Quezada-Euán, J.J.G., Paxton, R.J. (2010) Conservation genetics of neotropical pollinators revisited: microsatellite analysis suggests that diploid males are rare in orchid bees. *Evolution* doi:10.1111/j.1558-5646.2010.01052.x.

Suzuki, K.M., Arias, M.C., Giangarelli, D.C., Freiria, G.A., Sofia, S.H. (2010) Mitochondrial DNA diversity of orchid bee *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera: Apidae) populations assessed by PCR-RFLP. *Biochem. Genet.* doi: 10.1007/s10528-009-9325-4.

Takahashi, N.C., Peruquetti, R.C., Del Lama, M.A., Campos, L.A.O. (2001) A reanalysis of diploid male frequencies in euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). *Evolution* 55, 1897-1899.

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

Torezan, J.M. (org.) (2005) *Ecologia do Parque Estadual Mata dos Godoy*. Londrina: Itedes, Londrina, Brasil.

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

Wang, I.J. (2010) Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography, *Mol. Ecol.* 19, 2605-2608.

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

Zane, L. Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.* 11, 1-16.

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, D.W., Packer, L. (2004) Use of diploid male frequency data as an indicator of pollinator decline. *Proc. R. Soc Lond. B.* 271, 9-2.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- Os marcadores microssatélites indicaram ocorrência de polimorfismo nas regiões de microssatélite no genoma, mostrando-se eficientes para o estudo de estrutura e variabilidade genética das seis ‘populações’ estudadas;
- Os seis locos de microssatélites se mostraram polimórficos para *Eufriesea violacea*;
- As estimativas convencionais de diferenciação genética (F_{ST} e análogos) e as análises de estruturação via estatística bayesiana apontaram ausência de diferenciação genética entre as localidades por meio dos marcadores microssatélites. No entanto, uma estimativa de diferenciação genética proposta recentemente (D_{est}) apontou a existência de diferenciação genética entre algumas localidades. Tal fato indica que estudos futuros devem dar mais atenção a estas novas estimativas, para um melhor entendimento da estrutura genética das populações;
- Os marcadores microssatélites revelaram machos diplóides nas áreas amostradas. A frequência de machos diplóides encontrada neste estudo aliada à aparente correlação entre número de machos diplóides e o tamanho dos fragmentos amostrados, sugere que estudos futuros devam dar mais atenção ao tamanho dos fragmentos e ao tamanho amostral, na determinação das frequências de machos diplóides presentes nas populações de *Euglossini*;
- A região mitocondrial (16S) indicou alta diferenciação genética entre as amostras e a formações de três agrupamentos entre as localidades;
- A discordância entre as análises baseadas no DNAm_t e microssatélites sugerem que as taxas evolutivas e padrões de

herança distintos, destes marcadores, podem fornecer informações diferentes, que devem ser consideradas e interpretadas com todo cuidado na tentativa de compreender melhor a estruturação genética presente nas populações de Euglossini;

- Os resultados obtidos indicam que é muito importante conservar os remanescentes de Mata Atlântica analisados para a manutenção da diversidade genética da espécie *Eufriesea violacea*.

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.
- ANDRADE, L.N. **Estrutura genética de populações de duas espécies de abelhas Euglossini acessadas por meio de marcadores microssatélites**. 2009. 72f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.
- 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, 2001. cap.17, p.143-152.
- AUGUSTO, S.C.; GARÓFALO, C.A. Comportamento das fêmeas nas associações formadas em ninhos de *Euglossa cordata* (Hymenoptera; Apidae; Euglossini). In: **Anais do I Encontro sobre Abelhas**, Ribeirão Preto, p.171-181. 1994.
- AUGUSTO, S.C.; GARÓFALO, C.A. Bionomics and sociological aspects of *Euglossa fimbriata* (Apidae, Euglossini). **Genetics and Molecular Research**, v.8, p.525-538. 2009.
- AUGUSTO, S.C.; GARÓFALO, C.A. Task allocation and interactions among females in *Euglossa carolina* nests (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). **Apidologie**, DOI: 10.1051/apido/2010040. 2010.
- AVISE, J.C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Harvard University Press, Cambridge, MA, 2000.
- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. 2.ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 2004.
- AVISE, J.C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v.36, p.3-15. 2009.
- BERKELHAMER, R.C. Intraspecific genetic variation and haplodiploidy, eusociality, and polygyny in the Hymenoptera. **Evolution**, v.37, p.540-545. 1983.
- BRITO, R.M.; ARIAS, M.A. Population analysis of *Partamona mulata* e *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). In: VII ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ABELHAS, 2008, Ribeirão Preto, **Anais do VII Encontro Brasileiro sobre Abelhas**, Ribeirão Preto, 2008. p.568.
- BROSI, B.J. The effects of forest fragmentation on Euglossini bee communities (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Conservation Biology**, v.142, p.414-423. 2009.
- CABANNE, G.S.; SANTOS, F.R.; MIYAKI, C.Y. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**,

v.91, p.73-84. 2006.

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

CERÂNTOLA, N.C.M; OI, C.A.; CERVINI, M.; DEL LAMA, M.A. Genetic differentiation of urban populations of *Euglossa cordata* from the state of São Paulo, Brasil. **Apidologie**, doi: 10.1051/apido/2010055. 2010.

CHAO A, SHEN T.J. 2003. **Program SPADE (Species Prediction And Diversity Estimation)**. Computer software distributed by authors <http://chao.stat.nthu.edu.tw/softwareCE.html>. Downloaded 24 jan 2011.

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

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

DANFORTH, B. Bees. **Current Biology**, v. 5, p.156-161. 2007.

DAVIS, E.S.; MURRAY, T.E.; FITZPATRICK, U.; BROWN, M.J.F.; PAXTON, R.J. Landscape effects on extremely fragmented populations of a rare solitary bee, *Colletes floraris*. **Molecular Ecology**, doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04868.x. 2010.

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

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

DRESSLER, R.L. Pollination by euglossine bees. **Evolution**, v.22, p.202-210. 1968.

ELTZ, T.; ROUBIK, D.W.; LUNAU, K. Experience-dependent choices ensures species-specific fragrance accumulation in male orchid bees. **Behavior Ecology Sociobiology**, v.59, p.149-156. 2005.

ELTZ, T.; ZIMMERMANN, Y.; HAFTMANN, J.; TWELE, R.; FRANCKE, W.; QUEZADA-EUAN, J.J.G.; LUNAU, K. Enflourage, lipid recycling and the origin of perfume collection in orchid bees. **Proceedings of the Royal Society B**, v.274, p.2843-2848. 2007

ENGEL, M.S. The first fossil *Euglossa* and phylogeny of the Orchid Bee

(Hymenoptera: Apidae; Euglossini). **American Museum Novitates**, v.3272, p.1-14. 1999.

ESSINGER, L.N. **Euglossini (Apidae, Hymenoptera) no sul de Santa Catarina**. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2005.

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

EXCOFFIER L.; SMOUSE P.E.; QUATTRO J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data, **Genetics**, v.131, p.479-491. 1992.

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

FERREIRA, P.M.A.; EGGERS, L. Espécies de Cyperaceae do Centro de Pesquisa e Conservação na natureza Pró-Mata, município de São Francisco de Paula, RS, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.22, n.1, p.173-185. 2008.

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

FRANCISCO, F.O.; ARIAS, M.C. Inferences of evolutionary and ecological events that influenced the population structure of *Plebeia remota*, a stingless bee from Brazil. **Apidologie**, v.41, p.216-224. 2010.

GAROFALO, C. A. Social structure of *Euglossa cordata* nests (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Entomologia Generalis**, v.11, p.77-83. 1985.

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**, v.38, p.610-615. 2009.

GRAZZIOTIN, F.G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATTO, S.L. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest, **Molecular Ecology**, v.15, p.3969-3982. 2006.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; P. D. RYAN, 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Computer software distributed by authors. http://palaeoelectronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm. Downloaded 24

jan 2011

HEDRICK, P.W. A standardized genetic differentiation measure. **Evolution**, v.59, p.1633-1638. 2005.

HELLER, R.; SIEGISMUND, H.R. Relationship between three measures of genetic differentiation G_{ST} , D_{EST} , and G'_{ST} : how wrong have we been? *Molecular Ecology*. v.18, p.2080-2083. 2009.

HILLIS, D.M., MORITZ, C., and MABLE, B.K. 1996. **Molecular Systematics 2nd Edition**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1996.

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

JOST, L. G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. **Molecular Ecology**, v.17, p.4015-4026. 2008.

KERR, W. E. Sex determination in honey bees (Apinae and Meliponae) and its consequences. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p.601-611. 1997.

KIMSEY, L. S. Generic relationships within the Euglossini (Hymenoptera: Apidae). **Systematic Entomology**, v.12, p.63-72. 1987.

KIMSEY, L.S. Systematics of bees of the genus *Eufriesea* (Hymenoptera, Apidae). **Entomology**, v.95, p.1-125. 1982.

KREMEN C.; WILLIAMS N.M., AIZEN, M.A.; et al. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of landuse change. **Ecology Letters**, v.10, p.299-314. 2007.

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

LÓPEZ-URIBE, M.M.; GREEN, A.N.; RAMÍREZ, S.R.; BOGDANOWICZ, S.M.; DANFORTH, B.N. Isolation and cross-species characterization of polymorphic microsatellites for orchid bee *Eulaema meriana* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Conservation Genetics Resources**. doi: 10.1007/s12686-010-9271-9. 2010.

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, 2001. cap.15, p.153-16.

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

MELO, L.A.M.N.; SOARES, R.V.; SIQUEIRA, J.D.P.; KIRCHNER, F.F. Modelagens de combustíveis florestais no Parque Nacional do Iguaçu. **Floresta**. v.36, n.3, p.415-424. 2006.

MICHENER C.D. **The Bees of the World**. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2000.

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

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.70, p.3321-3323. 1973.

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

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

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

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

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

PAMILO, P.; VARVIO-AHO, S.L.; PEKKARINEN, A. Low enzyme gene 702 variability in Hymenoptera as a consequence of haplodiploidy. **Hereditas**, v.88, p.93-99. 1978.

PASCUAL, A.N.T.; SUZUKI, K.M.; ALMEIDA, F.S.; SODRÉ, L.M.K.; SOFIA, S.H. Evaluation of the RAPD Profiles from Different Body Parts of *Euglossa pleosticta* Dressler Male Bees (Hymenoptera: Apidae, Euglossina). **Neotropical Entomology**, v.35, p.811-817. 2006.

PAXTON, R.J.; THORÉN P.A.; GYLLENSTRAND N.; TENGO, J. Microsatellite DNA analysis reveals low diploid male production in a communal bee with inbreeding. **Biological Journal of Linnean Society**. v.68, p.483-502. 2000.

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

PIERCE, B.A. **Genética: um enfoque conceitual**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

PINHEIRO, E.S.; KUX, H.J.H. Uso de imagens *Quikbird* para o mapeamento de um setor da Mata Atlântica no RS: Estudo de Caso, CPCN Pró-Mata. **Anais XI SBSR**,

Belo Horizonte, 2003. p.293-296.

POINAR, G. *Paleoeuglossa melissiflora* Gen n., sp. n. (Euglossinae: Apidae), fossil orchid bees in Dominican amber. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.71, p.29-34. 1998.

PRITCHARD, J.K.; WEN, X.; FALUSH, D. **Documentation for structure software: Version 2.2**. Computer software distributed by authors. 2007. Disponível em: <<http://pritch.bsd.uchicago.edu/software>>. Accessed on: 22 april 2009.

RAMIREZ, S.; DRESSLER, R.L.; OSPINA, M. Abejas Euglossinas (Hymenoptera: Apidae) de la Region Neotropical; Listado de especies com nota sobre su biologia. **Biota Colombiana**, v.3, p.7-118. 2002.

RAMÍREZ, S.; ROUBIK, D.W.; SKOV, C.; PIERCE, N.E. Phylogeny, diversification patterns and historical biogeography of euglossine orchid bees (Hymenoptera: Apidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v.100, p.552-572. 2010.

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.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; FANDIÑO-MARIÑO, H.; ROCHA, V.J.; **Mamíferos da Fazenda Monte Alegre**. Klabin: Eduel, 2005.

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

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

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

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

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

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, p.217-222. 2004.

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

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

SOUZA, R.O.; DEL LAMA, M.A.; CERVINI, M.; MORTARI, N.; ELTZ, T.; ZIMMERMANN, BACH, C.; BROSI, B.J.; SUNI, S.; QUEZADA-EUÁN, J.J.G.; PAXTON, R.J. Conservation genetics of neotropical pollinators revisited: microsatellite analysis suggests that diploid males are rare in orchid bees. **Evolution**. doi:10.1111/j.1558-5646.2010.01052.x. 2010.

SUZUKI, K.M. *et al.* Mitochondrial DNA diversity of orchid bee *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera: Apidae) populations assessed by PCR-RFLP. **Biochemical Genetics**, doi:10.1007/s10528-009-9325-4. 2010.

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

THOMÉ, M.T.C.; ZAMUDIO, K.R.; GIOVANELLI, J.G.R.; HADDAD, C.F.B.; BALDISSERA, F.A.; ALEXANDRINO, J. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.55, p.1018-1031. 2010.

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

TOREZAN, J.M. (org.). **Ecologia do Parque Estadual Mata dos Godoy**. Londrina: Itedes, 2005.

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

WANG, I.J. Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography, **Molecular Ecology**, v.19, p.2605-2608. 2010.

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

WRIGHT, S. The genetical structure of population. **Annals of Eugenics**, v.15, p.323-354. 1951.

ZAYED A e PACKER L. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. **Proceedings of the 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 B**, v.271, p.9-12. 2004.

ANEXOS

ANEXO A

Frequências dos alelos de microssatélite encontrados nas amostras de machos dos seis remanescentes florestais estudados (PR1, PR2, PR3, SP1, RS1 e RS3) para os seis locos analisados. pb = tamanho estimado em pares de base.

Loco	alelo	pb	PR1	PR2	PR3	SP1	RS1	SC1
Eln 2J	1	211	0,226415	0,283333	0,216667	0,224138	0,271186	0,2
Eln 2J	2	207	0,566038	0,616667	0,516667	0,5	0,542373	0,633333
Eln 2J	3	203	0,207547	0,1	0,266667	0,275862	0,186441	0,166667
Eln 12b	1	199	0,196078	0,152542	0,20339	0,101695	0,2	0,133333
Eln 12b	2	196	0,470588	0,169492	0,610169	0,220339	0,333333	0,416667
Eln 12b	3	193	0,27451	0,610169	0,152542	0,644068	0,383333	0,316667
Eln 12b	4	187	0,039216	0	0	0	0,033333	0,116667
Eln 12b	5	203	0,019608	0,033898	0,033898	0,016949	0,05	0
Eln 12b	6	207	0	0,016949	0	0,016949	0	0,016667
Eln 12b	7	217	0	0,016949	0	0	0	0
Eln 12J	1	260	0,057692	0,258621	0,118644	0,1	0,310345	0,186441
Eln 12J	2	257	0,192308	0,310345	0,186441	0,35	0,155172	0,271186
Eln 12J	3	254	0,230769	0,224138	0,169492	0,133333	0,189655	0,186441
Eln 12J	4	249	0,288462	0,034483	0,118644	0,2	0,12069	0,135593
Eln 12J	5	246	0,115385	0,068966	0,084746	0,066667	0,068966	0,067797
Eln 12J	6	243	0,096154	0,103448	0,067797	0,066667	0	0,033898
Eln 12J	7	267	0,019231	0	0,254237	0,083333	0,155172	0,118644
Eln 7J	1	172	0,019608	0,1	0,133333	0,107143	0,086207	0,083333
Eln 7J	2	166	0,196078	0,25	0,2	0,125	0,137931	0,133333
Eln 7J	3	163	0,215686	0,216667	0,3	0,267857	0,396552	0,283333
Eln 7J	4	160	0,352941	0,283333	0,1	0,267857	0,12069	0,216667
Eln 7J	5	156	0,039216	0	0,016667	0,035714	0,034483	0,116667
Eln 7J	6	176	0	0,033333	0,05	0,053571	0,017241	0,033333
Eln 7J	7	159	0,137255	0,016667	0,016667	0	0,103448	0
Eln 7J	8	169	0,039216	0,1	0,183333	0,125	0,103448	0,066667
Eln 7J	9	179	0	0	0	0,017857	0	0,066667
Egc 17	1	247	0,113208	0	0,033333	0,035088	0,016949	0,1
Egc 17	2	241	0,264151	0,133333	0,466667	0,035088	0,084746	0,266667
Egc 17	3	238	0,377358	0,366667	0,333333	0,122807	0,20339	0,233333
Egc 17	4	232	0,169811	0,4	0,1	0,315789	0,237288	0,15
Egc 17	5	227	0	0,016667	0	0,438596	0,118644	0,15
Egc 17	6	223	0,018868	0,033333	0	0,017544	0,152542	0,05
Egc 17	7	250	0,056604	0,033333	0,066667	0,017544	0,016949	0,033333
Egc 17	8	256	0	0	0	0	0,016949	0,016667
Egc 17	9	215	0	0,016667	0	0,017544	0,152542	0

Continuação do Anexo A

Loco	alelo	pb	PR1	PR2	PR3	SP1	RS1	SC1
Egc 18	1	230	0,134615	0,283333	0,155172	0,103448	0,254237	0,15

Egc 18	2	226	0,326923	0,2	0,034483	0,189655	0,152542	0
Egc 18	3	220	0,115385	0,05	0,068966	0,12069	0,050847	0,083333
Egc 18	4	210	0,076923	0,1	0,017241	0,224138	0,135593	0,133333
Egc 18	5	207	0,153846	0,083333	0	0,206897	0,101695	0
Egc 18	6	241	0,019231	0	0,068966	0,017241	0,033898	0,216667
Egc 18	7	229	0,038462	0,116667	0,086207	0,137931	0,169492	0,066667
Egc 18	8	215	0,134615	0,066667	0,137931	0	0,016949	0,116667
Egc 18	9	238	0	0	0,241379	0	0,067797	0,2
Egc 18	10	235	0	0,1	0,172414	0	0,016949	0,033333
Egc 18	11	247	0	0	0,017241	0	0	0

PR1 = Fazenda Santa Maria; **PR2** = Parque Estadual "Mata dos Godoy"; **PR3** = Fazenda Monte Alegre; **SP1** = imediações da Base da Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (ESCAS); **RS1** = Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPNP- Pró-Mata); **SC1** = Estação Experimental de Urussanga.

ANEXO B

Análise da Variância Molecular (AMOVA) e comparação da variância da frequência gênica (Φ_{ST}) par a par, entre as populações de *E. violacea* dos seis fragmentos florestais estudados para marcadores microsatélites.

Comparativo	Fonte de Variação		Φ_{ST}
	Entre (%)	Dentro (%)	
PR1-PR2	4,28	95,72	0,04278*
PR1-PR3	3,89	96,11	0,03894*
PR1-SP1	6,15	93,85	0,06159*
PR1-RS1	3,39	96,61	0,03395*
PR1-SC1	2,64	97,36	0,02645*
PR2-PR3	8,11	91,89	0,08112*
PR2-SP1	3,79	96,21	0,03794*
PR2-RS1	2,08	97,92	0,02081*
PR2-SC1	4,01	95,99	0,04007*
PR3-SP1	1,08	98,92	0,10815*
PR3-RS1	4,71	95,29	0,04706*
PR3-SC1	1,87	98,13	0,01868*
SP1-RS1	3,32	96,68	0,03323*
SP1-SC1	4,64	95,36	0,04640*
RS1-SC1	1,68	98,32	0,01676*

* = $p < 0,01$. **PR1** = Fazenda Santa Maria; **PR2** = Parque Estadual "Mata dos Godoy"; **PR3** = Fazenda Monte Alegre; **SP1** = imediações da Base da Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (ESCAS); **RS1** = Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPNP- Pró-Mata); **SC1** = Estação Experimental de Urussanga.

ANEXO C

Machos diplóides encontrados e locos para os quais eles foram heterozigotos (permitindo a identificação como diplóides).

Machos diplóides	Locos em que eles foram heterozigotos
PR1(31)	Eln 12b
PR1(32)	Eln 12b; Eln 12J, Egc 18
PR2(2)	Eln 12b; Eln 12J
PR3(35)	Egc 18
PR3(42)	Eln 12b
PR3(47)	Egc 18
SP1(45)	Eln 2J; Eln 7J
RS1(17)	Eln 12b; Eln 12J; Egc 18; Eln 2J

PR1 = Fazenda Santa Maria; **PR2** = Parque Estadual “Mata dos Godoy”; **PR3** = Fazenda Monte Alegre; **SP1** = imediações da Base da Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade (ESCAS); **RS1** = Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPNP- Pró-Mata); **SC1** = Estação Experimental de Urussanga.