



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

KAREN MAYUMI SUZUKI

**ANÁLISE GENÉTICA DE
Euglossa fimbriata (HYMENOPTERA: APIDAE) DE
RESERVAS FLORESTAIS NO NORTE DO PARANÁ**

**LONDRINA
2007**



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

KAREN MAYUMI SUZUKI

**ANÁLISE GENÉTICA DE
Euglossa fimbriata (HYMENOPTERA: APIDAE) DE
RESERVAS FLORESTAIS NO NORTE DO PARANÁ**

LONDRINA
2007

KAREN MAYUMI SUZUKI

**ANÁLISE GENÉTICA DE
Euglossa fimbriata (HYMENOPTERA: APIDAE) DE
RESERVAS FLORESTAIS NO NORTE DO PARANÁ**

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

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

**LONDRINA
2007**

KAREN MAYUMI SUZUKI

**ANÁLISE GENÉTICA DE
Euglossa fimbriata (HYMENOPTERA: APIDAE) DE
RESERVAS FLORESTAIS NO NORTE DO PARANÁ**

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

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki
Depto. Biologia Celular e Genética - UEM

Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas
Depto. Biologia Geral – UEL

Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Sofia
Depto. Biologia Geral - UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2007.

A Deus
que é surpreendente...
e a toda a minha família e amigos dedico...

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular e ao Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina.

À minha orientadora, Silvia Helena Sofia, por todos esses anos de convívio, pelo carinho, por todos os ensinamentos, pela paciência, por ser um exemplo profissional e acima de tudo por toda formação pessoal (estas palavras ainda são pouco para agradecê-la).

À professora Leda, por todos os ensinamentos e conselhos.

À professora Fernanda, por todo o carinho, incentivo e amizade.

À professora Maria Cristina Arias, por todo o acolhimento no laboratório, pela atenção, por todas as orientações e dicas sobre PCR-RFLP.

Aos membros da banca examinadora, Dr^a. Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki e Dr. Paulo Maurício Ruas, pelas valiosas contribuições para este trabalho.

Aos professores Rogério e José Marcelo Torezan pelas orientações para a melhoria deste trabalho.

Aos técnicos do interlaboratório, Dário e Melyssa por toda a disponibilidade.

À secretária Sueli, do Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, pela atenção de sempre e por todos os auxílios prestados.

Aos queridos Douglas e Gabriele (Gabi) pela prontidão em todas as horas (inclusive nas férias), pelos “milhares” de coletas, pelo companheirismo, preocupação (“precisa de ajuda?” só ouvir essa frase já era uma ajuda pra mim...) e incentivo...

Ao amigo Juliano (Ju) por todos os ensinamentos sobre esse intrincado mistério que é o computador e seus programas, pelas altas conversas sobre genética de populações e sobre haplótipos, pelo companheirismo, pelas dicas sobre gel de poliacrilamida, por agüentar o meu gênio, pelo carinho e atenção em todas as horas, o meu muito obrigada.

Ao querido Bruno, pelo convívio durante todos esses anos, tanto profissionalmente quanto em “missão”, por ser um presente e instrumento de Deus na minha vida, por todo o ombro amigo em tantas horas, por toda preocupação, por todas as partilhas, caronas, piadas... pelos ensinamentos sobre “direção em dia de chuva” e “como não frear em cima de poças”... enfim, por ser tudo o que está implícito na palavra amigo. Palavras definitivamente não conseguem descrever todos os sentimentos... valeu por tudo meu amigo-amigo!!!!

Ao pessoal do Laboratório de Marcadores Moleculares em Peixes e Ecologia de Abelhas: Mirian (Miroca), Dalita, Olavo, Rafael, Carla (Carluxa), Leandro pela amizade, pelo cuidado, por toda a ajuda em diversas “tarefas laboratoriais”, pelas risadas, pelos almoços...

Aos amigos Yuldi e Francine (Fram), pelo carinho, preocupação (“não vai embora tarde da UEL”...), por todos os ensinamentos (valeu Fram, por todas as aulas sobre genética e estatística!!!!), muito obrigada pela amizade de vocês!!!!

Ao pessoal do LAGEA - USP: Alayne, Alisson e André pela atenção e dicas sobre PCR-RFLP.

À querida amiga da graduação e de sempre Lilian Keiko, por toda a torcida, oração e incentivo.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação Araucária e à Fundação O Boticário de Proteção à Natureza (FBPN) pelo apoio financeiro.

Aos meus pais Lulica e Shigueyuki, por todo o incentivo, amor, compreensão, formação pessoal, sem vocês eu não chegaria até aqui... e a minha avó Yasue que tanto me ensina a cada dia o valor da vida.

A todos os meus amigos que me apoiaram, intercederam, ouviram meus desabafos, riram muito também, por partilharem a riqueza de suas vidas comigo...

Ao povo do grupo Frutos da Paz, por todo o acolhimento, formação pessoal, oração, por ensinar que “o importante é prosseguir decididamente”...

A Deus, minha base, meu sustento, meu alento, meu amigo, meu tudo...

“O homem pode viver sem respostas, mas não sem perguntas. A sabedoria não se radica em ter todas as respostas, mas em saber formular as perguntas adequadamente.”

José H. Prado Flores

SUZUKI, K.M. **Análise genética de *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera: Apidae) de reservas florestais no norte do Paraná.** Dissertação de Mestrado. 69 p. Curso de Mestrado em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Londrina. 2007.

RESUMO

Diversos estudos conservacionistas têm utilizado marcadores moleculares na avaliação da diversidade e estrutura genética de populações de vários organismos. Entretanto, em relação às abelhas da subtribo Euglossina, importantes polinizadores neotropicais, ainda são poucos os estudos empregando tais marcadores para um maior conhecimento da diversidade genética de populações destas abelhas. O presente trabalho investigou a diversidade genética de *Euglossa fimbriata* de seis fragmentos florestais do norte do estado do Paraná, por meio de marcadores moleculares RAPD e marcadores PCR-RFLP, estes para a análise da região 16S do mtDNA, desta espécie euglossina. Foram utilizados 123 machos de *E. fimbriata* pertencentes a seis fragmentos florestais constituindo remanescentes de Mata Atlântica, no norte do Paraná, sul do Brasil. As estimativas de proporção de locos polimórficos das seis amostras de *E. fimbriata* estudadas variaram de 34,44% a 47,78%, enquanto que os valores de heterozigosidade média encontrados variaram de 0,0936 a 0,1527. Com base na análise da AMOVA envolvendo o conjunto de abelhas dos seis fragmentos florestais, detectou-se que a quantidade de variação genética foi maior dentro dos grupos (95,41%) do que entre os grupos de abelhas amostrados (4,59%) Foram utilizadas duas enzimas de restrição (*Asel* e *Dral*) para o corte da região 16S do mtDNA. Foram encontrados 4 haplótipos gerados pela enzima *Asel* e 2 haplótipos pela enzima *Dral*. Combinados estes haplótipos constituíram 5 haplótipos-compostos presentes de forma variada entre os grupos de abelhas dos diferentes fragmentos de mata estudados. Um dos haplótipos-compostos encontrados mostrou-se presente entre as amostras de abelhas de todos os fragmentos florestais estudados, ocorrendo em frequências entre 63,64 a 95,65%. A ampla distribuição e elevada frequência de tal haplótipo sugere sua origem ancestral em comparação aos demais haplótipos-compostos encontrados. Os resultados obtidos com ambos os tipos de marcadores moleculares (RAPD e PCR-RFLP) indicam a existência de subpopulações constituindo uma metapopulação de *E. fimbriata* na região estudada, bem como a importância de se preservar o conjunto de fragmentos florestais (independente do tamanho e grau de interferência antrópica destes) para a manutenção da diversidade genética desta espécie de Euglossina no norte do Paraná.

Palavras-chave: Euglossini, abelhas das orquídeas, RAPD, 16S mtDNA, PCR-RFLP.

SUZUKI, K.M. **Genetic analysis of *Euglossa fimbriata* bees (Hymenoptera: Apidae) from forest remnants in Northern Paraná.** Dissertação de Mestrado. 69 p. Curso de Mestrado em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Londrina. 2007.

ABSTRACT

Molecular markers are widely used in conservation studies to assess the genetic diversity and population structure of different organisms. However, studies using these markers to assess the genetic diversity of euglossine bees, which are important neotropical pollinators, are still scarce. Thus, the aim of the current study was to evaluate the genetic variation and genetic structure of *Euglossa fimbriata*, an euglossine bee species which shows a wide distribution throughout Brazilian forest remnants, by mean of RAPD and PCR-RFLP markers. A total of 123 males of *E. fimbriata* from six fragments of Atlantic Forest, located at Northern Paraná State, Southern Brazil, were used in the analysis. The proportion of polymorphic loci in each sample, assayed by RAPD markers, varied from 34.44% to 47.78%, while the estimates of average heterozygosity ranged from 0.0936 to 0.1527. AMOVA analysis revealed that genetic variation was higher within samples (95.41%) than among samples (4.59%). Two restriction enzymes (*Asel* e *Dral*) were used for the digestion of 16S mtDNA region. Respectively, 4 and 2 haplotypes were detected by endonucleases *Asel* and *Dral*. The association of both restriction enzymes resulted in 5 composite-haplotypes distributed irregularly among the groups of bees from different fragments. One composite-haplotype was found among bees from all forest remnants, occurring in frequencies that varied from 63.64 to 95.65%. These patterns of variation suggest an older origin of this haplotype when compared to others composite-haplotypes found. The results obtained with RAPD and PCR-RFLP markers suggest the occurrence of subpopulations of *E. fimbriata*, constituting a metapopulation structure of this euglossine species throughout the region studied and reinforce the need of better protecting these forest remnants (regardless of their reduced size and degree of anthropogenic interference) to maintain the genetic diversity of this euglossine species in Northern Paraná State.

Key-words: Euglossini, orchid bees, RAPD, 16S mtDNA, PCR-RFLP

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localização dos fragmentos florestais estudados 32
- Figura 2.** Perfil eletroforético de RAPD da espécie *E. fimbriata* com o uso do primer OPA7 39
- Figura 3.** Perfil eletroforético (gel de poliacrilamida 11%) dos fragmentos de restrição para a região 16S mtDNA amplificada via PCR e digerida por enzima AseI 43

LISTA DE TABELAS

Tabela I.	Caracterização dos seis fragmentos de mata estudados em termos de: tamanho (ha), localização, coordenadas geográficas, tipo de vegetação e denominação	33
Tabela II.	Distâncias geográficas (Km) entre os diferentes fragmentos florestais estudados	33
Tabela III.	Análise de Variância Molecular (AMOVA) e estimativa da variância da frequência gênica entre grupos (Φ_{ST}) de <i>E. fimbriata</i> para todos os fragmentos estudados	40
Tabela IV.	Análise de Variância Molecular (AMOVA) e estimativa da variância da frequência gênica entre grupos (Φ_{ST}) de <i>E. fimbriata</i> dos seis fragmentos de mata estudados analisados par a par	41
Tabela V.	Perfil dos haplótipos (A, B, C, D, E e F) dos fragmentos de restrição, produzidos após a digestão da região 16S mtDNA pelas enzimas <i>AseI</i> e <i>DraI</i> , para os grupos de abelhas dos seis fragmentos florestais estudados.....	44
Tabela VI.	Distribuição e frequência dos haplótipos compostos em cada área de estudo.....	45

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1. Floresta Atlântica	14
1.2. Abelhas Euglossina	16
1.3. RAPD	19
1.4. DNA Mitocondrial	20
1.5. PCR-RFLP	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
ARTIGO	25
Resumo	27
1. Introdução	28
2. Material e Métodos	31
2.1. Áreas de Estudo	31
2.2. Coleta das Abelhas e Extração de DNA	34
2.3 RAPD	35
2.4 PCR-RFLP	36
2.5 Análise Genética dos Dados de RAPD e PCR-RFLP	37
3. Resultados	38
3.1. RAPD	38
3.2. PCR-RFLP	42
4. Discussão	45
Referências	54
4 CONCLUSÕES	60
5 REFERÊNCIAS	61

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Floresta Atlântica

A importância da Floresta Atlântica reside no fato desta possuir um elevado número de espécies endêmicas (DI BITTETI; PLACCI; DIETZ, 2003). Considerada um dos ecossistemas com maior biodiversidade do planeta, encontra-se atualmente ameaçada diante da constante interferência antrópica que ocorre desde o século XVI devido ao processo de colonização (DI BITTETI; PLACCI; DIETZ, 2003). Entre as ameaças freqüentes às florestas tropicais pode-se citar invasão de espécies exóticas, fogo e outras formas de atividade antrópica (VINSON; FRANKIE; BARTHELL, 1993).

No estado do Paraná, sul do Brasil, a ocupação das áreas de florestas na formação de cidades e o desenvolvimento da agricultura constituem as causas da devastação na Floresta Atlântica nesta região do país. Após o século XIX, o processo de fragmentação se intensificou (TOREZAN, 2002) de modo que, atualmente, este ecossistema se caracteriza como uma paisagem altamente fragmentada, onde pequenas manchas de floresta sobrevivem em uma matriz de monoculturas, pastos, estradas e cidades (DI BITTETI; PLACCI; DIETZ, 2003). A região norte do estado, por exemplo, possui apenas entre 2 e 4% de sua cobertura vegetal original (SOARES; MEDRI, 2002; TOREZAN, 2002).

Os fragmentos florestais hoje existentes são compostos tanto por florestas primárias quanto secundárias, em diferentes estádios de sucessão (DI BITTETI; PLACCI; DIETZ, 2003).

A fragmentação de ecossistemas florestais pode causar diversos malefícios para as comunidades pertencentes a estes ecossistemas, afetando numerosos processos ecológicos, o que pode desencadear um efeito em cascata, comprometendo diversas outras espécies do ecossistema afetado (AIZEN; FEISINGER, 1994). Além disto, ocorre uma maior exposição das comunidades existentes nos fragmentos a efeitos de borda, efeitos de tamanho e isolamento (DI BITTETI; PLACCI; DIETZ, 2003).

No caso de biótopos que passam pelo efeito de isolamento, uma das maiores preocupações existentes é a de que uma vez perdidas suas espécies, áreas isoladas são difíceis de serem recolonizadas (DI BITTETI; PLACCI; DIETZ, 2003) além de impedir o fluxo gênico entre as populações existentes.

A Biologia da Conservação foi desenvolvida em resposta a crise que a biodiversidade passa atualmente, e inclui-se dentro desta, uma nova área de investigação científica aplicada, conhecida como Genética da Conservação que envolve a sistemática baseada em dados moleculares e a genética de populações (PEREZ-SWEENEY; RODRIGUES; MELNICK, 2004).

Em relação ao estudo de populações, uma das metas de conservação a longo prazo das espécies pertencentes aos diversos biótopos, é evitar a endogamia em espécies que não são naturalmente endogâmicas e permitir a estas manter o maior potencial evolutivo possível (manter sua alta variabilidade genética), independente de sua fragmentação atual (PEREZ-SWEENEY; RODRIGUES; MELNICK, 2004).

Segundo Perez-Sweeney; Rodrigues; Melnick (2004), outra meta importante para a conservação de populações a longo prazo consiste da análise genética das populações e da identificação de sua estrutura genética com os fatores

que a afetam, como tamanho efetivo da população, fluxo gênico e sistemas de acasalamento. Tais autores argumentam que o conhecimento dos níveis atuais de fluxo gênico da população é importante, pois auxilia na estimativa da intensidade com que a fragmentação impede a troca gênica entre as populações, se é que esta ainda ocorre.

1.2 Abelhas Euglossina

As abelhas, himenópteros pertencentes à superfamília Apoidea, são um dos grupos de insetos mais importantes do ponto de vista ecológico, por serem os principais polinizadores de diversas espécies vegetais, apresentando inúmeras relações especializadas com as plantas de um determinado hábitat (SCHLINDWEIN, 2000; REBÊLO, 2001). Pode-se destacar ainda, dentro deste grupo, a subtribo Euglossina (tribo Apini, subfamília Apinae, família Apidae), amplamente distribuída na região neotropical (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002), a qual cumpre um papel chave na manutenção de muitas espécies vegetais em florestas tropicais (FRANKIE et al., 1983; TONHASCA; BLACKMER; ALBUQUERQUE, 2003).

Esta subtribo possui cerca de 200 espécies, pertencentes a cinco gêneros: *Aglae*, *Exaerete*, *Eulaema*, *Eufriesea* e *Euglossa* (DRESSLER, 1982; MORATO, 1994). As euglossinas são abelhas de porte médio a robusto, tegumento freqüentemente metálico brilhante e que possuem normalmente glossa longa (MICHENER, 1974; KIMSEY, 1987). Muitas espécies euglossinas são solitárias, mas algumas apresentam o hábito de viver juntas em associações pequenas ou moderadas, exibindo comportamentos do tipo comunal, quase social e primitivamente eussocial (DRESSLER, 1982; REBÊLO, 2001; CAMERON, 2004).

São conhecidas como “abelhas das orquídeas”, devido à íntima associação dos machos destas abelhas como polinizadores de diversas espécies da família Orchidaceae (DODSON et al., 1969; ZUCCHI; CAMARGO; SAKAGAMI, 1969; DRESSLER, 1982; ACKERMAN, 1983a, 1983b; WILLIAMS; WHITTEN, 1983; CAMERON, 2004).

Em alguns casos, os machos euglossíneos são polinizadores exclusivos de algumas espécies de orquídeas (ACKERMAN, 1983b; WILLIAMS; WHITTEN, 1983), podendo coletar fragrâncias florais em outras espécies de outras famílias e em algumas fontes extra-florais (GARÓFALO et al., 1998; REBÊLO; GARÓFALO, 1991; TONHASCA; BLACKMER; ALBUQUERQUE, 2003).

A finalidade das coletas das fragrâncias não foi ainda completamente elucidada, existindo, porém três hipóteses: (1) os compostos nelas presentes seriam usados como precursores de feromônios sexuais (DRESSLER, 1982); (2) os machos poderiam metabolizar essas fragrâncias, de modo a utilizar o produto metabolizado para marcação de território; (3) ou ainda como uma atração para as fêmeas com a formação dos chamados *leks*, associações de vários machos da mesma espécie (CAMERON, 2004).

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

Diversos trabalhos têm utilizado iscas-odores para a coleta de machos de *Euglossina*, sendo uma grande parte destes trabalhos desenvolvida na Amazônia para o conhecimento da fauna e ecologia das espécies euglossinas encontradas naquela região (BRAGA, 1976; POWELL; POWELL, 1987; BECKER; MOURE; PERALTA, 1991; MORATO; CAMPOS; MOURE, 1992; OLIVEIRA; CAMPOS, 1995, 1997). Diversos estudos têm sido também desenvolvidos em diferentes regiões do Brasil, incluindo estudos especialmente nas regiões sudeste e nordeste (REBÊLO; GARÓFALO, 1991; GARÓFALO et al., 1998; PERUQUETTI et al., 1999; TONHASCA; BLACKMER; ALBUQUERQUE, 2003; MARTINS; SOUZA, 2005). Na região sul ainda são bastante escassas as pesquisas sobre tais abelhas, merecendo destaque o trabalho de Wittmann et al. (1989), que investigou a distribuição destes insetos em fragmentos de florestas no Rio Grande do Sul. Adicionalmente, três outros estudos sobre as comunidades de machos euglossíneos foram realizados, nos últimos anos, na região norte do estado do Paraná (SANTOS; SOFIA, 2002; SOFIA; SANTOS; SILVA, 2004; SOFIA; SUZUKI, 2004).

Embora, alguns trabalhos demonstrem que abelhas *Euglossina* conseguem transpor áreas desmatadas (RAW, 1989; MURREN, 2002; TONHASCA; ALBUQUERQUE; BLACKMER, 2003), não se sabe ao certo qual é a distância limite para esta transposição. Assim, a presença e o tamanho dos fragmentos de Floresta Atlântica existentes são de extrema importância para a conservação das populações presentes nestes locais, visto que os fragmentos poderiam funcionar como ilhas ou trampolins ecológicos (DI BITTETI; PLACCI; DIETZ, 2003) que manteriam o fluxo gênico das espécies. Trampolins ecológicos, pontos de ligação ou “stepping-stones” são pequenas áreas de habitat dispersas pela matriz, que podem, para algumas espécies, facilitar o fluxo gênico entre manchas (ilhas) (METZGER, 2004).

1.3 RAPD

O advento dos métodos de análise molecular permitiu o estudo das relações filogenéticas de mutações que diferem por pequenas variantes genéticas, de modo que atualmente é possível traçar relações evolutivas entre espécies bem como para o estudo de populações (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004). Dentre os diversos métodos moleculares deve-se destacar o papel da técnica de PCR (reação de polimerase em cadeia) concebida por Kary Mullis. Essa técnica envolve a síntese enzimática “in vitro” de milhões de cópias de um segmento específico de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Um dos marcadores utilizados em estudos populacionais é o RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), cuja técnica foi desenvolvida paralelamente por Welsh e McClelland (1990) e Williams et al. (1990). A técnica de RAPD se baseia na Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) com a utilização de *primers* de seqüência arbitrária para identificar polimorfismos genéticos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001; PEREZ-SWEENEY; RODRIGUES; MELNICK, 2004) importantes na determinação da estrutura e diversidade genética de uma população. De acordo com estes autores, a vantagem deste marcador é não necessitar de nenhum conhecimento prévio do genoma do organismo estudado. Além disto, a técnica necessita uma quantidade pequena de DNA para esta análise e permite gerar uma quantidade grande de polimorfismo de DNA através da amplificação de segmentos distribuídos por todo o genoma.

Em relação às áreas de Mata Atlântica, nos últimos anos, têm sido realizados estudos sobre a fauna destas abelhas (WITTMANN et al., 1989; NEVES; VIANA, 1999; PERUQUETTI et al., 1999, BEZERRA; MARTINS, 2001). Porém,

ainda são escassas as informações sobre o efeito da fragmentação de florestas sobre as populações de *Euglossina* (PERUQUETTI et al., 1999; TONHASCA; ALBUQUERQUE; BLACKMER, 2003; SOFIA; SUZUKI, 2004). Nos últimos anos, alguns estudos têm buscado informações sobre a variação e a estrutura genética de diferentes espécies euglossinas com base em marcadores RAPD (polimorfismos de DNA amplificados ao acaso). Paula (2003) realizou um estudo investigando a variabilidade e estrutura genética de populações de três espécies de *Euglossina* em fragmentos florestais mantidos como Reservas Governamentais no norte do Paraná. Sofia et al. (2005) analisaram a estrutura genética de populações de *Eufriesea violacea* (Blanchard) também em fragmentos de mata mantidos como reservas governamentais. Em 2004, Suzuki analisou a estrutura genética de populações de *Euglossa cordata* Linnaeus e *Euglossa truncata* Rebêlo & Moure em fragmentos mantidos em áreas urbanas. Todos estes estudos empregaram marcadores RAPD nas análises genéticas e obtiveram resultados muito similares para as várias espécies estudadas, indicando a ausência de estruturação genética entre populações de diferentes fragmentos e níveis de variabilidade genética, com base na estimativa de locos polimórficos, entre 40 e 50%. Os resultados obtidos em tais estudos sugerem que o pequeno tempo de fragmentação das florestas no norte paranaense possa ser um dos fatores determinantes para tais achados.

1.4 DNA Mitocondrial

O DNA mitocondrial (mtDNA) animal é uma molécula de fita dupla circular, sendo muito atrativa para estudos populacionais e evolutivos por apresentar herança uniparental, herdada via materna, de modo que não segue os padrões mendelianos de segregação e não sofre recombinação; com isso, um genótipo ou

haplótipo mitocondrial pode servir para traçar uma genealogia materna ou mesmo filogenia materna (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001). Deve-se acrescentar ainda a característica de possuir alta taxa evolutiva em comparação ao DNA nuclear, visto que a duplicação do DNA nuclear possui sistema de reparo, diferente da duplicação do mtDNA (CALCAGNOTTO, 2001; ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001).

O conhecimento de diversas seqüências de mtDNA de vários filos encorajou o desenvolvimento de *primers* universais determinados por este genoma. Estes *primers* permitiriam o acesso ao genoma de mtDNA de espécies desconhecidas para biologia molecular, bem como o seqüenciamento e a comparação de genes homólogos de espécies próximas relacionadas e de populações de uma determinada espécie (PALUMBI, 1996). Como por exemplo, pode-se citar o seqüenciamento do mtDNA da espécie de abelha *Apis mellifera* (CROZIER; CROZIER; MACKINLAY, 1989; CROZIER; CROZIER, 1993).

Dick et al. (2004) realizaram um estudo comparativo sobre a filogeografia de 14 espécies euglossinas, existentes no Panamá, Costa Rica, México, Equador, Guiana Francesa e Bolívia, por meio da técnica de PCR, utilizando *primers* seqüenciados para *Apis mellifera* que marcam a região CO1 do mtDNA. As relações filogenéticas interespecíficas foram identificadas após o seqüenciamento das regiões CO1 amplificadas.

1.5 PCR-RFLP

Com a descoberta das enzimas de restrição no ano de 1968, e o conseqüente desenvolvimento da técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length*

Polymorphism), surgiu um novo tipo de marcador amplamente utilizado em diversos tipos de estudos, inclusive populacionais (FRANCISCO, 2002, LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004).

Por RFLP entende-se o polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA. Tal polimorfismo é evidenciado pela fragmentação do DNA por meio de enzimas de restrição e observado por hibridização destes fragmentos com seqüências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Dentre as aplicabilidades do RFLP incluem-se: estimativa da diversidade genética e estruturação de populações, ocorrência de fluxo gênico, investigação de hibridização, introgressão, autoploidia e alopoliploidia (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004). Como vantagens do RFLP em relação aos marcadores morfológicos, citológicos ou de isoenzimas, pode-se citar: (1) podem ser obtidos em número elevado; (2) têm distribuição aleatória no genoma; (3) não são afetados pelo ambiente (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001).

O trabalho de Saiki et al. (1985) foi um dos primeiros a utilizar a técnica de PCR associada ao uso de enzimas de restrição (RFLP) para detecção de polimorfismos. No caso, a junção das duas técnicas foi empregada para diagnóstico de anemia falciforme. A detecção de polimorfismos por meio da técnica de PCR-RFLP também tem sido utilizada para a avaliação de diversidade e estruturação genética de populações (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004). Em especial, vários trabalhos relatam que a PCR-RFLP do mtDNA têm fornecido informações relevantes em estudos de estrutura populacional de espécies, como por exemplo, nas análises

de populações de abelhas (ARIAS; FRANCISCO; SILVESTRE, 2003; BOUGA et al., 2005; COLLET; ARIAS; DEL LAMA, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obter informações sobre a diversidade genética da espécie *E. fimbriata* de fragmentos florestais do norte do Paraná, sul do Brasil, empregando marcadores moleculares RAPD, para a análise do genoma total, e técnica de PCR-RFLP para a análise da região 16S do mtDNA desta espécie euglossina.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Implantação da técnica de PCR-RFLP no laboratório de Marcadores Moleculares em Peixes e Ecologia de Abelhas da Universidade Estadual de Londrina.
- 2) Com base em marcadores moleculares RAPD e na técnica de PCR-RFLP, obter informações e analisar comparativamente a estrutura genética de grupos de *E. fimbriata* presentes em remanescentes florestais de Mata Atlântica.
- 3) Identificar, por meio da técnica de PCR-RFLP da região 16S do mtDNA de *E. fimbriata*, os possíveis haplótipos existentes nos grupos da espécie estudada, bem como a frequência em que eles ocorrem nestes grupos.
- 4) Avaliar a possível ocorrência de uma relação entre o tamanho dos fragmentos estudados e os níveis de variação genética para os grupos analisados de machos de *E. fimbriata*.

Artigo

Diversidade genética de *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera: Apidae: Euglossina) de fragmentos florestais no Brasil

Trabalho a ser submetido à revista **Apidologie**

**Diversidade genética de *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera: Apidae:
Euglossina) de fragmentos florestais no Brasil**

Karen Mayumi Suzuki^a, Douglas Caldeira Giangarelli^a, Gabriele Antico Freiria^a, Maria
Cristina Arias^b e Silvia Helena Sofia^{a,*}

^a Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade
Estadual de Londrina, 86051-990, Londrina, PR, Brasil

^b Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências,
Universidade de São Paulo, 05508-900, São Paulo, SP, Brasil

* Autor para correspondência: Silvia Helena Sofia, shsofia@uel.br, phone: +55-43-
33714437; fax: +55-43-33714207

Título resumido: Diversidade genética de *Euglossa fimbriata*

Resumo – A diversidade genética de machos euglossíneos de *Euglossa fimbriata* de seis fragmentos florestais do sul do Brasil foi estimada com base em marcadores RAPD e fragmentos de restrição (PCR-RFLP), estes últimos obtidos após a amplificação e digestão da região 16S do mtDNA das abelhas. O maior valor de variação genética, revelado pelos dois tipos de marcadores moleculares, foi detectado para as abelhas de uma reserva florestal particular de 200 ha. No geral, os resultados obtidos com ambos os tipos de marcadores revelaram que as amostras de *E. fimbriata* das seis localidades são geneticamente comparáveis. As análises de RAPD mostraram uma maior quantidade de diversidade genética ocorreu dentro das amostras analisadas. Um haplótipo composto, dos 5 identificados com as enzimas *Asel* e *Dral*, mostrou-se extremamente freqüente e amplamente distribuído entre as abelhas das seis localidades, reforçando a hipótese da ocorrência de uma única população de *E. fimbriata* na região estudada.

Palavras-chave: Euglossini/ abelhas das orquídeas/ RAPD/ 16S mtDNA/ PCR-RFLP

1. INTRODUÇÃO

Nos neotrópicos, as abelhas euglossinas, conhecidas popularmente como abelhas das orquídeas, formam um grupo distinto dentro da família Apidae, apresentando freqüentemente um corpo robusto, tegumento metálico, glossa bastante longa e, no caso dos machos as tíbias das pernas posteriores modificadas para a coleta e possível metabolização de substâncias aromáticas (Dressler, 1982; Roubik e Hanson, 2004). Encontradas exclusivamente no continente americano, primariamente nas florestas tropicais (Dressler, 1982; Cameron, 2004; Roubik e Hanson, 2004), as euglossinas são consideradas muito interessantes para estudos envolvendo a fauna tropical. Tal fato deve-se especialmente às suas relações particulares com plantas de diversas famílias, suas cores chamativas, bem como o comportamento particular dos machos e suas modificações estruturais (Rebêlo, 2001). Machos euglossíneos são os polinizadores primários de certos grupos de orquídeas Neotropicais (Dressler, 1982; Ackerman, 1983; Roubik e Hanson, 2004). Consideradas abelhas dotadas de uma grande capacidade de vôo, as euglossinas destacam-se também pelo seu papel na polinização de espécies vegetais com distribuição esparsa (Janzen, 1971).

De acordo com Michel-Salzat et al. (2004), o status ecológico de importantes polinizadores de diversas plantas tropicais faz destas abelhas um alvo particularmente valioso para estudos de conservação. Sem dúvida, um dos aspectos mais importantes da conservação relaciona-se à preservação da variação genética das populações naturais sob impacto antropogênico (Solé-Cava, 2001; Perez-Sweeney et al., 2004). Em decorrência deste fato, nas últimas duas décadas um grande número de estudos voltado para a conservação da biodiversidade tem utilizado uma variedade de tipos de marcadores moleculares para investigar a

diversidade molecular de populações de diferentes organismos (Machordom et al., 2000; Hale et al., 2001; Miedaner et al., 2001; Tomimatsu e Ohara, 2004). Em estudos com abelhas, a maioria dos marcadores e técnicas moleculares disponíveis já foi empregada em análises da diversidade genética de populações destes insetos, especialmente os marcadores baseados no DNA, como microssatélites e RAPD (Estoup et al. 1995, 1996; Franck et al. 1998; Sofia et al., 2005; Francisco et al. 2006). Dentre as técnicas usadas na análise genética de populações de abelhas, destaca-se a técnica de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), a qual tem sido bastante aplicada na investigação do genoma mitocondrial de diferentes espécies de Apoidea, como por exemplo espécies da subtribo Meliponini (Francisco et al., 2001; Weinlich et al., 2004; Moretto e Arias, 2005), mas especialmente em estudos envolvendo *Apis mellifera* (Hall e Smith, 1991; Diniz et al., 2003; Bouga et al., 2005; Collet et al., 2007). Segundo Arias e Infante-Malachias (2001) o DNA mitocondrial (mtDNA) animal é uma molécula muito atrativa para estudos populacionais e evolutivos, por apresentar herança uniparental, herdada via materna, de modo que não segue os padrões mendelianos de segregação e não sofre recombinação; com isso, um genótipo ou haplótipo mitocondrial pode servir para traçar uma genealogia materna ou mesmo filogenia materna. Assim, estudar a diferenciação do mtDNA é equivalente a estudar a população de fêmeas (Crozier, 1990). Deve-se acrescentar ainda a característica de possuir alta taxa evolutiva em comparação ao DNA nuclear (Crozier, 1990; Arias e Infante-Malachias, 2001). Portanto, em uma população finita, a deriva genética atuará de forma mais intensa na evolução do mtDNA em comparação com o genoma nuclear (Hillis et al., 1996).

Por outro lado, a utilização de marcadores moleculares aplicados ao DNA genômico total de um organismo têm também se mostrado bastante útil em estudos

de populações. Assim, estudos de genética de populações investigando os genomas mitocondrial e total tornam-se interessantes, tendo em vista que os dois tipos de marcadores fornecem diferentes tipos de informação, não somente pelas suas habilidades em detectar diferenciação, mas também pelas suas habilidades em detectar diferenças na perspectivas evolucionária e ecológica (Crozier, 1990).

Apesar da importância das abelhas euglossinas como importantes componentes da fauna Neotropical, até o presente, são poucas as informações disponíveis na literatura sobre a diversidade genética das populações destas abelhas presentes em remanescentes de florestas neotropicais (Sofia et al., 2005; Waldschmidt et al. 2005).

Dentro do grupo Euglossina, o gênero *Euglossa* é sem dúvida o mais diversificado, com mais de 100 espécies descritas (Dressler, 1982; Cameron, 2004). *Euglossa fimbriata* Rebêlo e Moure é uma espécie com ampla distribuição no território brasileiro, ocorrendo nas matas úmidas amazônicas e nas vastas áreas do nordeste e centro-sul brasileiros (Rebêlo et al., 2003). Com ocorrências relatadas para diferentes ecossistemas, tais como caatinga, restinga e cerrado (Neves e Viana, 2003), *E. fimbriata* é também um componente freqüente da fauna euglossina nos remanescentes de Mata Atlântica, do nordeste até o sul do Brasil (Rebêlo e Garófalo, 1991; Peruquetti et al., 1999; Silveira et al., 2002; Tonhasca et al., 2002; Sofia et al., 2004; Souza et al., 2005).

Estudos recentes em diferentes remanescentes de Mata Atlântica revelam uma abundância bastante variável para as populações de *E. fimbriata*, mostrando-se com uma das espécies dominantes em número de indivíduos em algumas áreas de estudo (Neves e Viana, 2003) e pouco freqüente em outras (Tonhasca et al., 2002; Nemésio, 2003; Martins e Souza, 2005). Além disto, foi relatado que a abundância

de *E. fimbriata* varia também em relação ao tamanho do fragmento estudado (Sofia e Suzuki, 2004).

Com o objetivo de obter informações sobre a diversidade genética de *E. fimbriata* presente em áreas mantidas na forma de fragmentos florestais no norte do Paraná, o presente trabalho empregou marcadores moleculares RAPD, para a análise do genoma total, e PCR-RFLP para a análise da região 16S do mtDNA desta espécie euglossina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Áreas de Estudo

As abelhas foram coletadas em seis fragmentos florestais situados no norte do estado do Paraná, sul do Brasil (Fig. 1). Quatro dos fragmentos estudados constituem reservas de mata de tamanhos diferentes, mantidas em propriedades particulares, sendo: duas de tamanho grande (> 100 ha), uma de tamanho médio (70 ha) e uma de tamanho pequeno (20 ha), (Tab. I). Os outros dois fragmentos florestais constituem duas reservas governamentais: Parque Estadual “Mata dos Godoy” (G) e Parque Municipal “Arthur Thomas” (AT). O primeiro destes inclui uma área de cerca de 580 ha de vegetação nativa preservada (mata primária), que está conectada a uma área de vegetação de aproximadamente 2200 ha localizada fora dos limites do parque, formando um fragmento total de mata de mais ou menos 2800 ha (Sofia et al., 2005). O Parque Arthur Thomas apresenta uma área de mata secundária com cerca de 66 ha. Os fragmentos constituem reservas de vegetação remanescente de Floresta Estacional Semidecidual, tipo de vegetação nativa presente na região norte do estado do Paraná até o início do século XIX (Torezan

2002), apresentando diferentes tipos de vegetação (Tab. I). Uma característica comum aos fragmentos selecionados é que todos apresentam sinais de perturbação antropogênica e se encontram circundados por áreas cultivadas ou pastagens. As distâncias geográficas entre os fragmentos podem ser observadas na Tab. II.

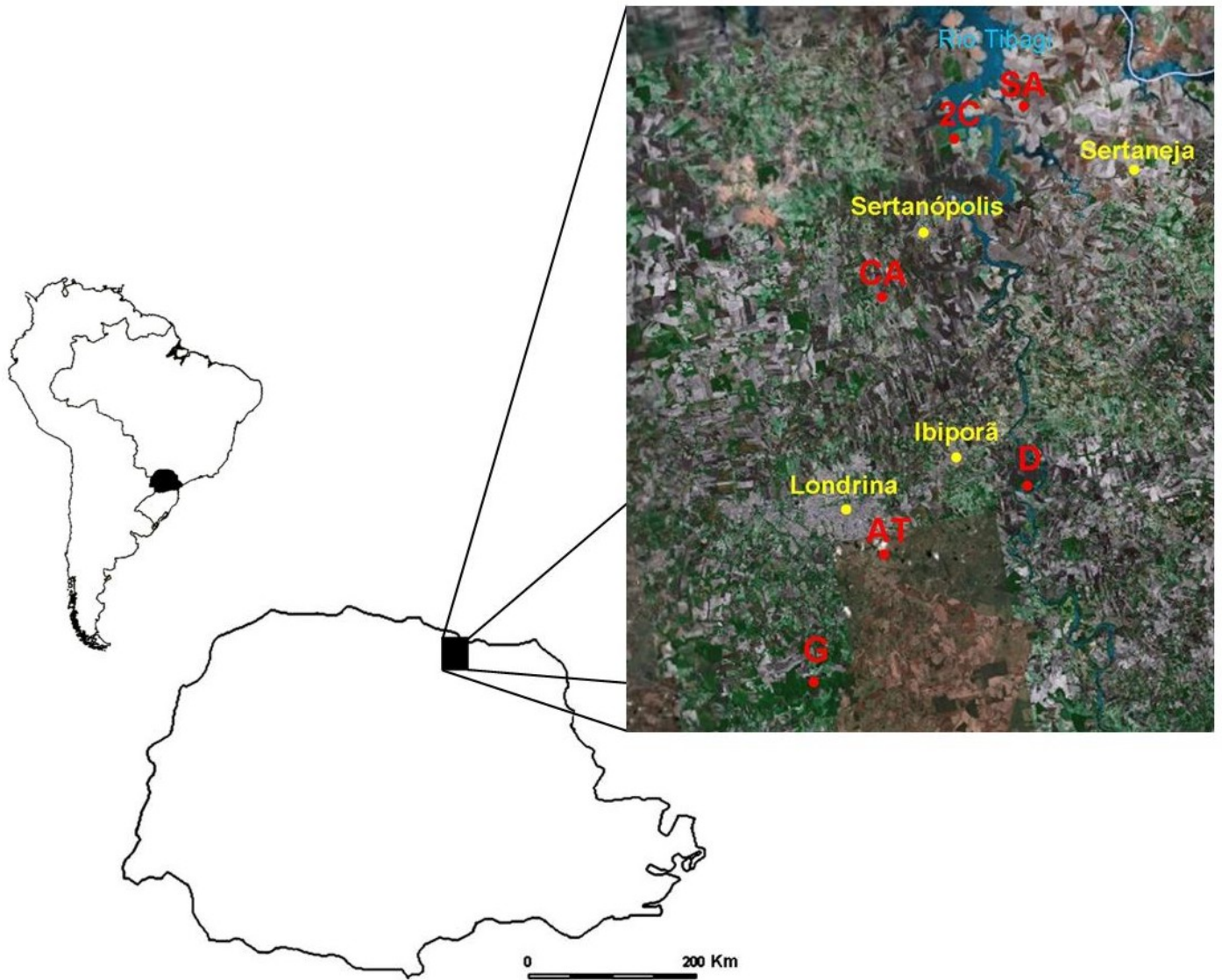


Figura 1. Localização dos fragmentos florestais estudados. 2C: Fazenda Cachoeira 2C; SA: Fazenda Santo Antônio; CA: Fazenda Califórnia; D: Fazenda Doralice; AT: Parque Municipal Arthur Thomas; G: Parque Estadual Mata dos Godoy; em amarelo: área urbana dos municípios da região estudada.

Tabela I. Caracterização dos seis fragmentos de mata estudados em termos de: tamanho (ha), localização, coordenadas geográficas, tipo de vegetação e denominação.

Áreas de estudo (Abreviação)	Superfície (ha)	Município (coordenadas geográficas)	Reserva	Tipo de vegetação	Tipo de fragmento
Parque Estadual Mata dos Godoy (G)	580 (+ 2200)	Londrina (23°27' S; 51°15' W)	Estadual (Governamental)	Primária	Grande
Fazenda Cachoeira 2C (2C)	117	Sertanópolis (23°03' S; 51°02' W)	Particular	Secundária	Grande
Fazenda Doralice (D)	200	Ibiporã (23°16' S; 51°03' W)	Particular	Primária	Grande
Fazenda Santo Antônio (SA)	70	Sertaneja (23°02' S; 50°50' W)	Particular	Secundária	Médio
Fazenda Califórnia (CA)	20	Sertanópolis (23°03' S; 51°02' W)	Particular	Secundária	Pequeno
Parque Municipal Arthur Thomas (AT)	66	Londrina (23°15' S; 51°15' W)	Municipal (Governamental)	Secundária	Médio

Tabela II. Distâncias geográficas (km) entre os diferentes fragmentos florestais estudados.

	G	2C	D	SA	AT	CA
2C	56	*****				
D	30	34	*****			
SA	62	7	36	*****		
AT	15	43	17	47	*****	
CA	40	15	24	23	26	*****

G: Parque Estadual Mata dos Godoy; 2C: Fazenda Cachoeira 2C; D: Fazenda Doralice; SA: Fazenda Santo Antônio; AT: Parque Municipal Arthur Thomas; CA: Fazenda Califórnia.

2.2. Coleta das Abelhas e Extração de DNA

A metodologia de coleta das abelhas foi baseada em Sofia e Suzuki (2004). Durante as coletas, machos euglossíneos atraídos à isca-odores foram capturados com uma rede entomológica.

No laboratório, o material coletado foi identificado sob estereomicroscópio (Zeiss), com base em uma coleção de referência. Após identificação, as abelhas foram mantidas a -20°C até a extração do DNA total. Alguns indivíduos da espécie estudada foram montados em alfinetes entomológicos, para servirem como material testemunho, e encontram-se depositados no Museu de Zoologia da Universidade de Londrina (MZUEL).

As análises moleculares envolveram um total de 123 machos de *E. fimbriata*. Com exceção do Parque Arthur Thomas (AT) e da Fazenda Califórnia (CA), que tiveram um número menor de machos de *E. fimbriata* analisados, respectivamente, 18 e 13, nos demais fragmentos florestais foram analisados 23 machos desta espécie. Para a extração de DNA foi retirado o abdômen das abelhas. O DNA total das amostras foi extraído através de três lavagens sucessivas em: fenol; fenol/clorofórmio/álcool isoamílico; e, clorofórmio/álcool isoamílico conforme metodologia descrita por Sofia et al. (2005). O DNA obtido da extração foi ressuscitado em 50 μL de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e estocado a -20°C . Antes das extrações as abelhas foram lavadas com álcool 70% para a remoção de possíveis contaminantes exógenos como pólen ou fungos.

2.3 RAPD

A amplificação do DNA total das abelhas foi baseada em Williams et al. (1990), com algumas modificações. As reações de RAPD foram produzidas em um volume final de 15 μL , contendo 10 ng de DNA, 300 μM de dNTP (Pharmacia), 0,3 μM de *primer* (Operon Technologies, Alameda, CA, USA), 3 mM de MgCl_2 e 1,5 U da enzima DNA polimerase, tampão de reação (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 500mM KCl) e água ultrapura. Para cada conjunto de amplificação foram montadas reações controle, contendo todos os reagentes das reações de RAPD e água em substituição ao DNA. No controle das reações, em substituição ao DNA, se adicionou o mesmo volume de água ultrapura.

Para as reações de amplificações foram testados 40 *primers* diferentes dos kits OPA, OPC, OPW, OPAC e OPAM. Foram selecionados os *primers* que produziram bandas mais nítidas e em maior número. Na seleção de *primers* foi utilizado um *mix* de DNA de vários indivíduos diferentes.

As amplificações do DNA foram feitas em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.), de acordo com o seguinte protocolo: uma desnaturação inicial a 92°C de 4 minutos, seguida de 40 ciclos de 40 segundos a 92°C, um minuto e trinta segundos a 40°C e dois minutos a 72°C; terminado os 40 ciclos, uma extensão final de cinco minutos a 72°C.

Após a amplificação as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,4%, a 3 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$, usando-se o 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) a partir do estoque. Após corrida eletroforética os géis foram corados em brometo de etídio (20 μL de

brometo de etídio.100mL⁻¹ de TBE) e fotografados em transiluminador sob luz UV, usando-se o sistema da fotodocumentação digital Kodak EDAS 290.

2.4 PCR - RFLP

Para as reações de amplificação da região 16S do mtDNA foram utilizados os seguintes *primers*: 16SWb (3'-CACCTGTTTATCAAAAACAT-5') (Dowton e Austin, 1994) e 874-16S (3'-TATAGATAGAAACCAATCTG-5') (Cameron et al., 1992). As reações de PCR foram produzidas em um volume total de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão de reação 10x, 200 µM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 0,8 µM de cada *primer*, 2 µL de DNA, 1,5 U de Taq polimerase (VJR) e água ultrapura. As amplificações foram feitas em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.), de acordo com o seguinte protocolo: uma desnaturação inicial a 94°C de 4 minutos, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 42°C e 45 segundos a 64°C; terminando com uma extensão final de 4 minutos a 72°C.

Após a amplificação, um volume de 1 µL do produto da PCR foi submetido à digestão simples, durante 14 horas, com 10 unidades da enzima (10 U.µL⁻¹), utilizadas conforme as recomendações do fabricante. Para determinar a presença de possíveis sítios de restrição na região amplificada os produtos da PCR foram digeridos por no mínimo 12 horas com as seguintes endonucleases: enzimas de corte freqüente: *MspI*, *HaeIII*, e enzimas de corte raro: *NdeI*, *SspI*, *Asel*, *XhoI*, *BclI*, *XbaI*, *Eco321*, *BamHI*, *HindIII*, *DraI*, *SpeI*, *PstI*, *EcoRI*; contudo apenas as enzimas *Asel* (Biolabs) e *DraI* (Fermentas) mostraram alguma atividade de restrição para a região 16S, produzindo bandas de qualidade satisfatória para as análises posteriores. Os fragmentos produzidos após a ação das enzimas de restrição foram

separados eletroforeticamente em gel de poliacrilamida 11%, a $8,3 \text{ V.cm}^{-1}$ por 5 horas, e posteriormente, corados com nitrato de prata (AgNO_3^-) e fotografados com câmera digital (Nikon). Marcadores de pesos moleculares de 25 e 50 pb (Invitrogen) foram também aplicados no mesmo gel que as amostras, para a estimativa dos tamanhos dos fragmentos de restrição. A estimativa do peso molecular dos fragmentos obtidos foi feita por meio do programa computacional *Fragment Length Calculator* - FRAGLEN1 v.3.5 - (Ray, 2000).

2.5 Análise Genética dos Dados de RAPD e PCR-RFLP

A análise genética das populações, baseada nos marcadores RAPDs, foi determinada por comparação dos perfis eletroforéticos obtidos, com cada um dos *primers* utilizados, para os machos de abelhas das diferentes áreas estudadas. O padrão de bandas foi analisado, levando-se em consideração a presença e ausência de bandas, de modo que os dados foram introduzidos em programas computacionais na forma de variáveis binárias, o número 1 indicando a presença da banda e o número 0 a ausência.

O programa computacional TFPGA 1.3 (Miller, 1997) permitiu o cálculo dos seguintes parâmetros genéticos: variabilidade genética estimada a partir da proporção de locos polimórficos (\bar{P}), usando-se o critério de 95% e \bar{H} (heterozigosidade média não-enviesada). A correção de Lynch e Milligan (1994), normalmente empregada no caso de marcadores dominantes, não foi utilizada nas análises genéticas por se tratarem os machos euglossíneos de indivíduos haplóides. O estudo da estrutura populacional empregando-se a análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) foi realizado com o auxílio do programa ARLEQUIN 3.01. Essa análise serviu para gerar estimativas da variância genética em diferentes

níveis hierárquicos (ou seja, de como a diversidade genética encontra-se distribuída dentro das populações e entre as populações) e índice Φ_{ST} entre pares de populações, o qual pode ser usado como uma estimativa da distância genética entre elas (Excoffier et al., 2006).

Os padrões distintos de digestão simples pelas endonucleases (padrões de restrição) foram identificados por letras específicas (A, B, C, D etc) de acordo com a ordem de aparecimento destes padrões. Cada abelha foi identificada por um código de várias letras, indicando cada genótipo composto do mtDNA (haplótipo). Com base no padrão de haplótipos obtidos as freqüências destes foram estimadas as amostras das seis áreas estudadas.

3. RESULTADOS

3.1 RAPD

Para as análises moleculares, foram selecionados onze *primers*: OPA7, OPA11, OPA16, OPA19, OPAM11, OPAM18, OPC2, OPC5, OPW1, OPW11 e OPW13. O número de bandas selecionadas para as análises variou entre 6 a 12 para os diferentes *primers*.

De um modo geral, os perfis eletroforéticos de RAPD não mostraram grande variação entre as amostras dos fragmentos florestais. Na Fig. 2 é mostrado um perfil de RAPD obtido com o *primer* OPA7 para as amostras de machos de *E. fimbriata* dos fragmentos Godoy (G) e Doralice (D).

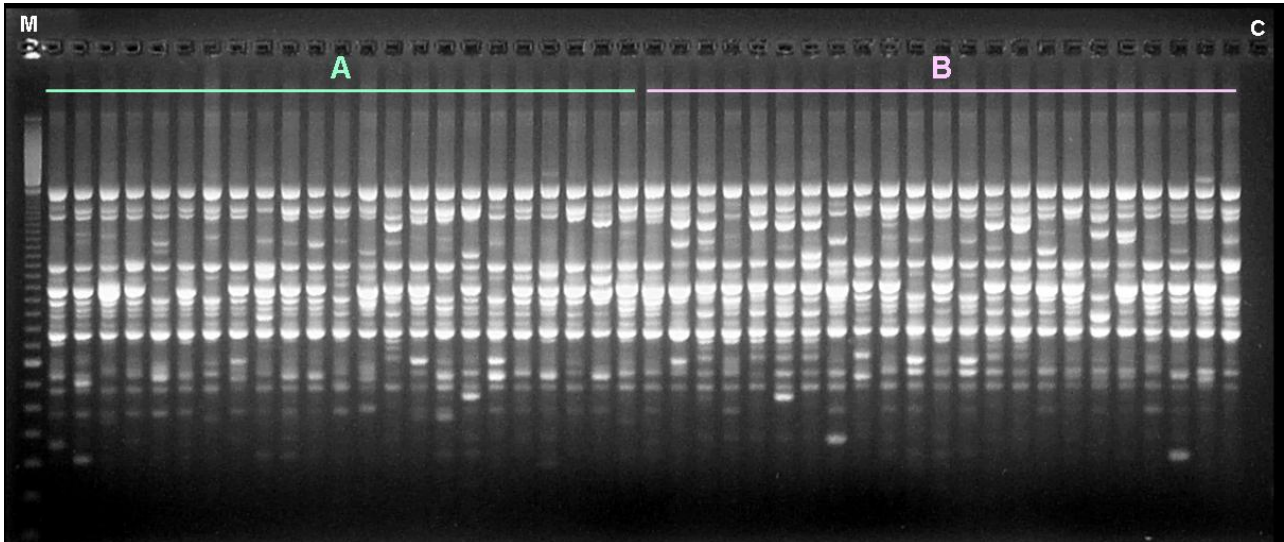


Figura 2. Perfil eletroforético de RAPD da espécie *E. fimbriata* com o uso do *primer* OPA7. (M): Marcador de peso molecular de 100pb. (A): machos coletados no Godoy. (B): machos coletados na Fazenda Doralice. (C): controle (Branco).

A estimativa de heterozigosidade média (\bar{H}) resultou nos seguintes valores para as amostras analisadas: 0,0936 (G), 0,1048 (2C), 0,1527 (D), 0,1141 (SA), 0,0977 (AT) e 0,1249 (CA), com o menor valor detectado para a amostra do fragmento G e o maior valor observado para o grupo coletado no fragmento D.

Os valores estimados de proporção de locos polimórficos (\bar{P}) foram: 42,22% (2C), 42,22%(G), 47,78% (D), 38,89% (SA), 34,44% (AT) e 37,78% (CA). Como para o valor de heterozigosidade, o maior valor de proporção de locos polimórficos foi encontrado para a amostra de D, já o menor valor foi encontrado para a amostra de AT. Foi observada uma tendência das amostras de fragmentos de tamanho maior possuírem uma variação genética maior quando comparadas àquelas de áreas menores. Porém, destaca-se que as amostras dos fragmentos menores AT e CA continham um menor número de indivíduos.

Com base na análise da AMOVA para os grupos de abelhas dos seis fragmentos florestais estudados, detectou-se que a maior quantidade de variação

genética deu-se dentro dos grupos (95,41%), enquanto que o valor entre grupos foi de 4,59% (Tab. III). Igualmente, quando os grupos foram analisados par a par, a maior quantidade de variação genética deu-se dentro dos grupos, a qual variou de 90,25% (G-CA) a 99,79% (2C-AT), enquanto a amplitude de variação genética entre grupos foi de 0,21% (2C-AT) a 9,75% (G-CA) (Tab. IV). O valor da estimativa da variância molecular (Φ_{ST}) para todos os grupos analisados foi de 0,04588 (Tab. III), já os valores de Φ_{ST} para todos os grupos analisados par a par os valores significativos variaram de 0,03051 a 0,09752 (Tab. IV).

Tabela III. Análise de Variância Molecular (AMOVA) e estimativa da variância da frequência gênica entre grupos (Φ_{ST}) de *E. fimbriata* para todos os fragmentos estudados.

Fonte de variação	Soma de Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem da Variação	Φ_{st}
Entre populações	53,208	0,25858	4,59	0,04588*
Dentro de populações	529,149	5,37735	95,41	
Total	582,358	5,53594		

* 5% de significância

Tabela IV. Análise de Variância Molecular (AMOVA) e estimativa da variância da frequência gênica entre grupos (Φ_{ST}) de *E. fimbriata* dos seis fragmentos de mata estudados analisados par a par.

Comparativo	Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem da Variação	Φ_{ST}
2C – G	Entre populações	8,043	0,14685 Va	3,05	0,03051*
	Dentro de populações	205,304	4,66601 Vb	96,95	
2C – D	Entre populações	13,587	0,32746 Va	5,13	0,05130*
	Dentro de populações	266,435	6,05534 Vb	94,87	
2C – SA	Entre populações	8,957	0,16721 Va	3,17	0,03168*
	Dentro de populações	224,870	5,11067 Vb	96,83	
2C – AT	Entre populações	4,939	0,00998 Va	0,21	0,00210 ^{ns}
	Dentro de populações	184,768	4,73764 Vb	99,79	
2C – CA	Entre populações	10,294	0,29831 Va	5,29	0,05292*
	Dentro de populações	181,512	5,33858 Vb	94,71	
G – D	Entre populações	13,935	0,35401 Va	5,76	0,05760*
	Dentro de populações	254,870	5,79249 Vb	94,24	
G – SA	Entre populações	12,978	0,35350 Va	6,80	0,06796**
	Dentro de populações	213,304	4,84783 Vb	93,20	
G – AT	Entre populações	8,992	0,22536 Va	4,83	0,04829**
	Dentro de populações	173,203	4,44110 Vb	95,17	
G – CA	Entre populações	13,970	0,54011 Va	9,75	0,09752**
	Dentro de populações	169,946	4,99843 Vb	90,25	
D – SA	Entre populações	15,587	0,40651 Va	6,12	0,06119*
	Dentro de populações	274,435	6,23715 Vb	93,88	
D – AT	Entre populações	12,106	0,30191 Va	4,78	0,04784*
	Dentro de populações	234,333	6,00855 Vb	95,22	
D – CA	Entre populações	14,756	0,47920 Va	6,59	0,06586*
	Dentro de populações	231,077	6,79638 Vb	93,41	
SA – AT	Entre populações	5,367	0,05677 Va	1,33	0,01251 ^{ns}
	Dentro de populações	164,585	4,22012 Vb	98,67	
SA – CA	Entre populações	6,655	0,06508 Va	1,15	0,01154 ^{ns}
	Dentro de populações	189,512	5,57387 Vb	98,85	
AT – CA	Entre populações	6,682	0,14943 Va	3,27	0,02292 ^{ns}
	Dentro de populações	128,350	4,42588 Vb	96,73	

* 5% de significância; ** 1% de significância; ^{ns} não significativo

G: Parque Estadual Mata dos Godoy; 2C: Fazenda Cachoeira 2C; D: Fazenda Doralice; SA: Fazenda Santo Antônio; AT: Parque Municipal Arthur Thomas; CA: Fazenda Califórnia.

3.2 PCR-RFLP

O tamanho estimado para o fragmento amplificado da região 16S do mtDNA variou aproximadamente de 580 a 700pb. Cada uma das duas endonucleases usadas nas análises, *Asel* e *Dral*, tiveram pelo menos um sítio de restrição para a região 16S de *E. fimbriata*. A partir do perfil eletroforético dos fragmentos gerados pelas reações de restrição (Fig. 3) foi realizada a estimativa dos pesos dos fragmentos (Tab. V); o maior fragmento gerado pelo corte com a enzima *Asel* foi de 177pb e o menor 63pb, para a enzima *Dral* foram encontrados fragmentos entre 68 e 150pb.

Foram identificados a presença de 4 haplótipos distintos para a enzima *Asel* (Fig. 3) e 2 haplótipos produzidos pela enzima *Dral* (Tab. V), que combinados resultaram em cinco genótipos compostos (haplótipos) diferentes entre os indivíduos de *E. fimbriata* amostrados (Tab. VI). Destes haplótipos compostos, o haplótipo AE foi comum a todos os grupos de abelhas estudados, presente em uma frequência de 63,64% a 95,65%. O segundo haplótipo mais freqüente (AF) foi encontrado entre os indivíduos dos fragmentos G, 2C, D e CA, mostrando frequências de 4,35% a 31,82%. Os haplótipos BE e DE foram exclusivos para os fragmentos 2C e SA, respectivamente, em uma frequência de 4,35% (Tab. VI).

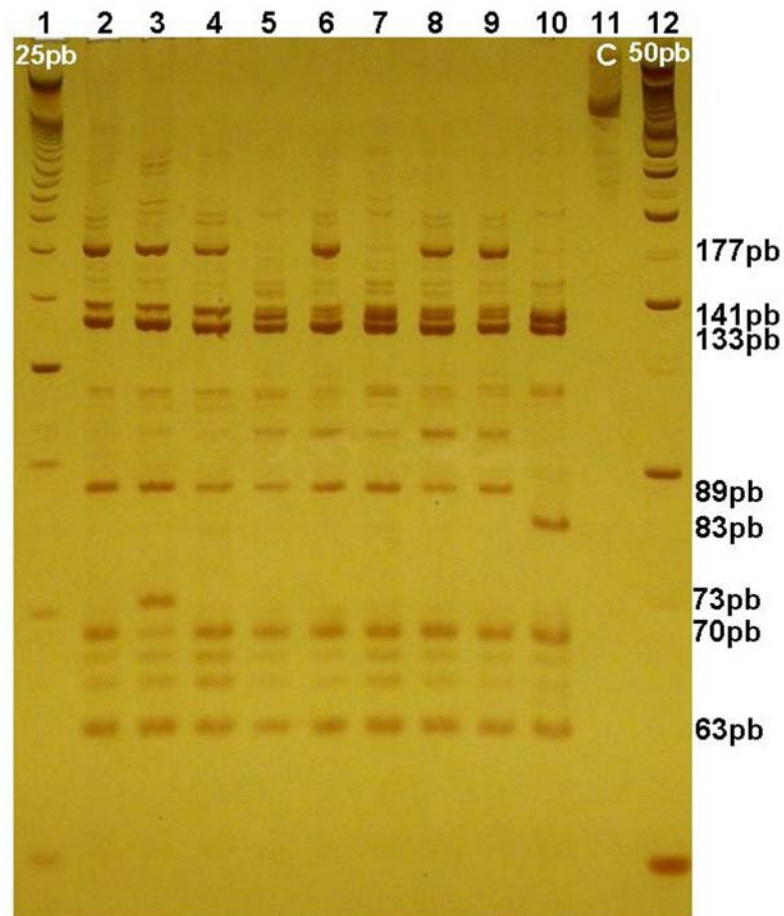


Figura 3. Perfil eletroforético (gel de poliacrilamida 11%) dos fragmentos de restrição para a região 16S mtDNA amplificada via PCR e digerida por enzima *Asel*. Coluna 1: (25pb) - marcador de 25pb;. colunas 2 e 3: indivíduos do fragmento florestal 2C (haplótipos A e B respectivamente); coluna 4: indivíduo de AT (haplótipo A); coluna 5: indivíduo de CA (haplótipo C); colunas 6 a 8: indivíduos de D (haplótipos A, C e A respectivamente); coluna 9: indivíduo de G (haplótipo A); coluna 10: indivíduo de AS (haplótipo D); coluna 11: (C) - controle - fragmento 16S não digerido; coluna 12: (50pb) - marcador de 50pb.

Enzimas	Godoy (G)		Fazenda 2C (2C)		Doralice (D)		Santo Antônio (SA)		Arthur Thomas (AT)		Califórnia (CA)	
	A (23)		A (22)	B (1)	A (21)	C (1)	A (22)	D (1)	A (18)		A (12)	C (1)
Asel	177		177	177	177	-	177	-	177		177	-
	141		141	141	141	141	141	141	141		141	141
	133		133	133	133	133	133	133	133		133	133
	89		89	89	89	89	89	-	89		89	89
	-		-	-	-	-	-	83	-		-	-
	-		-	73	-	-	-	-	-		-	-
	70		70	70	70	70	70	70	70		70	70
	63		63	63	63	63	63	63	63		63	63
Dral	E (22)	F (1)	E (22)	F (1)	E (15)	F (7)	E (23)		E (18)		E (11)	F (2)
	150	150	150	150	150	150	150		150		150	150
	-	144	-	144	-	144	-		-		-	144
	113	113	113	113	113	113	113		113		113	113
	95	95	95	95	95	95	95		95		95	95
	68	68	68	68	68	68	68		68		68	68

Tabela V. Perfil dos haplótipos (A, B, C, D, E e F) dos fragmentos de restrição, produzidos após a digestão da região 16S mtDNA pelas enzimas *Asel* e *Dral*, para os grupos de abelhas dos seis fragmentos florestais estudados.

Haplótipos A, B, C, D, E e F – em parênteses: quantidade de indivíduos da população com cada haplótipo.

Tabela VI. Distribuição e frequência dos haplótipos compostos em cada área de estudo.

Haplótipos	Godoy	2C	Doralice	Santo Antônio	Arthur Thomas	Califórnia	Total (amostras)
AE	22 (95,65%)	21 (91,30%)	14 (63,64%)	22 (95,65%)	18 (100%)	10 (76,93%)	107
AF	1 (4,35%)	1 (4,35%)	7 (31,82%)	-	-	2 (15,38%)	11
BE	-	1 (4,35%)	-	-	-	-	1
CE	-	-	1 (4,54%)	-	-	1 (7,69%)	2
DE	-	-	-	1 (4,35%)	-	-	1
Total (Frequência)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	-

4. DISCUSSÃO

A variação genética representa um dos três níveis de biodiversidade que a IUCN (*World Conservation Union*) recomenda para a conservação biológica. Existem duas razões para esta recomendação: (1) a diversidade genética é necessária para as populações se desenvolverem em resposta a mudanças ambientais e (2) os níveis de heteroziguidade estão ligados diretamente à redução da capacidade adaptativa ocasionada por deriva genética e/ou endocruzamento (Reed e Frankham, 2003).

Alguns estudos sugerem que a fragmentação de ambientes pode levar a uma diferenciação genética das populações com perda da heteroziguidade e diminuição

de alelos, resultando em um declínio da capacidade adaptativa das populações afetadas, com riscos de extinção destas (Mäki-Petäys et al., 2005).

Os níveis de heterozigosidade encontrados para os grupos de abelhas das seis áreas estudadas se mostraram similares aos descritos por Sofia et al. (2005) e Pascual (2006) para outras duas espécies euglossinas, amostradas também em ambientes fragmentados. Por outro lado, os valores de proporção de locos polimórficos (\bar{P}) se mostraram inferiores aos descritos para *Eufriesea violacea* e *Eulaema nigrita* (Sofia et al., 2005; Pascual, 2006).

Ainda, observa-se que os maiores valores de \bar{P} foram encontrados para as amostras dos fragmentos considerados grandes (acima de 100 ha), enquanto as amostras dos fragmentos menores revelaram os menores valores. Powell e Powell (1987) sugerem que o desmatamento tem um efeito negativo sobre as populações de algumas espécies euglossinas, pois pode levar ao declínio da abundância de indivíduos destas espécies. Sabe-se que o tamanho efetivo de uma população é de extrema importância para a manutenção das futuras gerações, pois populações sujeitas a uma diminuição da abundância (ex. efeito de gargalo de garrafa) e conseqüente diminuição do tamanho efetivo podem ter seu potencial evolutivo reduzido, com a redução dos valores de heterozigosidade (Frankham et al., 1999). Portanto, no presente estudo, os menores valores de \bar{P} obtidos para os grupos de abelhas de áreas menores podem estar relacionados a uma menor abundância de *E. fimbriata* nestes fragmentos. Entretanto, tal conclusão deve ser avaliada com cautela, considerando que duas das três amostras dos fragmentos menores possuíam um menor número amostral, o que poderia causar um desvio nos valores de \bar{P} estimados.

Uma das principais críticas à técnica de RAPD relaciona-se à baixa reprodutibilidade dos perfis eletroforéticos e conseqüentemente dos resultados produzidos (Ayliffe, 1994; Pérez et al., 1998; Matioli; Passos-Bueno, 2001). Assim, neste estudo optou-se pela seleção de bandas que mostrassem uma maior reprodutibilidade nos diferentes géis. Desta forma, embora as análises com um número mais reduzido de locos possam por um lado enviesar os resultados, por exemplo, diminuindo a estimativa de variação genética para alguns grupos analisados, desde que os locos polimórficos são mais comumente descartados, por outro lado, trabalha-se com perfis de RAPD mais confiáveis. Alguns trabalhos na literatura têm também restringido as análises de RAPD a um número menor de bandas, as quais mostram alta repetibilidade (Lougheed et al., 2000). Assim, os menores valores de \bar{P} obtidos com a análise das amostras de *E. fimbriata* dos diversos fragmentos florestais podem ser atribuídos à forma de análise adotada no presente trabalho.

Ambos os marcadores empregados neste estudo (RAPD e PCR-RFLP) mostraram uma maior variação genética para o grupo de abelhas do fragmento D. A amostra do fragmento D obteve os maiores valores de proporção de locos polimórficos e de heterozigidade (análises a partir do perfil de RAPD). No que se refere aos resultados com as análises de PCR-RFLP, a amostra deste fragmento florestal mostrou a ocorrência de 3 haplótipos compostos, dois dos quais em freqüências acima de 30%. Embora o fragmento D faça parte de uma propriedade privada, este remanescente vegetal encontra-se em boas condições de preservação (Tab. I), o que poderia explicar em parte os resultados encontrados.

O maior valor encontrado de heterozigidade foi também para a amostra do fragmento D (\bar{H} : 0,1527), enquanto o menor valor de \bar{H} foi detectado para a

amostra da reserva governamental de maior tamanho (fragmento Godoy), a qual também exibiu apenas dois tipos de haplótipos compostos (Tab. VI). Alguns autores sugerem que populações de algumas espécies de euglossinas podem declinar em abundância de indivíduos em fragmentos florestais menores que 100 ha ficando mais sujeitas a processos locais de extinção (Powell e Powell, 1987). Aparentemente, os resultados obtidos com as análises genéticas de *E. fimbriata* apontam na direção de que os tamanhos diferentes dos fragmentos florestais não estão resultando em níveis de variação genética distintos para as amostras desta espécie euglossina.

Como destacado anteriormente, o haplótipo AE foi o mais abundante em todas as localidades e com uma ampla freqüência (63,64 a 95,65%) em todas as amostras (Tab. VI). Com base na teoria da coalescência, alelos mais antigos são encontrados em freqüências mais elevadas e possuem um maior número de conexões mutacionais (Crandall e Templeton, 1993). Assim, no caso de subdivisão das populações, espera-se que os alelos mais antigos estejam mais amplamente distribuídos (McLean et al., 1999). Portanto, os resultados encontrados com as análises de PCR-RFLP indicam que o haplótipo AE seja o mais antigo dos haplótipos encontrados para essa espécie de euglossina na região estudada, e que os demais haplótipos, menos freqüentes, sejam provavelmente resultantes de mutações novas.

Em relação aos três haplótipos compostos que foram menos freqüentes (BE, CE e DE - Tab. VI), é possível que as baixas freqüências encontradas não reflitam obrigatoriamente a condição de haplótipos raros, tendo em vista que os tamanhos das amostras foram relativamente reduzidos. Por outro lado, tem sido mostrado na literatura que com tamanhos amostrais próximos a 20 exemplares por localidade,

cerca de 90% dos haplótipos presentes em uma população são encontrados (McLean et al., 1999).

Quando o isolamento entre populações não é completo, um baixo nível de fluxo gênico pode ser o responsável por prevenir a ocorrência de diferenciação dos alelos das populações (Ferguson et al., 1995). Além disto, a deriva genética pode ser um importante fator para a diferenciação entre populações, particularmente quando o tamanho efetivo das populações é pequeno e o fluxo gênico é limitado. (Ferguson et al., 1995; Hartl e Clark, 1997; Tremblay e Ackerman, 2001). O coeficiente de fixação de alelos (F_{ST}) é uma medida padrão do grau de diferenciação genética entre populações, a qual varia de 0 (ausência de diferenciação) a 1 (ausência de alelos compartilhados) (Hartl e Clark, 1997). De acordo com Wright (1978), valores de F_{ST} de 0 a 0,05 são indicativos de populações com baixa diferenciação genética, de 0,05 a 0,15 indicam moderada diferenciação genética, de 0,15 a 0,25 mostram uma grande diferenciação genética e, valores de 0,25 a 1 indicam uma diferenciação genética muito grande. No presente trabalho, com exceção de quatro pares de grupos (2C-AT, SA-AT, SA-CA e AT-CA) que não mostraram diferenças significativas nas estimativas de Φ_{ST} (análogo ao F_{ST}), os demais 11 pares analisados mostraram valores de Φ_{ST} estatisticamente diferentes de zero (Tab. V), indicando alguma diferenciação genética entre estes grupos. No caso, as amostras dos fragmentos AT, SA e CA não são diferentes significativamente, já as amostras de G, D e 2C diferem significativamente. Com base nos valores estimados de Φ_{ST} , verificou-se que os pares de amostras de 2C-G, 2C-SA e D-AT mostraram uma baixa diferenciação genética, enquanto os pares de amostras dos demais fragmentos mostraram valores de Φ_{ST} indicando uma moderada estruturação genética.

Desta forma, pode-se presumir para a maioria dos pares de amostras analisadas de *E. fimbriata*, que se de fato o fluxo gênico está ocorrendo entre tais grupos ele parece limitado. Além disto, muitos estudos de estruturação genética que utilizam a estatística F ou outras medidas de partição são sujeitas a limitações que podem afetar as interpretações dos resultados (Ross et al., 1999). Kalinowski (2005) observou que para um loco com altos níveis de polimorfismo, são necessários 20 indivíduos (por população) para se obter uma amostra representativa das populações quando o F_{ST} é maior que 0,05, enquanto 100 indivíduos são necessários quando o F_{ST} é menor que 0,01. No presente estudo foram encontrados pares de amostras com estimativas de F_{ST} abaixo de 0,05 e três pares com valores com cerca de 0,01 (Tab. IV); assim, estes resultados devem ser analisados com cautela, visto que eles podem não refletir o nível de diferenciação genética destes pares de amostras.

Alguns estudos demonstraram que abelhas Euglossina conseguem transpor áreas desmatadas (Raw, 1989; Murren, 2002; Tonhasca et al., 2003). Raw (1989) observou algumas espécies de Euglossina transpondo áreas desmatadas entre fragmentos florestais separados por até 4 Km.

No presente estudo os valores de Φ_{ST} obtidos nas análises das abelhas dos seis fragmentos estudados sugerem a ocorrência de subpopulações de *E. fimbriata* na região norte do Paraná, constituindo uma metapopulação desta espécie na região estudada. De forma similar, Sofia et al. (2005), utilizando marcadores RAPD, também observaram a ocorrência de uma única população de *Eufriesea violacea*, uma espécie aparentemente mais sensível que *E. fimbriata* a degradação ambiental (Sofia e Suzuki, 2004), para a mesma região.

Os resultados obtidos com a análise de fragmentos de restrição para a região 16S de *E. fimbriata* são de grande relevância, em parte, por serem os primeiros a serem realizados para esta espécie de euglossina. Além disto, tais resultados contribuem para um maior entendimento da estrutura populacional de *E. fimbriata* em uma paisagem fragmentada, complementando as informações obtidas com marcadores RAPD.

Sofia et al. (2005) sugerem que o tempo reduzido de fragmentação no norte do estado do Paraná, bem como as características biológicas de algumas espécies de euglossinas, as quais apresentam de uma a poucas gerações por ano podem estar determinando o padrão de diversidade genética encontrado para algumas espécies do grupo.

Modelos de genética de populações implicam a afirmação de que, diferenças substanciais nas freqüências alélicas não ocorrem em um curto período de tempo, exceto pela ação de seleção natural ou um pequeno tamanho efetivo da população (que pode ser causado por um evento de “gargalo de garrafa”), de modo que provocariam a diferenciação através da fixação de alelos por deriva genética. (Ferguson et al. 1995). De acordo com Sork et al. (2003), existem na literatura diversos trabalhos sobre biologia da conservação que estimam os níveis de fluxo gênico baseados nos valores de F_{ST} , os quais refletem uma história a longo prazo, não de processos em andamento. Portanto, a recente história da fragmentação da Floresta Atlântica (aproximadamente 70 anos) na região do presente estudo (Torezan, 2002; Torezan et al., 2005) poderia explicar, pelo menos em parte, os baixos valores de diferenciação genética detectados no presente estudo. Além disto, como proposto por Sofia et al. (2005), a grande capacidade de dispersão dos euglossíneos (Janzen, 1971; Roubik e Hanson, 2004) combinado com o fato de que

machos euglossíneos não ficam presos ao ninho, abandonando-o após o nascimento (Dressler, 1982; Cameron, 2004), podem ser um dos maiores fatores que suportam a baixa estruturação populacional de *E. fimbriata* mesmo com a fragmentação existente na região do presente estudo.

Assim, a utilização de marcadores mitocondriais torna-se especialmente interessante no estudo de abelhas euglossinas, pois, por serem marcadores de herança materna (Crozier, 1990; Arias e Infante-Malachias, 2001), estes podem fornecer informações sobre a dispersão de fêmeas na população. Embora tenha sido mostrado que fêmeas euglossinas sejam capazes de voar mais de 20 km em florestas contínuas (Janzen, 1971), ao contrário dos machos, as fêmeas tendem a reutilizar o ninho materno após o nascimento (Garófalo, 1992; Santos e Garófalo, 1994; Augusto e Garófalo, 2004) e explorar fontes de recursos preferencialmente em locais mais próximos ao ninho. Deste modo, espera-se uma menor amplitude de dispersão das fêmeas em comparação aos machos euglossíneos.

Dick et al. (2004) analisaram o DNA mitocondrial (mtDNA) de 14 espécies de euglossíneos, representados por populações presentes ao longo dos Andes e da bacia do rio Amazonas, de modo que foi detectada a ausência de uma estruturação filogeográfica, mesmo com uma elevada escala espacial, esta ausência de estruturação é interpretada como uma combinação da ocorrência de uma especiação no Quaternário, com a expansão da população e/ou uma ampla distribuição por fluxo gênico.

Programas envolvendo o manejo de populações naturais devem considerar fatores importantes como: as relações entre as populações, a distância geográfica e a diversidade entre populações (Kimberling et al. 1996; Solé-Cava, 2001). Finalmente, os resultados do presente estudo indicam que todos os indivíduos de *E.*

fimbriata constituem uma metapopulação constituída de subpopulações na região estudada. Além disto, pode-se ressaltar a importância na conservação dos remanescentes de floresta de propriedades particulares, visto que estes contribuem para a sobrevivência das populações desta e de outras espécies euglossinas.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária e à Fundação O Boticário de Proteção à Natureza (FBPN) pelo apoio financeiro, e a CAPES pela bolsa de estudo de K.M. Suzuki.

REFERÊNCIAS

- Ackerman J.D. (1983) Specificity and mutual dependency of the orchid-euglossine bee interaction, *Biol. J. Linn. Soc.* 20, 301-314.
- Arias M.C., Infante-Malachias M.E. (2001) RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA, in: Mاتيoli F.M.C.F. (Ed.), *Biologia Molecular e Evolução*, Holos Editora, Ribeirão Preto, pp. 143-152.
- Augusto S.C., Garófalo C.A. (2004) Nesting biology and social structure of *Euglossa* (*Euglossa*) *townsendi* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossini), *Insect. Soc.*, 51, 400-409.
- Ayliffe M.A., Lawrence G.J., Ellis J.G., Prior A.J. (1994) Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands, *Nucleic. Acids. Res.*, 22, 1632-1636.
- Bickel T.O., Brühl C.A., Gadau J.R., Hölldobler B., Linsemair K.E. (2006) Influence of habitat fragmentation on the genetic variability in leaf litter ant populations in tropical rainforests of Sabah, Borneo, *Biodiversity Conserv.*, 15, 157-175.
- Bouga M., Harizanis P.C., Kiliadis G., Alahiotis S. (2005) Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR-RFLP analysis of three mtDNA segments, *Apidologie* 36, 335-344.
- Cameron S.A., Derr J.N., Austin A.D., Woolley J.B., Wharton R.A. (1992) The application of nucleotide sequence data to phylogeny of the Hymenoptera: a review, *J. Hym. Res.* 1, 63-79.
- Cameron S.A. (2004) Phylogeny and biology of Neotropical orchid bees (Euglossini), *Annu. Rev. Entomol.* 49, 377-404.
- Collet T., Arias M.C., Del Lama M.A. (2007) 16S mtDNA variation in *Apis mellifera* detected by PCR-RFLP, *Apidologie* 38, 1-8.
- Crandall K.A., Templeton A.R. (1993) Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction, *Genetics*, 134, 959-969.
- Crozier R.H. (1990) From population genetics to phylogeny: uses and limits of Mitochondrial DNA, *Aust. Syst. Bot.* 3, 111-124.
- 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.
- Diniz N.M., Soares A.E.E., Sheppard W.S. (2003) Genetic structure of honeybee populations from southern Brazil and Uruguay, *Gen. Mol. Biol.* 26, 47-52.

- Dowton M., Austin A.D. (1994) Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships, *Evolution* 91, 9911-9915.
- Dressler R.L. (1982) Biology of orchid bees (Euglossini), *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 13, 373-394.
- Estoup A., Garnery L., Solignac M., Cornuet (1995) Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models, *Genetics*, 140, 679-695.
- Estoup A., Solignac M., Cornuet J.M., Goudet J., Scholl A. (1996) Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe, *Mol. Ecol.* 5, 19-31.
- 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. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>. Downloaded 26 jan 2006.
- Ferguson A.J.B.T., Prodöhl P.A., Mcmeel O., Thompson C., Stone C., McGinnity P., Hynes R.A. (1995) The application of molecular markers to the study and conservation of fish population, with special reference *Salmo*, *J. Fish Biol.*, 47, 103-126.
- Francisco F.O., Silvestre D., Arias M.C. (2001) Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction maps, *Apidologie*, 32, 323-332.
- Francisco F.O., Brito R.M., Arias M.C. (2006) allele number and heterozigosity for microsatellite loci in different stingless bee species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini), *Neotrop. Entomol.*, 35, 638-643.
- Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet J.M. (1998) The origin of west european subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data, *Evolution*, 52, 1119-1134.
- Frankham R., Lees K., Montgomery M.E., England P.R., Lowe E.H., Briscoe D.A. (1999) Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential?, *Anim. Conserv.*, 2, 255-260.
- Garófalo C.A. (1992) Comportamento de nidificação e estrutura de ninhos de *Euglossa cordata* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini), *Rev. Brasil. Biol.*, 52, 187-198.
- Hall H.G., Smith D.R. (1991) Distinguishing African and European honeybee matriline using amplified mitochondrial DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 4548-4552.

- Hale M.L., Lurz P.W.W., Shirley M.D.F., Rushton S., Fuller R.M., Wolff K. (2001) Impact of landscape management on the genetic structure of red squirrel populations, *Science*, 293,2246-2248.
- Hartl D.L., Clark A.G. (1997) Principles of population genetics, 3^{ed}. Sinauer Associates, Sunderland.
- Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. (1996) Molecular Systematics, Sinauer Associates, Massachusetts.
- Janzen D.H. (1971) Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. *Science*, 171, 203-205.
- Kalinowski S.T. (2005) Do polymorphic loci require large sample sizes to estimate genetic distances?, *Heredity*, 94, 33-36.
- Kimberling D.N., Ferreira A.R., Shuster S.M., Keim P. (1996) RAPD marker estimation of genetic structure among isolated northern leopard frog populations in the south-western USA, *Mol. Ecol.*, 5, 521-529.
- Lougheed S.C., Gibbs H.L., Prior K.A., Weatherhead P.J. (2000) A comparison of RAPD versus microsatellite DNA markers in population studies of the Massasauga rattlesnake, *J. Hered.*, 91, 458-463.
- Lynch M., Milligan B.G. (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers, *Mol. Ecol.* 3, 91-99.
- Machordom A., Suárez J, Almodóvar A., Bautista J.M. (2000) Mitochondrial haplotype variation and phylogeography of Iberian brown trout populations, *Mol. Ecol.*, 9, 1325-1338.
- Martins C.F., Souza A.K.P. (2005) Estratificação vertical de abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em uma área de Mata Atlântica, Paraíba, Brasil, *Rev. Bras. Zool.* 22, 913-918.
- Matioli R., Passos-Bueno M.R.S. (2001) Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos, in: Matioli, S. R. (Ed), *Biologia Molecular e Evolução*, Holos, Ribeirão Preto, pp. 153-161.
- Mäki-Petäys H., Zakharov A., Viljakainen L., Corander J., Pamilo P. (2005) Genetic changes associated to declining populations of *Formica* ants in fragmented forest landscape, *Mol. Ecol.*, 14, 733-742.
- McLean J.E., Hay D.E., Taylor E.B. (1999) Marine population structure in an anadromous fish: lifehistory influences patterns of mitochondrial DNA variation in the eulachon, *Thaleichthys pacificus*, *Mol. Ecol.*, 8, S143-S158.
- Michel-Salzat A., Cameron S.A., Oliveira M.L. (2004) Phylogeny of the orchid bees (Hymenoptera: Apinae: Euglossina): DNA and morphology yield equivalent patterns, *Mol. Phyl. Evol.* 32, 309-323.

- Miedaner T., Schilling A.G., Geiger H.H. (2001) Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries, J. Phytopathol., 149, 641-648.
- 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.
- Moretto G., Arias M.C. (2005) Detection of mitochondrial DNA restriction site differences between the subspecies of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini), Neotrop. Entomol. 34, 381-385.
- Murren C.J. (2002) Effects of habitat fragmentation on pollination: pollinators, pollinia viability and reproductive success, J. Ecol., 90, 100-107.
- Nemésio A. (2003) Preliminary sampling of Euglossina (Hymenoptera: Apidae: Apini) of Reserva Particular do Patrimônio Natural "Feliciano Miguel Abdala", Caratinga, Minas Gerais, southeastern Brazil, Lundiana 4, 121-124.
- Neves E.L., Viana B.F. (2003) A fauna de abelhas da subtribo Euglossina (Hymenoptera, Apidae) do estado da Bahia, Brasil, in: Melo G.A.R., Alves-dos-Santos I. (Eds.), Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure, Editora UNESC, Criciúma, pp.223-229.
- Pascual A.N.T. (2006) Análises genéticas de abelhas Euglossina Dissertação de mestrado. 103p. Curso de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina.
- Pérez T., Albornoz J.A., Domênguez A. (1998) An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature, Mol. Ecol., 7, 1347-1357.
- Perez-Sweeney B.M., Rodrigues F.P., Melnick D.J. (2004) 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, Editora da UFPR, Curitiba, pp. 343-366.
- Peruquetti R.C., Campos L.A.O., Coelho C.D.P., Abrantes C.V.M., Lisboa L.C.O. (1999) Abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância, riqueza e aspectos biológicos, Rev. Bras. Zool. 16, 101-118.
- Powell A.H., Powell G.N.N. (1987) Population dynamics of male euglossine bees in Amazonian forest fragments, Biotropica, 19, 176-179.
- Raw A. (1989) The dispersal of euglossine bees between isolated patches of eastern Brazilian wet forest (Hymenoptera, Apidae), Rev. Bras. Entomol., 33, 103-107.
- Ray J.D. (2000) Fragment Length Calculator: a Windows 95 program for calculating DNA fragment length, J. Hered. 91, 177-178.

- Reed D.H., Frankham R. (2003) Correlation between Fitness and Genetic Diversity, *Conserv. Biol.*, 17, 230-237.
- Rebêlo J.M.M. (2001) História natural das euglossíneas – as abelhas das orquídeas, Lithograf, São Luís.
- Rebêlo J.M.M., Garófalo C.A., (1991) Diversidade e sazonalidade de machos de Euglossini (Hymenoptera, Apidae) e preferências por iscas-odores em um fragmento de floresta no sudeste do Brasil, *Rev. Bras. Biol.* 51, 787-799.
- Rebêlo J.M.M., Rego M.M.C., Albuquerque P.M.C. (2003) Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) da região setentrional do Estado do Maranhão, in: Melo G.A.R., Alves-dos-Santos I. (Org.), *Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure*, UNESCO, Criciúna, pp. 265-278.
- Ross K.G., Schoemaker D.D., Krieger M.J.B., DeHeer C.J., Keller L. (1999) Assessing genetic structure with multiple classes of molecular markers: a case study involving the introduced fire ant *Solenopsis invicta*, *Mol. Biol. Evol.*, 16, 525-543.
- Roubik D.W., Hanson P.E. (2004) *Orchid bees of Tropical America: Biology and field guide*, INBio Press, Heredita, Costa Rica.
- Santos M.L., Garófalo C.A. (1994) Nesting biology and nest re-use of *Eulaema nigrita* (Hymenoptera: Apidae, Euglossini), *Ins. Soc.* 41, 99-110.
- Silveira F.A., Melo G.A., Almeida E.A.B. (2002) *Abelhas Brasileiras – sistemática e identificação*, MMA e Fundação Araucária, Belo Horizonte.
- 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, *Gen. 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) e fragmentos florestais no sul do Brasil. *Neotrop. Entomol.* 33, 693-702.
- Solé-Cava A.J. (2001) Biodiversidade molecular e genética da conservação, in: Matioli S. R. (Ed.), *Biologia Molecular e Evolução*, Holos, Ribeirão Preto, pp. 171-190.
- Sork V.L., Campbell D., Dyer R., Fernandez J., Nason J., Petit R., Smouse P., Steinberg, E. (2003) Current approaches: gene flow on ecological time scales (Summary of workshop discussions). in: *Proceedings from a workshop on gene flow in fragmented, managed, and continuous populations*, University of California, Santa Barbara, pp.5-9.

- Souza A.K.P., Hernández M.I.M., Martins C.F. (2005) Riqueza, abundância e diversidade de Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em três áreas da Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil, *Rev. Bras. Zool.* 22, 320-325.
- Tomimatsu H., Ohara M. (2004) Edge effects on recruitment of *Trillium camschatcense* in small forest fragments, *Biol. Conserv.* 117, 509-519.
- Tonhasca A.Jr., Blackmer J.L., Albuquerque G.S. (2002) Abundance and diversity of euglossine bees in the fragmented landscape of the Brazilian Atlantic Forest, *Biotropica* 34, 416-422.
- Tonhasca A.Jr., Blackmer J.L., Albuquerque G.S. (2003) Dispersal of euglossine bees between fragments of the Brazilian Atlantic Forest, *J. Trop. Ecol.*, 19, 99-102.
- Torezan J. M. (2002) Nota sobre a vegetação da bacia do rio Tibagi, in: Medri M.E., Bianchini E., Shibatta O.A., Pimenta J.A. (Eds.) *A Bacia do Rio Tibagi*, Editora dos Editores, Londrina, pp. 103-107.
- Torezan J.M.D., Souza R.F., Ruas P.M., Ruas C.F., Camargo E.H, Vanzela, A.L.L. (2005) Genetic variability of pre and post-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae), *Braz. Arch. Biol. Tech.*, 48, 171-180.
- Tremblay R.L., Ackerman J.D. (2001) Gene flow and effective population size in *Lepanthes* (Orchidaceae): a case for genetic drift, *Biol. J. Linn. Soc.*, 72, 47-62.
- Waldschmidt A.M., Lopes L.A., Marco P.Jr., Campos L.A.O. (2005) Genetic of Euglossini bees (Hymenoptera) in fragments of the Atlantic forest in the region of Viçosa, MG, Brazil. *J. Biol.* 65, 541-549.
- Weinlich R., Francisco, F.O., Arias M.C. (2004) Mitochondrial DNA restriction and genomic maps of seven species of *Melipona* (Apidae: Meliponini), *Apidologie*, 34, 365-370.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.L., Rafalski J.A.A., Tingey S.V. (1990) DNA Polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.
- Wright S. (1978) *Evolution and the genetics of populations. v.4. variability within and among natural populations*, University Of Chicago Press, Chicago.

4 CONCLUSÕES

- Obteve-se sucesso na implantação da técnica de PCR-RFLP no laboratório, obtendo resultados importantes para a análise do presente trabalho.
- A análise de machos de *E. fimbriata* utilizando marcadores para mtDNA corrobora os resultados encontrados com marcadores RAPD, indicando a ocorrência de subpopulações de *E. fimbriata*, constituindo uma metapopulação desta espécie na região estudada.
- Um halótipo composto (AE) apresenta-se como o mais antigo dentre os cinco encontrados para *E. fimbriata*; atribui-se este fato às elevadas frequências e ampla distribuição de tal haplótipo.
- Aparentemente os tamanhos diferentes dos fragmentos florestais não estão resultando em níveis de variação genética muito distintos para os grupos de *E. fimbriata* estudados.
- Deve-se ressaltar ainda a importância na conservação dos remanescentes de floresta de propriedades particulares, visto que estes contribuem para a manutenção da diversidade genética desta e de outras espécies euglossinas.

5 REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, J. D. Diversity and seasonality of male euglossine bees (Hymenoptera: Apidae) in Central Panama. **Ecology**, v. 64, p. 274-283. 1983a.
- ACKERMAN, J. D. Specificity and mutual dependency of the orchid-euglossine bee interaction. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 20, p. 301-314. 1983b.
- AIZEN, M. A.; FEISENGER, P. Habitat fragmentation, native insect pollinators, and feral honey bees in Argentine "Chaco Serrano". **Ecological Applications**, v. 4, p.378-392. 1994.
- ARIAS, M.C., FRANCISCO, F.O., SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. In: MELO, A.R.; ALVES-DOS-SANTOS, I. **Apoidea Neotropica: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Editora UNESCO, Criciúma, p.305-309. 2003.
- ARIAS, M.C.; INFANTE-MALACHIAS, M.E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: MATIOLI, F.M.C.F. (ed.) **Biologia Molecular e Evolução**, 2001. p. 143-152.
- AUGUSTO, S.C.; GARÓFALO, C.A. Nesting biology and social structure of *Euglossa (Euglossa) townsendi* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossini), **Insects Sociaux**, v.51, p.400-409. 2004.
- AYLIFFE, et al. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. **Nucleic Acids Research** 1994. 22: 1632-1636.
- BECKER, P.; MOURE, J.S.; PERALTA, F.J.A. More about Euglossine bees in Amazonian forest fragments. **Biotropica**, v. 23, p. 586-91. 1991.
- BEZERRA, C.P.; MARTINS, C.F. Diversidade de Euglossinae (Hymenoptera, Apidae) em dois fragmentos de Mata Atlântica localizados na região urbana de João Pessoa, Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, p. 823-835. 2001.
- BICKEL, et al. Influence of habitat fragmentation on the genetic variability in leaf litter ant populations in tropical rainforests of Sabah, Borneo, **Biodiversity and Conservation**, v.15, p.157-175. 2006.
- BOUGA, et al. Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR-RFLP analysis of three mtDNA segments, **Apidologie** v.36, p.335-344. 2005.
- BRAGA, P.I.S. Atração das abelhas polinizadoras de Orchidaceae com auxílio de iscas-odores na campina, campinarama e floresta tropical úmida da região de Manaus. **Ciência e Cultura**, v. 28, p. 767-73. 1976.
- CALCAGNOTTO, D. Taxas de evolução e o relógio molecular. In: MATIOLI, F.M.C.F. (ed.) **Biologia Molecular e Evolução**, 2001. p. 52-63.

CAMERON, et al. The application of nucleotide sequence data to phylogeny of the Hymenoptera: a review, **Journal Hymenoptera Research**. v.1, p.63-79. 1992.

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

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

CRANDALL, K.A.; TEMPLETON, A.R. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction, **Genetics**, v.134, p.959–969. 1993.

CROZIER R.H. From population genetics to phylogeny: uses and limits of Mitochondrial DNA, **Australian Systematics Botanical**, v.3, p.111-124. 1990.

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

CROZIER, R.H.; CROZIER, Y.C.; MACKINLAY, A.G. The CO-I and CO-II region of honeybee mitochondrial DNA: evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. **Molecular Biology and Evolution**. v. 6, 399-411.1989.

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

DICK et al. 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.

DINIZ N.M., SOARES A.E.E., SHEPPARD W.S. Genetic structure of honeybee populations from southern Brazil and Uruguay, **Genetics and Molecular Biology**, v.26, p.47-52. 2003.

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

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

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

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

ESTOUP A., GARNERY L., SOLIGNAC M., CORNUET Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models, **Genetics**, v.140, p.679-695. 1995.

- ESTOUP, A. et al. Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe, **Molecular Ecology**, v.5, p.19-31. 1996.
- 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, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**, 3. ed. Brasília: Ed. EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- FERGUSON, et al. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population, with special reference *Salmo*. **Journal of Fish Biology**, v.47, p.103-126. 1995.
- FRANCISCO, F.O. Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão *Plebeia remota*: análise do DNA mitocondrial e microssatélites. 2002. 147 p. Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- FRANCISCO, F.O., SILVESTRE, D., ARIAS, M.C. Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction maps, **Apidologie**, v.32, p.323-332. 2001.
- FRANCISCO F.O., BRITO R.M., ARIAS M.C. Allele number and heterozygosity for microsatellite loci in different stingless bee species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini), **Neotropical Entomology**, v.35, p.638-643. 2006.
- FRANCK, et al. The origin of west european subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data, **Evolution**, v.52, p.1119-1134. 1998.
- FRANKHAM, et al. Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential?, **Animal Conservation**, v.2, p.255-260. 1999.
- FRANKIE, et al. Characteristics and organizations of a large pollination system in the Costa Rica dry forest. In: JONES, C.E.; LITTLE, R.J. **Handbook of Experimental Pollination Biology**, New York: Van Nostrand Reinhold Comp., 1983. p. 411-417.
- 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.
- GARÓFALO, C.A. et al. Diversidade, abundância sazonal de Euglossini (Hymenoptera, Apidae) na Serra do Japi, Jundiaí, SP. In: SIMPÓSIO DE

ECOSSISTEMAS BRASILEIROS, 4, 1998, Águas de Lindóia, **Anais do Simpósio de Ecossistemas Brasileiros**, Águas de Lindóia, 1998. v. 3, p. 72-79.

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

HALE M.L., LURZ P.W.W., SHIRLEY M.D.F., RUSHTON S., FULLER R.M., WOLFF K. Impact of landscape management on the genetic structure of red squirrel populations, **Science**, v.293, p.2246-2248. 2001.

HARTL D.L., CLARK A.G. **Principles of population genetics**, 3^{ed}. Sinauer Associates, Sunderland. 1997.

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

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

KALINOWSKI S.T. Do polymorphic loci require large sample sizes to estimate genetic distances?, **Heredity**, v.94, p.33-36. 2005.

KIMBERLING, D.N.; FERREIRA, A.R.; SHUSTER, S.M.; KEIM, P. RAPD marker estimation of genetic structure among isolated northern leopard frog populations in the south-western USA. **Molecular Ecology** 5: 521-529. 1996

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

LOUGHEED, S.C.; GIBBS, H.L.; PRIOR, K.A.; WEATHERHEAD, P.J. A comparison of RAPD versus microsatellite DNA markers in population studies of the Massasauga rattlesnake. **Journal of Heredity**, v.91, p.458-463, 2000.

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

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

MACHORDOM A., SUÁREZ J, ALMODÓVAR A., BAUTISTA J.M. Mitochondrial haplotype variation and phylogeography of Iberian brown trout populations, **Molecular Ecology**, v.9, p.1325-1338. 2000.

MARTINS, C.F.; SOUZA, A.K.P. Estratificação vertical de abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em uma área de Mata Atlântica, Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 2005.

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

- MÄKI-PETÄYS, H. et al. Genetic changes associated to declining populations of *Formica* ants in fragmented forest landscape, **Molecular Ecology**, v.14, p.733–742. 2005.
- McLEAN, J.E.; HAY, D.E.; TAYLOR, E.B. Marine population structure in an anadromous fish: lifehistory influences patterns of mitochondrial DNA variation in the eulachon, *Thaleichthys pacificus*, **Molecular ecology**, v.8, p.S143-S158. 1999.
- METZGER, J.P. Estrutura da paisagem: o uso adequado de métricas. In: CULLEN JR, L.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PADUA, C. **Métodos de estudo em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**, Curitiba: Editora da UFPR, 2004. cap.16. p. 423-454.
- MICHENER, C.D. **The Social Behavior of Bees: A Comparative Study**. Cambridge, Massachusetts: Belknap Press of Harvard University Press. 404p. 1974.
- MICHEL-SALZAT, A.; CAMERON, S.A.; OLIVEIRA, M.L. Phylogeny of the orchid bees (Hymenoptera: Apinae: Euglossina): DNA and morphology yield equivalent patterns. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 32, p. 309-323. 2004.
- MIEDANER, T., SCHILLING, A.G., GEIGER, H.H. Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries, **Journal of Phytopathology**, v.149, p.641-648. 2001.
- 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.
- MORATO, E.F. Abundância e riqueza de machos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em mata de terra firme e áreas de derrubada, nas vizinhanças de Manaus (Brasil). **Boletim Museu Para. Emílio Goeldi, sér. Zool.**, v. 10, n.1. p. 95-105. 1994.
- MORATO, E.F.; CAMPOS, L.A.O.; MOURE, J.S. Abelhas Euglossini (Hymenoptera, Apidae) coletadas na Amazônia Central. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 36, p. 767-71. 1992.
- MORETTO, G., ARIAS, M.C. Detection of mitochondrial DNA restriction site differences between the subspecies of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini), **Neotropical Entomolog**, v.34, p.381-385. 2005.
- MURREN, C.J. Effects of habitat fragmentation on pollination: pollinators, pollinia viability and reproductive success. **Journal of Ecology**, v. 90, p. 100-107. 2002.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590. 1978.
- NEMÉSIO, A. Preliminary sampling of Euglossina (Hymenoptera: Apidae: Apini) of Reserva Particular do Patrimônio Natural “Feliciano Miguel Abdala”, Caratinga, Minas Gerais, southeastern Brazil, **Lundiana** v.4, p.121-124. 2003.

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

NEVES, E.L., VIANA, B.F. A fauna de abelhas da subtribo Euglossina (Hymenoptera, Apidae) do estado da Bahia, Brasil, in: Melo G.A.R., Alves-dos-Santos I. (Eds.), **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**, Editora UNESC, Criciúma, p.223-229. 2003.

OLIVEIRA, M.L.O.; CAMPOS, L.A.O. Abundância, riqueza e diversidade de abelhas Euglossinae (Hymenoptera, Apidae) em florestas contínuas de terra firme na Amazônia Central, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 12, p. 547-56. 1995.

OLIVEIRA, M.L.O.; CAMPOS, L.A.O. Preferência por estratos florestais e por substâncias odoríferas em abelhas Euglossinae (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 41, p. 1075-85. 1997.

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

PASCUAL, A.N.T. **Análises genéticas de abelhas Euglossina**, Dissertação de mestrado. 103p. Curso de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina. 2006.

PAULA, F.M. **Variabilidade e estrutura genética de populações de abelhas Euglossinae (Hymenoptera: Apidae) em fragmentos florestais no Norte do Paraná**, 2003. 52 p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

PÉREZ, T., J.A. ALBORNOZ & A. DOMÉNGUEZ. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Molecular Ecology**, 1998. v.7, p.1347-1357.

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

PERUQUETTI, R.C. et al. Abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância, riqueza e aspectos biológicos. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 2, p. 101-118. 1999.

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

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

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

REED D.H., FRANKHAM R. Correlation between Fitness and Genetic Diversity, **Conservation Biology**, v.17, p.230-237. 2003.

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

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

REBÊLO J.M.M., REGO M.M.C., ALBUQUERQUE P.M.C. Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) da região setentrional do Estado do Maranhão, in: Melo G.A.R., Alves-dos-Santos I. (Org.), **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure**, UNESCO, Criciúna, p. 265-278. 2003.

ROSS, K.G.; SHOEMAKER, D.D.; KRIEGER, M.J.B.; DEHEER, C.J.; KELLER, L. Assessing genetic structure with multiple classes of molecular markers: a case study involving the introduced fire ant *Solenopsis invicta*. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, p.525-543. 1999.

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

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

SANTOS, M.L.; GARÓFALO, C.A. Nesting biology and nest re-use of *Eulaema nigrita* (Hymenoptera: Apidae, Euglossini), **Insects Sociaux**, v.41, p.99-110. 1994.

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

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

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

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

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

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

SOLÉ-CAVA, A.J. Biodiversidade molecular e genética da conservação, in: Matioli S. R. (Ed.), **Biologia Molecular e Evolução**, Holos, Ribeirão Preto, p. 171-190. 2001.

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

SOUZA, A.K.P.; HERNÁNDEZ, M.I.M.; MARTINS, C.F. Riqueza, abundância e diversidade de Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em três áreas da Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22. p.320-325. jun, 2005.

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

TOMIMATSU, H.; OHARA, M. Edge effects on recruitment of *Trillium camschatcense* in small forest fragments, **Biological and Conservation**, v.117, p.509-519. 2004.

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

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

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

TOREZAN, J.M.D., SOUZA, R.F. de, RUAS, P.M. RUAS, C.F., CAMARGO, E.H e VANZELA, A.L.L.. Genetic variability of pre and post-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, no.2, p.171-180. 2005.

TREMBLAY, R.L.; ACKERMAN, J.D. Gene flow and effective population size in *Lepanthes* (Orchidaceae): a case for genetic drift, **Biological Journal of Linnean Society**, v.72, p.47-62. 2001.

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

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

WEINLICH, R.; FRANCISCO, F.O.; ARIAS, M.C. Mitochondrial DNA restriction and genomic maps of seven species of *Melipona* (Apidae: Meliponini), **Apidologie**, v. 34, p.365-370. 2004.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7213-7218. 1990.

WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA Polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535. 1990.

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

WITTMANN, D. et al. Seasonality and seasonal changes in preferences for scent baits in *Euplusia violacea* in Rio Grande do Sul/Brazil. **Entomologia Generalis**, v. 14, p. 217-221.1989.

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

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