



Universidade Estadual de Londrina

Amalia Nelci Teresita Pascual

ANÁLISES GENÉTICAS DE ABELHAS EUGLOSSINA

Londrina

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agrônomo do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Amalia Nelci Teresita Pascual

ANÁLISES GENÉTICAS DE ABELHAS EUGLOSSINA

Londrina

2006

Amalia Nelci Teresita Pascual

ANÁLISES GENÉTICAS DE ABELHAS EUGLOSSINA

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

2006

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P281a Pascual, Amalia Nelci Teresita.
Análises genéticas de abelhas Euglossina / Amalia Nelci
Teresita Pascual. – Londrina, 2006.
ii, 103f. : il.

Orientador: Silvia Helena Sofia.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia
Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, 2006.
Inclui bibliografias.

1. Abelhas Euglossina – Teses. 2. Genética ecológica –
Teses. 3. Ge-
nética molecular – Teses. I. Sofia, Silvia Helena. II.
Universidade Esta-

Amalia Nelci Teresita Pascual

Análises genéticas de abelhas Euglossina

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. Silvia Helena Sofia
Depto. de Biologia Geral - UEL

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

Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas
Depto. de Biologia Geral - UEL

Londrina, 24 de fevereiro de 2006.

A Juan, Verena e Elian

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Silvia, minha orientadora favorita, por ter falado “sim” quando entrei no seu laboratório depositando sua confiança e aceitando entrar nesta árdua tarefa e, além disso, por ter me proporcionado todo o apoio técnico-científico e pessoal.

A Karen e a Natasha “as duas abelhudas”, muito especialmente por ter me ajudado tanto na realização deste trabalho.

Aos meus colegas de mestrado, sobretudo a minha colega no laboratório, pelo companheirismo e “pelas infinitas diluições”: Obrigada Fram!

A todo o pessoal do Laboratório: Yuldi, Bruno, Fer, Carla, Dalita, Juliano, Miriam e Douglas pela colaboração constante, pelos bons momentos compartilhados, as aulas de português e, sobretudo a paciência com meu ‘portunhol’.

A professora Lúcia G. Caetano, graças a quem eu consegui conhecer minha orientadora e continuar trabalhando no que eu mais desejo.

A professora Leda M. K. Sodré, que assim como a minha orientadora me deu sempre não só apoio científico, mas também pessoal.

Aos membros da banca examinadora, Dr^a. Maria Cláudia C. Ruvolo-Takasusuki e Dr. Paulo Maurício Ruas, pelas valiosas sugestões, que muito contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Ao Programa do Mestrado em Genética e Biologia Molecular e a todos os professores e funcionários do Departamento de Biologia Geral, que ajudaram na minha formação profissional e pessoal.

A secretária Sueli Miranda, do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UEL, pelos freqüentes auxílios prestados.

A CAPES, PROPPG–UEL e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Ao IBAMA e IAP pela permissão para coletas.

As abelhas por terem se deixado coletar e estudar, meus respeitos as Euglossina.

A todas as pessoas que conheci da UEL, as quais sempre me trataram com muito carinho.

A minhas queridas sogra e mãe, eu não vou terminar de agradecer elas, já que sem suas dedicações e cuidados de avós e mães, eu não teria ficado tranqüila para fazer o meu trabalho.

A professora Claudia Martinez e ao Juan pela ajuda na edição do trabalho.

E especialmente aos meus três amores, Juan, Verena e agora o mestre Elian, que dão felicidade e me fazem apreciar todos os dias da minha vida.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	i
1. INTRODUÇÃO GERAL	
1.1 A Mata Atlântica e a Fragmentação Florestal	1
1.2 As Abelhas Euglossinas e a Espécie <i>Eulaema nigrita</i>	5
1.3 Conservação, Diversidade Genética e Marcadores Moleculares	11
2. OBJETIVOS	
1.4 Objetivo Geral	23
1.5 Objetivos Específicos	23
3. ARTIGO 1: Evaluation of the RAPD profiles from different body parts of <i>Euglossa pleosticta</i> males (Hymenoptera, Apidae, Euglossina)	24
3.1 Resumo	26
3.2 Abstract	
3.3. Introduction	28
3.4. Material and Methods	29
3.5. Results	32
3.6. Discussion	33
3.7 Literature cited	36
Tables	39
Figures	41
4. ARTIGO 2: Diversidade Genética de <i>Eulaema nigrita</i> (Hymenoptera, Apidae, Euglossina) em Remanescentes de Mata Atlântica	43
4.1 Resumo	45
4.2. Introdução	46
4.3. Materiais e Métodos	48
4.4. Resultados	58
4.5 Discussão	64
4.6 Referências	72
Anexos	79
5. CONCLUSÕES	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

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.

RESUMO

Estudos com marcadores moleculares são muito utilizados para estudos de genética ecológica de grande variedade de organismos. Contudo, até o presente ainda são poucos os estudos genéticos sobre as abelhas Euglossina, as quais constituem um grupo importante de polinizadores neotropicais. O presente estudo envolveu dois tipos de análises relacionadas a duas espécies de Euglossina. Uma destas análises avaliou os perfis eletroforéticos de marcadores RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) produzidos a partir da amplificação do DNA genômico extraído separadamente de diferentes partes do corpo (cabeça, pernas, tórax + asas e abdômen) de 12 machos de *Euglossa pleosticta*, uma espécie de abelhas Euglossina. Os resultados revelaram uma maior repetibilidade nos perfis de RAPD obtidos a partir das amplificações de DNA genômico extraído da cabeça, pernas e tórax+asas das abelhas em comparação com os perfis resultantes da amplificação de DNA extraído do abdômen ($\chi^2=10,27$; g.l. = 1; $p<0,01$). Tais resultados indicaram que a cabeça, pernas e tórax+asas são igualmente úteis e confiáveis para serem utilizadas para a extração e a amplificação do DNA genômico destes insetos. No segundo tipo de análise, marcadores RAPD foram usados na investigação da diversidade genética de populações de *Eulaema nigrita* de quatro fragmentos florestais de tamanhos diferentes (entre 20 e 200 ha) em propriedades particulares, e de uma reserva florestal governamental (680 ha), todos localizados na região norte do Paraná, sul do Brasil. A vegetação das cinco áreas corresponde a remanescentes de Mata Atlântica com diferentes graus de perturbação antrópica. As estimativas médias da proporção de locos polimórficos das cinco populações estudadas variaram de 51,61% (fragmento pequeno) a 60% (fragmento conservado grande). Os

valores dos testes θ_p e exato de Fisher não mostraram diferenças significativas para as várias análises comparativas realizadas, sugerindo a ausência de diferenciação genética entre as populações. Corroborando ambas as estimativas, foram obtidos elevados valores de identidade genética de Nei (0,9754 – 0,9893) nas diferentes análises comparativas entre as populações das cinco áreas. Os resultados indicaram valores de Nm variando de 3,79 a 28,48, sugerindo um fluxo gênico entre as populações dos fragmentos analisados. As análises não mostraram qualquer relação ($P > 0,05$) entre os diferentes parâmetros genéticos estudados e as distâncias geográficas entre os fragmentos florestais. Os valores mais elevados de Nm (16,53, 27,84 e 28,48) podem estar refletindo possíveis eventos de extinção e colonização em três das populações estudadas. Os resultados indicam a ocorrência de uma única população de *E. nigrita* na região estudada e a importância de se preservar fragmentos florestais de diversos tamanhos para a manutenção da diversidade genética desta espécie de abelhas Euglossina.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A Mata Atlântica e a Fragmentação Florestal

A Mata Atlântica ou Floresta Atlântica representa um grande bioma constituído por um conjunto de 15 ecorregiões, sendo considerada a segunda maior formação de floresta tropical da América do Sul (Di Bitteti *et al.*, 2003). Toda esta grande região depende principalmente da umidade que constantemente chega a ela, trazida pelo Oceano Atlântico. Originalmente a Mata Atlântica abrangia uma área contínua de mais de 1 milhão de km² de norte a sul do território brasileiro, chegando suas regiões interiores até a Argentina e o Paraguai (Costa, 1997; Oliveira Filho & Fontes, 2000).

Esta ampla distribuição geográfica sobre solos diferenciados, aliada a uma série de formações montanhosas litorâneas, que chega muito próximo dos três mil metros de altitude, cria condições ambientais de diferentes temperaturas, isolamento, nichos específicos e adaptações decorrentes de distintas eras geológicas que fazem da Mata Atlântica uma das florestas de maior diversidade biológica de todo o planeta (Costa, 1997).

Além da alta riqueza em número de espécies que apresenta, este importante bioma possui uma enorme quantidade de endemismos, com aproximadamente 7% de suas espécies características ou endêmicas, não se encontrando em nenhum outro ecossistema do mundo (Di Bitteti *et al.*, 2003). Tal fato destaca a importância da Mata Atlântica como um ecossistema singular e, portanto, especialmente valioso em termos de patrimônio da biodiversidade mundial.

Apesar de toda sua importância, atualmente a Mata Atlântica conta com apenas cerca de 7,4% de sua superfície original (Di Bitteti *et al.*, 2003) sendo a maior parte

deste valor representada por um enorme número de fragmentos florestais de tamanhos variados, formando uma paisagem descontínua (S.O.S. Mata Atlântica, 1998; Di Bitteti *et al.*, 2003). A causa desta drástica redução pode ser atribuída ao desmatamento que teve início principalmente a partir do século XIX, coincidente com a entrada dos colonizadores europeus e a riqueza explorada por eles desde essa época (Costa, 1997, Morellato & Haddad, 2000; Torezan, 2002).

Segundo Tonhasca *et al.* (2003), em virtude da alta biodiversidade, grande número de espécies endêmicas existentes, e da redução que vem sofrendo por um extenso período de tempo, a Mata Atlântica se encontra catalogada atualmente como um *hot-spot* mundial, sendo alvo de muitos esforços governamentais e não governamentais para sua conservação (Di Bitteti *et al.*, 2003).

Entre as várias ecorregiões ou ecossistemas associados à Mata Atlântica inclui-se a Floresta Estacional Semidecidual, caracterizada pela presença de árvores perenifólias até decíduas, de 30 a 40 m de altura (Alonso, 1977; Soares & Medri, 2002). Este tipo de formação vegetal, também conhecido pela denominação de Ecorregião Florestas do Alto Paraná, é a que possuía maior área original (471.204 km²), estendendo-se da vertente oeste da Serra do Mar, no Brasil, até o leste do Paraguai e a Província de Misiones na Argentina (Di Bitteti *et al.*, 2003). Toda esta área era originalmente coberta por uma contínua floresta estacional semidecidual, com alta diversidade de espécies de plantas, que formavam diferentes comunidades florestais. As florestas da região norte do Estado do Paraná, presentes dentro do domínio da Mata Atlântica, pertencem a este tipo de vegetação (Alonso, 1977).

Do ponto de vista de conservação, a Floresta Estacional Semidecidual constitui um ecossistema muito importante uma vez que também possui uma grande biodiversidade e um alto número de espécies endêmicas (Di Bitteti *et al.*, 2003).

Entretanto, o desmatamento constante da vegetação da Ecorregião de Florestas do Alto Paraná desde séculos passados, como resultado da expansão agrícola e a urbanização, levou tanto a uma grande fragmentação dos habitats originais, como ao isolamento e degradação dos mesmos (Di Bitteti *et al.*, 2003).

A fragmentação florestal ocorre quando coberturas contínuas de vegetação são convertidas em uma ou várias áreas menores como consequência do desenvolvimento da agricultura, desmatamento ou urbanização. Segundo Fahrig (2003), a fragmentação de habitat é freqüentemente definida como um processo durante o qual “uma grande extensão de habitat é transformada em várias partes (habitats) menores, isoladas entre si por uma matriz diferente do habitat original”. Assim, durante a fragmentação o habitat original não só fica menor que a área total, como também as regiões remanescentes se tornam mais isoladas pelo uso diferencial da terra (Yahner & Mahan, 2002). A perda de habitat traz consequências, tanto na distribuição geográfica como na composição genética das populações animais e vegetais, sendo provavelmente o primeiro fator que contribui com a extinção de espécies no mundo (Sih *et al.*, 2000).

Nos esforços de preservação de florestas geralmente são considerados os grandes blocos de matas relativamente intactas, bem como as conexões destes a outros fragmentos florestais por meio de corredores de floresta nativa, contudo, hoje em dia também não se descarta o valor da conservação dos pequenos fragmentos (Brose, 2003; Di Bitteti *et al.*, 2003). Há muitas maneiras pelas quais pequenos fragmentos podem contribuir para a conservação da biodiversidade. Primeiro, pequenos fragmentos florestais podem cumprir uma função importante na proteção de microbacias hidrográficas e dos solos. Segundo, eles podem servir como trampolins ecológicos, ‘ilhas de vegetação’ que indicam o caminho para a criação de futuros corredores biológicos. Terceiro, podem também funcionar como refúgio de inverno para alguns

pássaros migratórios locais, bem como de locais distantes. Quarto, tais fragmentos podem fornecer as sementes que facilitam os programas de recuperação florestal local. Quinto, alguns dos pequenos fragmentos podem ainda conter espécies não encontradas nas demais ecorregiões. Finalmente, eles podem assumir importantes funções culturais, estéticas e educacionais (Cullen *et al.* 2001; Valladares-Padua *et al.* 2002).

As características fisionômicas dos fragmentos florestais, tais como tamanho, formato, distância entre fragmentos e tipo de áreas vizinhas, estão sendo consideradas de relevância em estudos de biodiversidade com fins de conservação e estratégias de manejo de espécies. Embora fragmentos menores que 100 hectares tenham se mostrado ineficazes para manter populações de grandes vertebrados, aves e certos tipos de plantas (Chiarello, 1999; Turner & Corlett, 1996), certos estudos em pequenas áreas revelaram a importância destas do ponto de vista da conservação de áreas naturais (Turner & Corlett, 1996). Muitos desses fragmentos servem para manter habitats naturais ou como locais de passagem de espécies migradoras (Turner & Corlett, 1996), como fornecedores de novos habitats para espécies generalistas (Telles *et al.*, 2003) ou estabelecendo e restaurando “corredores” de vegetação que servem para movimento de fauna entre fragmentos (Morellato & Haddad, 2000).

No que se refere à Mata Atlântica, como parte dos esforços para a sua conservação, e devido ao fato de ser considerada como a segunda floresta mais ameaçada do mundo (IUCN, 1991), este importante bioma foi reconhecido dentro do programa *Man and Biosphere* (MaB) da UNESCO (Costa, 1997). Entre as ações do governo brasileiro, se encontram vigentes leis e decretos federais que estabelecem a proteção em forma total das florestas da Mata Atlântica atuais e a manutenção obrigatória de cobertura vegetal natural ou seu reflorestamento por meio do Decreto-Lei no. 750/93. Aliado a isto, o Código Florestal Brasileiro também protege os topos de

morro e obriga a averbação e manutenção de uma reserva florestal legal de pelo menos 20% da área da propriedade por meio da Lei no. 4771/65, com as alterações feitas pela Lei no. 7.803/89.

Por outro lado, é de se esperar que a fragmentação que sofreu a Mata Atlântica brasileira ao longo dos anos interfira de alguma maneira nas variações tanto de distribuição geográfica como genéticas de muitas populações animais e vegetais que nela residem. As variações em animais que têm a função ecológica como polinizadores influí diretamente no êxito reprodutivo e fluxo gênico de muitas plantas tanto de importância econômica como nativas (Castro, 2002). A manutenção da biodiversidade destes potenciais polinizadores nos agroecossistemas, torna-se indispensável para a sustentabilidade de cultivos que dependem deles. De maior relevância ainda é a conservação destes agentes em florestas tropicais, já que quase todas as espécies de árvores nelas existentes são polinizadas por animais, que na sua grande maioria (até 80%) corresponde às abelhas (Apoidea), as quais contribuem na fertilização e produção de sementes de árvores tropicais em todo o mundo (Degen & Roubik, 2004). Neste contexto, as abelhas desempenham um papel fundamental na transferência de pólen. Tonhasca *et al.* (2003) menciona a interação das abelhas Euglossina com plantas de aproximadamente 30 famílias, algumas de importância econômica e, aproximadamente 650 espécies de orquídeas que dependem destas abelhas como polinizadores (Dodson *et al.*, 1969; Dressler, 1968, 1982; Ackerman, 1983).

1.2 As abelhas Euglossinas e a espécie *Eulaema nigrata*

As abelhas da subtribo Euglossina são conhecidas popularmente como “abelhas das orquídeas” pelo hábito dos machos de visitar com frequência, mas não de forma

exclusiva, flores da família Orchidaceae na procura de essências aromáticas (Dressler, 1982; Ackerman, 1983; Brito & Rêgo, 2001; Roubik & Hanson, 2004). Este comportamento não se encontra ainda totalmente elucidado, embora haja sugestões de que o mesmo esteja relacionado à função reprodutiva destas abelhas (Williams, 1982; Williams & Whitthen, 1983; Eltz *et al.*, 1999; Cameron, 2004). Tal hábito de visita floral característico envolve, em alguns casos, relações muito específicas (Dressler, 1968), que fazem delas importantes agentes polinizadores de diversas famílias de Angiospermas nas florestas neotropicais (Williams & Dodson, 1972; Braga, 1976; Cameron, 2004), levando até a existência de mecanismos de isolamento entre espécies vegetais (Dodson, 1966).

Algumas das características morfológicas mediante as quais podem ser identificadas a maioria das espécies euglossinas são sua robustez, as cores chamativas - pretas e amarelas ou verdes, violetas e douradas metálicas - e também a presença de uma língua muito longa em relação a outras abelhas da tribo Apini, que em repouso atinge pelo menos a base do metassoma (Kymsey, 1987; Silveira *et al.*, 2002).

Devido às suas relações particulares com plantas de diversas famílias, suas cores chamativas, bem como o comportamento particular dos machos e suas modificações estruturais, estas abelhas são consideradas muito interessantes para estudos dentro da fauna tropical (Rebêlo, 2001). Apesar do interesse existente neste grupo de insetos, o fato de serem abelhas muito ariscas, de vôo rápido e difíceis de serem observadas, as abelhas euglossinas começaram a ser mais estudadas e conhecidas a partir da década de 1960, quando da descoberta de que os machos eram atraídos por essências aromáticas artificiais como cineol, eugenol, vanilina, salicilato de metila, escatol, entre outras (Braga, 1976; Powell & Powell, 1987; Becker *et al.*, 1991; Rebêlo, 2001).

A sistemática e relações deste grupo ainda não se encontram completamente estabelecidas (Rebêlo, 2001; Roubik & Hanson, 2004). Segundo Silveira *et al.*, 2002, a subtribo Euglossina pertence à família Apidae, subfamília Apinae, tribo Apini. Esta subtribo inclui aproximadamente 200 espécies, distribuídas em 5 gêneros: *Eulaema*, *Euglossa*, *Eufriesea*, *Exaerete* e *Aglae*, estes dois últimos, com todas suas espécies parasitas dos ninhos dos outros gêneros (Dressler, 1982; Cameron, 2004). Recentemente, Michel-Salzat *et al.* (2004) realizaram um estudo com base em marcadores moleculares e caracteres morfológicos para as análises das relações filogenéticas do grupo.

A ocorrência das abelhas Euglossina é inteiramente neotropical, com uma faixa de distribuição que se estende desde o norte de México até Paraguai e Argentina, contendo maior número de representantes, que compreendem até 25% da diversidade local, dentro das florestas tropicais úmidas (Dressler, 1982; Roubik & Hanson, 2004). Embora primariamente restritas à América tropical, algumas espécies euglossinas ampliaram sua distribuição geográfica, chegando a compreender até 25% da diversidade local em algumas florestas de planície (Roubik & Hanson, 2004). Segundo Ramírez *et al.* (2002), aproximadamente 25% das espécies euglossinas apresentam distribuições atravessando os Andes. Em 1996, Minckley e Reyes publicaram um estudo no qual relatam a ocorrência destas abelhas também para territórios no sul dos Estados Unidos. Mais recentemente, marcadores mitocondriais foram utilizados para investigar a estrutura filogeográfica das abelhas euglossinas ao longo de sua distribuição neotropical (Dick *et al.*, 2004).

Outra característica importante que pode ser atribuída a algumas espécies euglossinas é a grande capacidade de vôo destas abelhas, especialmente no que se refere às espécies de maior porte, as quais são capazes de voar mais de 20 km em floresta

contínua (Janzen, 1971). Contudo, sobre áreas abertas e corpos d'água, a exemplo de lagos, a capacidade de vôo das euglossinas parece ser mais limitada. Dressler (1982) menciona que, em tais casos, as euglossinas de grande porte (gêneros *Eulaema*, *Eufriesea*), diferentemente das espécies de pequeno porte (*Euglossa*), são capazes de transpor distâncias de até 2,5 km. Powell & Powell (1987) atribuem o declínio no número de abelhas em fragmentos florestais ao fato de tais abelhas não conseguirem sobrevoar áreas desmatadas. Segundo estes autores, algumas espécies mostram-se incapazes de atravessar áreas abertas de apenas umas poucas dezenas de metros entre dois fragmentos de mata. Porém, Tonhasca *et al.* (2003) sugerem o contrário, já que encontraram maior quantidade de espécies em movimento nas regiões abertas que dentro da mata e as variações no terreno não afetaram a habilidade das abelhas de acharem a fonte de fragrâncias, se deslocando entre fragmentos de floresta ainda pequenos. Resultados similares foram obtidos por Raw (1989), que observou que determinadas espécies euglossinas foram capazes de transpor distâncias de até 4 km entre fragmentos de remanescentes de Mata Atlântica. Em um outro estudo, Murren (2002) observou que machos de *Eulaema cingulata* foram capazes de se deslocar entre dois sítios de amostragem localizados no continente e em uma ilha distante 500 metros deste.

As euglossinas foram consideradas por Powell & Powell (1987) como um material adequado para estudos de dinâmica de populações em fragmentos florestais. Estudos deste tipo com estas abelhas indicaram um efeito negativo em populações de Euglossina, diminuindo fortemente o número de indivíduos em fragmentos monitorados pré e pós-isolamento (Powell & Powell, 1987; Morato, 1994). De modo análogo, Sofia & Suzuki (2004) relataram uma diminuição na abundância destas abelhas de acordo

com a redução no tamanho de fragmentos florestais no norte do estado de Paraná, sul do Brasil.

De fato, diversas características das euglossinas tornam estes insetos adequados para estudos de dinâmica de populações em fragmentos florestais, entre as quais incluem-se a facilidade de atração de machos à iscas-odores, a destacada capacidade de vôo destas abelhas (Janzen, 1971), a possibilidade de coleta de um grande número de machos sem que isto produza maiores impactos sobre a comunidade (Becker *et al.*, 1991).

Apesar deste grupo de abelhas apresentar características favoráveis para pesquisas em áreas fragmentadas, existem ainda muito poucos estudos de euglossinas em remanescentes de floresta do Estado de Paraná (Sofia & Suzuki, 2004). No que se refere a remanescentes de floresta estacional semidecídua no norte do Paraná, os primeiros estudos sobre as comunidades de Euglossina e estrutura genética de algumas espécies do grupo foram realizados recentemente (Santos & Sofia 2002a, b; Paula, 2003; Sofia *et al.*, 2004, 2005; Sofia & Suzuki, 2004).

Entre as euglossinas, as abelhas do gênero *Eulaema* podem ser reconhecidas pela maior robustez dentro do grupo (cerca de 18 mm), por apresentarem predominantemente coloração preta escura, marrom ou amarela, sem cores metálicas, e uma pilosidade maior que a maioria das outras espécies de euglossinas (Nemésio, 2002; Silveira *et al.*, 2002; Roubik & Hanson, 2004). Este gênero, pequeno em número de espécies quando comparado com os outros do grupo, é composto por 16 espécies subdivididas em dois subgêneros: *Eulaema* e *Apeulaema* (Rebêlo, 2001).

Eulaema nigrita Lepeletier, 1841, uma das espécies do subgênero *Apeulaema*, é considerada uma abelha que exibe comportamentos do tipo solitário (Waldschmidt *et al.*, 2005) ou, mais comumente, do tipo comunal (Zucchi *et al.*, 1969; Santos &

Garófalo, 1994), considerado uma das formas mais simples de organização social. Neste tipo de organização social, algumas fêmeas compartilham um mesmo ninho, onde estas produzem seus descendentes, sem que haja uma divisão reprodutiva de trabalho e sobreposição de diferentes gerações (Michener, 1974). Os ninhos de *E. nigrita* são normalmente construídos em cavidades no solo, em árvores, barrancos e blocos de cimento (Nemésio, 2004), nos quais os principais materiais utilizados consistem em lama ou fezes de vertebrados, juntamente com alguma resina (Dressler, 1982). As células estão dispostas de forma irregular, que depende em parte do espaço disponível (Dressler, 1982). Esta espécie apresenta uma distribuição muito ampla, sendo encontrada desde a Costa Rica, na América Central, até o norte da Argentina (Dressler, 1982; Pearson & Dressler, 1985), habitando desde terras baixas até cerca de 2600 m de altura (Roubik & Hanson, 2004). Dentro de sua distribuição, a Mata Atlântica toda é uma ecorregião de ocorrência natural destas abelhas. É a espécie dominante na comunidade de Euglossina em grande parte dos levantamentos em fragmentos de Mata Atlântica (Nemésio, 2004). Segundo este autor, do ponto de vista conservacionista, uma maior compreensão da ecologia de *Eulaema nigrita* é particularmente importante, pois esta espécie pode ser bioindicadora de ambientes abertos e/ou perturbados (Peruquetti *et al.*, 1999).

Segundo alguns autores, *Eulaema nigrita* possui uma alta capacidade de vôo, ocorrendo de forma abundante em habitats alterados ou então associadas à vegetações mais abertas, como o sertão ou a mata semidecídua (Raw, 1989; Roubik, 1993; Rebêlo & Garófalo, 1991; Morato *et al.*, 1992; Peruquetti *et al.*, 1999; Rebêlo, 2001). Estudos recentes mostram que *Eulaema nigrita* parece evitar o interior de remanescentes maiores e melhor preservados de Floresta Atlântica (Tonhasca *et al.*, 2002; Nemésio, 2004). Embora bastante freqüente em fragmentos de matas remanescentes de Floresta

Atlântica, esta espécie mostra uma baixa frequência em fragmentos de Floresta Amazônica (Nemésio & Silveira, 2006).

Em uma série de estudos realizados com *Eulaema nigrita* foram analisados diferentes aspectos da biologia destas abelhas (Zucchi *et al.*, 1969; Pereira-Martins, 1991; Pereira-Martins & Kerr, 1991a e b; Santos & Garófalo, 1994; Ospina-Torres, 1998). Recentemente, Dick *et al.* (2004), com base em informações obtidas em análises mitocondriais do gene da citocromo oxidase I (COI) de 14 espécies de abelhas euglossinas, incluindo *Eulaema nigrita*, apresentaram evidências de um elevado fluxo gênico e indícios de uma possível dispersão destas espécies através dos Andes. Waldschmidt *et al.* (2005), utilizando marcadores moleculares RAPD concluíram que os tamanhos dos fragmentos florestais de mata Atlântica (de 8,6 ha até aproximadamente 60 ha) não tiveram nenhum efeito sobre a variabilidade das populações de *Eulaema nigrita* estudadas.

1.3 Conservação, Diversidade Genética e Marcadores Moleculares

A biodiversidade pode ser definida em seu amplo sentido como a “variabilidade da vida” (composição, estrutura e função) e envolve diferentes níveis biológicos: desde genes a comunidades, em todas as escalas espaços-temporais (Savard *et al.*, 2000).

A preservação e/ou conservação da biodiversidade tem se tornado uma prioridade no mundo inteiro, já que foi compreendido que existe uma rede contínua de interações, de modo que a perda de qualquer espécie leva subsequente a variações no *status* de outras espécies que se encontram relacionadas com ela, até o ponto de poder prejudicar a todo o complexo de relações existentes em um ecossistema, podendo

às vezes atingir inclusive ecossistemas adjacentes (Savard *et al.*, 2000, Sih *et al.*, 2000, Di Bitteti *et al.*, 2003).

A conservação de espécies se tornou um grande desafio, na atualidade, na maioria dos diferentes locais do nosso planeta, tendo em vista que uma das principais causas das extinções biológicas atuais é consequência das atividades humanas: a perda de hábitat natural por desmatamento, urbanização, agricultura e pecuária, caça e pesca, entre outros (Sih *et al.*, 2000).

Segundo Di Bitteti *et al.* (2003), as estratégias para a manutenção da biodiversidade podem se basear nos seguintes princípios de conservação: a) conservação de grandes blocos de floresta nativa para suportar mudanças ambientais; b) manutenção de populações viáveis de todas as espécies nativas com a distribuição e abundância natural, e com a diversidade genética necessária para resistir aos desafios ambientais; c) manutenção de processos ecológicos vitais e fatores de seleção (regimes hidrológicos, ciclagem de nutrientes e interações bióticas); d) manutenção da representatividade de todas as comunidades biológicas e de seus diferentes estágios sucessionais, dentro da paisagem a ser conservada.

Para cumprir com estes objetivos é preciso conhecer as comunidades existentes nas áreas a proteger, bem como as espécies biológicas, tentando conhecer as relações existentes entre elas. Assim, a viabilidade da espécie a longo prazo, requer estudos precisos acerca da biologia geral da espécie, incluindo as características genéticas desta.

Entre as características genéticas de uma espécie, a variabilidade genética é tida como uma característica intrínseca fundamental, responsável pela manutenção da espécie a longo prazo. Ela é essencial para o potencial de sobrevivência dos organismos e para o sucesso na resposta a mudanças ambientais, e pode ser descrita como composta por três componentes principais (Lowe *et al.*, 2004): a) a diversidade genética, a

quantidade de variação genética que possui a espécie ou grupo de organismos; b) a diferenciação genética definida como a distribuição da variação genética entre populações; c) a distância genética que pode ser definida como a quantidade de variação genética que existe entre pares de populações.

Os fatores que afetam e influenciam a diversidade e diferenciação genética, são dados pelas características dos organismos e seu ambiente, e são os seguintes: o tamanho da população, o fluxo gênico, o sistema reprodutivo, a seleção natural e as características do genoma que influem no nível de ploidia, mutação, e ligação gênica (Lacadena, 1998).

Em populações pequenas e isoladas, a variabilidade genética pode ser substancialmente reduzida por meio da deriva genética e o endocruzamento, resultando na perda de alelos e polimorfismos, e declínio da heterozigosidade. Tais reduções podem resultar em um decréscimo da capacidade adaptativa e eventual extinção dessas populações (Ferguson *et al.*, 1995).

A perda desta variabilidade genética tem sido uma grande preocupação para os cientistas, já que muitas espécies estão declinando em número e concomitantemente perdendo sua diversidade genética (Guttman & Berg, 1998).

O fluxo gênico, por sua vez, é determinado pela mobilidade da espécie, a habilidade de dispersão de gametas e o grau de isolamento das populações, podendo ser o mesmo, físico, ecológico ou temporal. Em animais sociais, o padrão de movimento através dos machos pode provocar um impacto profundo na estrutura da diversidade genética da espécie (Lowe *et al.*, 2004).

As populações naturais geralmente não mantêm panmixia ou acasalamento completamente ao acaso, assim a probabilidade de reprodução de dois indivíduos não é sempre a mesma já que o processo de reprodução depende de fatores biológicos e

geográficos. Por exemplo, o acasalamento diferencial positivo, que acontece quando indivíduos do mesmo tipo se acasalam preferencialmente, não muda as frequências alélicas, mas varia a proporção de genótipos diferentes presentes na população (Lowe *et al.*, 2004).

A perda da capacidade adaptativa e da razão reprodutiva, ou da razão reprodutiva e da fecundidade, pode resultar em uma uniformidade genética. Portanto, com um conjunto gênico populacional reduzido e a perda da plasticidade genética, os indivíduos tornam-se incrivelmente suscetíveis a mudanças nas condições ambientais, tornando-as ainda mais suscetíveis à extinção (Guttman & Berg, 1998).

A ausência de panmixia pode também, provocar uma diferenciação (subdivisão) das populações em subpopulações, o que pode ser atribuído ao surgimento de mudanças no genótipo (devido a mutações), à diminuição da variabilidade de cada subpopulação pelo endocruzamento local e ao surgimento de divergência entre as subpopulações, causada pela seleção natural e deriva genética. Desta forma, populações diferenciadas vão apresentar um equilíbrio entre fatores de diferenciação (mutação, seleção natural direcional e disruptiva, e a deriva genética) e de homogeneização (seleção natural purificadora, migração), lembrando que a importância de cada um destes fatores vai variar de acordo com o tamanho populacional e com as diferenças ambientais ao longo da faixa de distribuição de cada espécie (Solé-Cava, 2001).

A diversidade genética dentro de uma população pode ser reduzida por meio de dois processos principais: seleção natural de características adaptativas ou deriva genética (Nielsen *et al.*, 1996). A seleção acontece quando genótipos particulares contribuem mais para a sobrevivência do que outros na resposta a estímulos ambientais. A redução na diversidade genética entre populações, normalmente, ocorre quando populações geneticamente distintas se extinguem ou quando a integridade é

comprometida pela hibridação (Ryman *et al.*, 1995). A deriva genética é o processo que consiste nas variações das frequências gênicas que acontecem em forma aleatória nas populações naturais. Este processo ocorre naturalmente em todas as populações consideradas finitas, e de acordo com o modelo de Wright-Fisher, apresenta sempre um efeito muito maior sobre as frequências alélicas de populações consideradas de tamanho efetivo pequeno (Hartl & Clark, 1997). Sempre e quando não sejam considerados os processos de migração e mutação, a deriva genética conduz a diminuição na distribuição das frequências gênicas das populações. Após várias gerações, o resultado final ocasionado por ação da deriva, sem outras forças intervindo, será a fixação de uma das variantes alélicas (presença completa ou ausência completa) presentes originalmente em cada população. A consequência disto seria a perda de variantes heterozigotos em relação as variantes homozigotos, que ao longo das gerações resultam na homogeneidade ou perda da diversidade genética (Hartl & Clark, 1997).

Segundo o conhecido modelo de Sewall Wright de isolamento por distância entre populações, os indivíduos geograficamente mais próximos tendem a ser geneticamente mais similares entre si do que aqueles separados por distâncias geográficas maiores (Wright, 1940 *apud* Wright, 1978), considerando que a probabilidade de fluxo gênico decresce com a distância espacial. Este modelo, originariamente desenvolvido para populações contínuas (Wright, 1940 *apud* Wright, 1978), posteriormente foi estendido para o modelo de 'ilhas' com populações separadas (Wright, 1943, Kimura & Weiss, 1963). Entretanto, mais recentemente tem sido mostrado que a relação entre distância espacial e genética é mais complexa do que uma simples função da probabilidade de fluxo gênico (Wolf *et al.*, 2004). Um pressuposto comum adotado na maioria dos modelos baseados no isolamento por distância é que as populações em questão teriam conseguido o equilíbrio entre deriva genética (a qual

conduz à diferenciação genética) e fluxo gênico (fator produtor de homogeneidade genética) (Whitlock & McCauley, 1999). Contudo, vários fatores podem levar a um desequilíbrio entre deriva genética e fluxo gênico, entre os quais incluem-se história recente de colonização, rápida expansão e ampla fragmentação (Wolf *et al.*, 2004).

Quando o desequilíbrio ocorre, medidas isoladas de diferenciação genética provavelmente irão fornecer informações equivocadas de fluxo gênico (Whitlock & McCauley, 1999). Por outro lado, segundo Wolf *et al.* (2004), por meio da análise da relação entre distância espacial e distância genética é possível fazer inferências sobre os efeitos do fluxo gênico e deriva genética na estrutura da população e descrever possíveis cenários históricos para grupos de populações e áreas geográficas. Assim, com a deriva genética e fluxo gênico em equilíbrio, a distância genética deveria aumentar linearmente com a distância espacial. Contudo, se não existe equilíbrio entre deriva e fluxo gênico então esta relação não será evidente e o efeito relativo do fluxo gênico determinará a variação nos valores de distância genética. Um efeito mais forte da deriva genética resultará em uma ampla variação nos valores de distância genética ao longo das escalas espaciais, enquanto altas taxas de fluxo gênico irão restringir a distância genética a valores baixos, resultando em uma baixa variância desta. Ainda, uma outra possível alternativa seria a falta de equilíbrio com um fluxo gênico mais efetivo nas escalas espaciais menores e deriva mais efetiva nas distâncias geográficas maiores (Wolf *et al.*, 2004).

A análise da diversidade genética em estudos de conservação é de grande relevância, uma vez que destes dependerá o tipo de estratégia a ser utilizada para cada caso. Por exemplo, se a população de uma espécie suscetível, ocupa uma determinada área, e se apresenta diferenciada geneticamente, então a estratégia de conservação deveria procurar preservar a diversidade da espécie naquela área, pois já podem existir

adaptações locais que se perderiam no caso da população ser misturada com outras. Por outro lado, se as populações são homogêneas ao longo de toda área de ocorrência é viável concentrar a proteção da espécie em apenas uma área, usando indivíduos desta área para a re-colonização das outras áreas quando necessário (Haig, 1998).

Apesar da grande importância biológica das Euglossina como agentes polinizadores, até o presente ainda são poucos os estudos genéticos envolvendo tais abelhas (Peruquetti, 1999). Os primeiros estudos genéticos neste grupo envolveram as análises citogenéticas de *Eufriesea violacea* por Kerr (1952) e Tarelho (1973). Posteriormente, Pompolo *et al.* (1986) determinaram o número cromossômico de *Eulaema nigrita*, enquanto Gomes *et al.* (1998) determinaram o número cromossômico haplóide igual a 15 e 21 para *Eufriesea violacea* e *Euglossa townsendi*, respectivamente. Em 1997, Eltz e colaboradores publicaram um estudo no qual estudaram citogeneticamente duas espécies de *Euglossa* de Panamá.

Além destes estudos, Roubik *et al.* (1996) empregaram marcadores isoenzimáticos para o estudo de machos de Euglossina, descrevendo um elevado número de machos diplóides em algumas espécies de *Eulaema* e *Eufriesea*. Análises eletroforéticas semelhantes, realizadas com machos euglossinas provenientes da região sudeste do Brasil, não revelaram a ocorrência de diplóides em várias espécies (Del Lama *et al.*, 1998; Peruquetti, 1999).

Estudos genéticos de populações aplicados à conservação podem ser desenvolvidos mediante a aplicação das técnicas de marcadores moleculares. O objetivo de tais técnicas é revelar a variabilidade genética em nível de DNA, para detectar posteriormente diferenças entre indivíduos (Lowe *et al.*, 2004).

Existem muitos tipos de marcadores moleculares aplicados a pesquisas na área de genética ecológica. Estes podem ser: RFLP (*Restriction Fragment Length*

Polymorphism), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorphism*), PCR-RFLP, SSR (*Simple Sequence Repeat* ou microssatélites) e o seqüenciamento direto de DNA. O uso de cada um deles depende das características que apresentam, da disponibilidade e do tipo de estudo a realizar (Avisé, 2004).

A técnica de PCR, *Polimerase Chain Reaction* (Mullis & Fallona, 1987), se baseia na característica das enzimas polimerases de sintetizar moléculas de DNA, usando um molde de DNA de fita simples obtido partir de um DNA de dupla fita, utilizando oligonucleotídeos sintéticos como iniciadores (*primers*). Esta técnica trouxe um enorme impacto na biologia molecular, sendo subseqüentemente utilizada em diversas áreas da biologia, uma delas a área de biologia de populações e de conservação (Sunnucks, 2000).

Muitos trabalhos científicos que utilizam diretamente a técnica de PCR, ou também técnicas derivadas dela, têm sido publicados desde sua descrição. Estes trabalhos têm permitido avanços significativos tanto em áreas básicas como naquelas que buscam o entendimento de processos biológicos fundamentais, como em áreas aplicadas, dentre as quais figuram a identificação de genótipos, diagnóstico de doenças, estudos filogenéticos, de melhoramento e conservação, abrangendo todos os grupos de seres vivos (Goulão *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2003; Stow & Briscoe, 2005). A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade permitiram que esta técnica se tornasse uma poderosa ferramenta em estudos genéticos que envolvem uma grande quantidade de organismos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Entre as técnicas existentes modificadas da PCR, inclui-se a técnica de RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990), a qual consiste em amplificar fragmentos de DNA total do genoma

estudado, por meio da reação de PCR. Em tal técnica são utilizadas seqüências nucleotídicas inespecíficas contendo cerca de 10 bases de comprimento, com uma predominância de conteúdo de bases GC (Clark & Lanigan, 1993). A técnica de RAPD vem sendo usada em estudos de grande variedade de organismos, apresentando as seguintes vantagens: fácil aplicação, produz resultados rapidamente, não envolve o uso de elementos radioativos, requer poucas quantidades de DNA molde, não necessita de conhecimento prévio do genoma do organismo e acessa muitos locos em cada amplificação (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Nadig *et al.*, 1998). No caso de espécies haplo-diplóides os marcadores RAPD segregaram da forma Mendeliana esperada (Hunt & Page, 1992). Segundo estes autores, a pequena quantidade de DNA necessária nas análises e a relativa simplicidade destes marcadores tornam os marcadores RAPD ideais para estudos envolvendo biologia de populações, mapeamento genético e genética comportamental de insetos.

Na última década, trabalhos com marcadores nucleares multilocos, como os de RAPD, têm sido usados amplamente para estudos em entomologia. Exemplos desses envolvem pesquisas de taxonomia em afídios, mariposas, e detecção de parasitóides; genética de populações de afídios, moscas e himenópteros parasitóides, estudos de relações de parentesco e mapeamento do genoma de *Apis mellifera* (Loxdale & Lushai, 1998, Bickel *et al.*, 2006).

Uma grande limitação observada, contudo, na técnica de PCR-RAPD é que a mesma apresenta muita susceptibilidade à contaminação (interferência) por DNA não alvo, sendo também considerada de baixa reprodutibilidade quando comparada com outros marcadores (Sunnucks, 2000; Lowe *et al.*, 2004). Além disto, esta técnica apresenta outras desvantagens, entre as quais pode-se citar o fato de indivíduos homozigotos dominantes não poderem ser diferenciados dos heterozigotos, já que os

marcadores RAPD são do tipo dominante (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Lowe *et al.*, 2004).

No caso de abelhas, os quais são insetos que apresentam um sistema de diferenciação sexual haplo-diplóide, com as fêmeas diplóides e os machos haplóides (Unruh & Messing, 1993), quando os marcadores RAPD são aplicados em análises de machos, cada alelo pode ser evidenciado na frequência presente na população, sem os efeitos da dominância.

De um modo geral, níveis menores de variação genética têm sido atribuídos a insetos exibindo um mecanismo haplo-diplóide de diferenciação sexual (Crespi, 1991; Shoemaker *et al.* 1992; Packer & Owen, 2001), em comparação a organismos diplo-diplóides. Várias explicações para este fato têm sido propostas. Algumas destas explicações se baseiam nas propriedades intrínsecas da haplo-diploidia, as quais incluem uma maior seleção devido à expressão de alelos deletérios nos indivíduos hemizigotos (machos) (Unruh & Messing, 1993), um aumento da deriva genética em virtude de uma redução nos tamanhos efetivos nas populações associada com a haploidia dos machos e taxas menores de recombinação (Pamilo & Crozier, 1981). Outras explicações se baseiam nas consequências da eussocialidade sobre as populações de insetos exibindo este tipo de organização social; entre os fatores relacionados a eussocialidade envolvidos pode-se citar: os sistemas de acasalamento dos insetos eussociais (ex. *Apis mellifera*) que diminuem a diversidade genética por meio de endocruzamento (Berkelhamer, 1983) ou, pelo menor tamanho efetivo das populações devido à presença de castas não-reprodutivas (ex. operárias), ou de machos diplóides estéreis (Zayed *et al.*, 2003), o que acaba determinando um aumento no papel da deriva genética (Graur, 1985) sobre as populações. A maior parte da discussão sobre haplodiploidia e variação genética tem sido feita com base em marcadores moleculares

isoenzimáticos (Crespi, 1991; Shoemaker *et al.*, 1993; Unruh & Messing, 1993; Packer & Owen, 2001; Zayed *et al.*, 2003), uma vez que até o momento ainda são poucos os estudos envolvendo outros marcadores moleculares para uma investigação mais aprofundada desta questão.

Nos últimos anos os marcadores moleculares têm sido usados também para investigar a variabilidade genética em populações de diferentes organismos ameaçados de extinção (Ikeda & Taniguchi, 2002; Garner *et al.*, 2005). A variabilidade genética de uma população pode ser estimada a partir das variações de polimorfismos nos fragmentos de RAPD entre indivíduos, e os dados obtidos comparados entre as diferentes populações de uma mesma espécie. A variabilidade e a estrutura genética de algumas espécies de Euglossina foram estudadas recentemente por meio de tais marcadores (Sofia *et al.*, 2005), comprovando a aplicabilidade desta técnica para este grupo de abelhas.

Segundo Clark & Lanigan (1993), para dados obtidos a partir de organismos ou tecidos haplóides, os fragmentos gerados pela técnica de RAPD podem ser tratados de forma bastante similar aos dados produzidos pela técnica de RFLP. Além disto, análises da estrutura populacional com base em fragmentos de RAPD a partir de material haplóide têm produzido resultados menos distorcidos do que as análises produzidas com material diplóide (Isabel *et al.*, 1999). Neste contexto e, considerando ainda que machos de abelhas representam amostras bastante adequadas para estimar freqüências alélicas e tamanhos efetivos de populações (Kraus *et al.*, 2003), a utilização de machos euglossinas na avaliação da diversidade genética das populações de espécies deste grupo de abelhas torna-se bastante pertinente.

Considerando-se a importância das abelhas Euglossina como bioindicadores nos estudos de perturbação da vegetação (Raw, 1989; Morato, 1994), do seu papel como

agentes polinizadores (Janzen, 1971; Dressler, 1982) e também, do ponto de vista evolutivo, no que se refere aos níveis de organização social que apresentam (Zucchi *et al.* 1969), ressalta-se seu alto valor biológico.

Apesar do reconhecido valor deste grupo de insetos, ainda são escassas as informações sobre estas abelhas em fragmentos florestais mantidos como reservas legais em propriedades particulares. Além disso, os poucos estudos genéticos disponíveis na literatura envolvendo populações de abelhas Euglossina, ou ainda em fragmentos florestais de Mata Atlântica, levam a considerar que tais estudos populacionais podem auxiliar na implantação de ações de conservação da biodiversidade desta região, ou mesmo para a implementação de manejo e/ou recuperação de áreas naturais, privadas ou governamentais, para a região considerada neste estudo.

Considerando o exposto acima, bem como a importância das reservas legais como possíveis reservatórios de biodiversidade, a realização de estudos que propiciem um maior conhecimento sobre as populações de abelhas euglossinas nestas reservas torna-se muito valiosa. Diante disto, o presente estudo propõe-se a investigar a diversidade genética de populações de *Eulaema nigrita* em relação a reservas legais de tamanhos diferentes, situadas na Mata Atlântica da região norte do Paraná, utilizando como ferramenta a técnica de marcadores moleculares RAPD.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estimar, por meio do uso da técnica de RAPD, a diversidade genética de populações de *Eulaema nigrita* (Hymenoptera: Apidae) em fragmentos florestais privados, de tamanhos diferentes, mantidos na forma de reservas legais, visando obter informações que possam subsidiar um manejo mais efetivo de tais áreas, bem como a preservação de espécies de Euglossina de remanescentes da Floresta Estacional Semidecídua.

2.2 Objetivos Específicos

1 – Otimizar a técnica de extração de DNA de machos de abelhas Euglossina no que se refere à melhor parte do corpo do inseto para a obtenção de DNA genômico livre de possíveis contaminantes exógenos;

2- Estimar e comparar por meio de marcadores moleculares RAPD, a variabilidade genética de populações de *Eulaema nigrita* presentes em áreas mantidas na forma de reservas legais de tamanhos diferentes, e de uma reserva governamental (Parque Estadual “Mata dos Godoy”), no norte do Estado do Paraná;

3 – Com base em marcadores moleculares RAPD, obter informações e analisar comparativamente a estrutura genética de populações de *Eulaema nigrita* presentes em reservas legais, com a população desta mesma espécie presente em uma reserva governamental (Parque Estadual “Mata dos Godoy”) da mesma região do Paraná.

ARTIGO 1

EVALUATION OF THE RAPD PROFILES FROM DIFFERENT BODY PARTS OF *Euglossa pleosticta* MALES BEES (APIDAE, EUGLOSSINA)

(Trabalho a ser submetido à revista *Neotropical Entomology*, Sociedade Entomológica do Brasil).

Author for Correspondence:
Silvia Helena Sofia
Departamento de Biologia Geral
Centro de Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Londrina
C.P. 6001 – CEP: 86051-990
Londrina – Paraná – Brasil
Tel: (55) 43 33714437
shsofia@uel.br

Evaluation of the RAPD Profiles from Different Body Parts of *Euglossa pleosticta*

Male Bees (Apidae, Euglossina)

AMÁLIA N. T. PASCUAL¹, KAREN M. SUZUKI¹, FERNANDA S. ALMEIDA¹, LEDA M. K.
SODRÉ¹ AND SILVIA H. SOFIA¹

¹*Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, 6001,
86051-990, Londrina, PR; e-mail: shsofia@uel.br*

3. Avaliação dos Perfis de RAPD de Diferentes Partes do Corpo de Machos de Abelhas *Euglossa pleosticta* (Apidae, Euglossina)

3.1 RESUMO - Na literatura atual ainda são escassas as informações sobre qual a parte do corpo do inseto adulto é mais adequada para a extração de DNA genômico para estudos de análises genéticas baseadas em marcadores de DNA. Neste estudo nós analisamos os perfis de RAPD produzidos a partir da amplificação do DNA genômico extraído de partes distintas do corpo (cabeça, pernas, tórax + asas e abdômen) de 12 machos de *Euglossa pleosticta* Dressler, 1982, uma espécie de abelhas euglossinas. Do total de bandas analisadas, 9,03 % não mostraram repetibilidade. As porcentagens de variação de bandas obtidas de diferentes partes do corpo foram: 1,05 % (cabeça); 0,42 % (pernas); 0,84 % (tórax+asas) e 6,72 % (abdômen). A maior variação observada ($\chi^2_{\text{uma amostra}}=10,27$; gl=1; $P<0,01$), nos perfis eletroforéticos de RAPD, produzidos nas amplificações do DNA extraído do abdômen de machos euglossíneos sugere que esta parte do corpo de insetos adultos deve ser evitada em procedimentos de extração de DNA. De modo diverso, a baixa variação entre os perfis de RAPD obtidos a partir das amplificações de DNA genômico extraído da cabeça, pernas e tórax/asas das abelhas indicam que todas estas partes do corpo de machos euglossíneos são igualmente úteis e confiáveis para serem utilizadas para a extração e a amplificação do DNA genômico destes insetos.

PALAVRAS-CHAVE: Apoidea, Euglossina, abelhas das orquídeas, abelhas euglossinae, marcadores moleculares

3.2 ABSTRACT - In the current literature information is still scarce on which part of the adult insect body is suitable for isolation of the genomic DNA for genetic analysis based on DNA-markers. In this study we evaluated the RAPD profiles generated from total genomic DNA isolated from distinct body parts (head, legs, thorax + wings and abdomen) of 12 males of *Euglossa pleosticta*, a species of euglossine bees. From the total of bands analyzed, 9.03% did not show reproducibility. Percent variations of bands in each body segment were: 1.05% (head); 0.42% (legs); 0.84% (thorax/wings) and 6.72% (abdomen). The much higher variation ($\chi^2_{\text{one sample}}=10.27$; $df=1$; $P<0.01$) in RAPD profiles obtained by using DNA isolated from abdomen of the euglossine males suggests that this body part of adult insects should be avoid in DNA extraction procedures. Conversely, the low variation among RAPD profiles obtained from amplifications of genomic DNA extracted from head, legs and thorax/wings indicates that all these body parts of male bees are equally useful and secure for using in isolation and amplification procedures of total genomic DNA.

KEY WORDS: Apoidea, Euglossini, orchid bees, euglossine bees, molecular markers

3.3 Introduction

Recent advances in molecular technology have greatly increased the number of techniques used in genetic studies based on the total genomic DNA analysis. Many of these techniques have been widely employed in genetic analysis of a variety of adult insects (Carvalho & Vieira 2001, Keyghobady *et al.* 2005, Sofia *et al.* 2005, Watts *et al.* 2004). However, when total genomic DNA is extracted from adult insect body parts a worrying aspect of the genetic analysis can be the incidence of spurious DNA due, for instance, to the presence of commensal organisms associated with the material under study (Raboaum *et al.* 1999). In researches involving adult bees, or even adult insects in general, the most frequent sources of such DNA are pollen and microorganisms on integument of the insects.

Another emerging question when genetic analysis involves adult insects is which part of the insect body is suitable for isolation of the genomic DNA for obtaining confident DNA-markers. Actually, until this moment there is a gap in the literature concerning this question and, consequently, a wide variation in methods for DNA extraction of adult insects can be found, including DNA isolation from head (Harper *et al.* 2003), legs (Watts *et al.* 2004), wings or whole insect (Keyghobadi *et al.* 2005).

Among the most known techniques based on the analysis of the total genomic DNA is RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), which has been described as a simple and easy method of detecting polymorphism based on the amplification of random DNA segments with single primers of arbitrary nucleotide sequence (Williams *et al.* 1990). Because RAPD is a fast and technically simple method, requiring minimal amounts of DNA and no previous knowledge of the genome (Ayliffe *et al.* 1994, Williams *et al.* 1990), it has been used in many different biological approaches, such as mapping (Martin *et al.* 1991), identification of species or subspecies (Hillis *et al.* 1996),

parentage analysis (Hunt & Page 1992) and evaluation of anthropogenic stress in aquatic ecosystems (Bickham *et al.* 2000). In addition, RAPD markers are relatively inexpensive to produce and can be visualized and scored on simple agarose gels (Kjølner *et al.* 2004).

On the other hand, according to several authors the reproducibility between RAPD reactions can be hard to maintain (Ayliffe *et al.* 1994, Raboam *et al.* 1999) since small changes in reaction conditions, such as the type of DNA polymerase used, template DNA concentration, magnesium concentration and temperature-profiling characteristic of the thermocycler can produce changes in RAPD bands profiles (Pérez *et al.* 1998). Thus, possible solutions proposed to minimize problems in RAPD reproducibility include a careful optimization of the concentrations of components in the reaction mixture and of the amplification conditions of the thermal cycler, which should be consistently maintained throughout the study (Chiappero & Gardenal 2001).

In this context, our central aim was to investigate the occurrence of variations in RAPD profiles produced by amplification of total genomic DNA isolated from different body parts of adult male bees.

3.4 Material and Methods

Sample collections. Samplings were carried out, during March of 2004, at “Mata dos Godoy” State park, a remnant of Atlantic Rainforest located in Northern Paraná State, Southern Brazil. After being attracted to scent baits of eucalyptol, 12 males of *Euglossa pleosticta* Dressler, 1982 were collected with an insect net, placed individually in plastic tubes, transported alive to the laboratory and stored frozen (-20°C) until DNA extraction. All bees were identified by one of the authors (S.H. Sofia) and voucher specimens are deposited at the Zoology museum of Londrina State University (MZUEL).

DNA extraction and RAPD analysis. The following insect body parts were separated for subsequent RAPD analysis: a) head, b) six legs, c) thorax plus wings and d) abdomen. Prior DNA isolation, bees were submitted to two distinct pre-treatments, to remove exogenous material (e.g. fungal spores or grains of pollen) possibly attached to the bee integument, as follows: each body part of bees was rinsed individually in a sterilized plate with distilled water or 70% alcohol. The methodology of the total genomic DNA extraction used was based on Sofia *et al.* (2005). DNA concentration was determined in a fluorometer (200 DyNA Quant, Hoffer), using the dye Hoechst 33258, and then all DNA samples were diluted to a standard concentration (5ng/ μ l). All isolates were then stored at - 20°C.

The RAPD profiles were generated from total genomic DNA according to Sofia *et al.* (2005). Amplification reactions were carried out in a final volume of 15 μ L containing 15-25 ng of template DNA, 250 μ M dNTP (Pharmacia), 0.3 μ M of ten-nucleotide primer (Operon Technologies, Alameda, CA, USA), 4.0 mM MgCl₂ and 0.6 μ L (3 units) of DNA polymerase in the reaction buffer supplied. The following primers were used in the analysis: OPX-04, OPX-06, OPX-16 and OPAM-14. Control reactions were run containing all components except genomic DNA. DNA amplifications were carried out in a PTC-100, MJ Research thermal cycler and the amplification protocol consisted of 4 min denaturation at 92°C followed by 40 cycles of 40 at 92°C, 1.5 min at 40°C, and 2 min at 72°C, and a final cycle of 5 min at 72°C.

Samples of 15 μ L of the amplification products were separated by electrophoresis on 1.4% agarose gels with TBE buffer (0.89 mM Tris, 0.89 mM boric acid, 2 mM EDTA pH 8.3) diluted 1:20 (v:v), run at 3V.cm⁻¹, visualized with ethidium bromide staining and photographed under UV light with the Kodak Digital Science system (EDAS120).

Data Analysis. To test differences between the two pre-treatments, two groups of treatments were made. In the first, head and legs from the same bee were washed, individually, in distilled water, while thorax/wings and abdomen were washed, separately, with 70% alcohol. In the second group, these treatments were inverted, i.e., head and legs from the same bee were washed individually with alcohol 70%, while thorax/wings and abdomen were rinsed, independently, with distilled water. Comparative analyses were carried out by placing all samples on the same gel. Additionally, the samples (head, legs, thorax/wings and abdomen) from the same individual were placed side by side on the gel. RAPD marker profiles were determined by direct comparison of the amplified DNA electrophoretic profiles, and each sample was scored for the presence or absence of amplification products (binary variable).

The chi-squared test (2x2) was applied to compare the two pre-treatments (washing in alcohol or water). A one sample χ^2 test was employed to compare possible differences in RAPD profiles from different groups of body parts, as follows: 1) head; 2) legs; 3) thorax +wings and, 4) abdomen submitted to each pre-treatment. Values were considered different when $P < 0.05$ (Siegel 1981). The estimate of reproducibility among body samples isolated from the same bee (R_{xywz}) was calculated by dividing the number of bands common to all four segments (x, y, w, z) in the RAPD profile (n_{xywz}) by the average number of scored bands for all body parts, viz.: $R_{xywz} = 4n_{xywz} / (n_x + n_y + n_w + n_z)$, where n_x , n_y , n_w and n_z represent the number of RAPD bands in head, legs, wings+thorax and abdomen, respectively (Pérez et al. 1998). After calculation of the reproducibility index for each bee with each primer, a mean value of the reproducibility including the 12 individuals analyzed was estimated.

Finally, a pair-wise similarity matrix was constructed using the Jaccard (J) index (Sneath & Sokal 1973). On the basis of the J – values of the samples, the UPGMA

clustering method was followed, employing the NTSYS-PC package (Rohlf 1992) to generate a similarity dendrogram. To evaluate the robustness of the groupings formed the bootstrap analysis, with 1000 replications, was performed using the Bood software program (Coelho 2000). Sizes of DNA fragments were estimated by comparison with the standard Ladder 100 bp (Biotools), and by using the GEL software.

3.5 Results

The RAPD marker patterns were assessed in *Euglossa pleosticta* DNA extracted from different body parts of 12 males, totalling 48 samples. The greatest number of bands was found with primer OPX-06. The four primers used produced from 9 to 25 bands, which varied from 371 to 4053 bp (Table 1). Reproducibility of the results was tested with primer OPX-16 and no variation was found. The average reproducibility index estimated for each primer varied from 0.92 to 0.98 (Table 1), revealing a high similarity among the profiles for each body part from the same bee analyzed.

Figure 1 shows the RAPD profiles from 48 samples, amplified with primers OPX-4, OPX-16 OPAM-14 and OPX-6. In these profiles, it is possible to observe the high reproducibility among the four different body parts from each bee. Also, negative control from RAPD reactions amplified with the primer OPAM-14 produced some faint bands, which were mostly different from bands in amplified reactions (Fig. 1).

The comparative analysis of RAPD profiles revealed no significant difference ($\chi^2=2.44$, $df=1$; $p>0.05$) between the two pre-treatments (water or alcohol). Therefore, to reveal any differences between the RAPD profiles from the four different groups of body parts (head, legs, thorax + wings, abdomen), both pre-treatments were grouped and the profiles produced by each body part were compared for each bee individually.

From a total of 476 fragments analyzed, 9.03% (N = 43) did not show reproducibility (Table 2). Percentages of variation in the reproducibility for the different body segments were: 1.05% (head); 0.42% (legs); 0.84% (thorax/wings) and 6.72% (abdomen). Application of the χ^2 test (one sample) revealed significant differences among these occurrences of variations ($\chi^2=56.44$, $df=3$; $P<0.001$), indicating some variation in amplified products from the same individual.

The dendrogram of similarity obtained by applying the Jaccard index and the UPGMA method revealed that different parts from the same individual clustered together, showing coefficients ranging from 0.84 to 1.0 (Fig. 2). Besides, bootstrap values for the UPGMA tree were generally very high (> 95%) for the branches clustering different body parts of the same bee, reflecting a high robustness of these branches. The lowest value observed (0.84) occurred between the abdomen from individual 1 and the other body segments of this bee. However, for the majority of individuals analyzed, the values of similarity among the different body parts from the same bee were above 0.9, indicating the high reproducibility of RAPD technique. After clustering together, the four body parts from the same bee formed new clusters with other individuals. The similarity among individuals ranged from 0.60 to 0.81.

3.6 Discussion

Among the 43 occurrences that did not show complete reproducibility for (9.3%) were due to the presence of bands that were absent in other samples (Table 2), and 39 occurrences (90.7%) corresponded to absence of bands in one or two samples from the same individual.

Our results showed a high reproducibility of RAPD profiles produced by different body parts from the same bee (Fig. 1 and Table 2), suggesting that when optimization and standardization of RAPD technique are undertaken, reproducible profiles can be

satisfactorily achieved. The differences in repeatability shown by body segments ($\chi^2=56.44$, $df=3$; $P<0.001$) were possibly due to variations in abdomen profiles, since this body part showed a lower repeatability (6.72% of variation) than the other insect body segments. Besides, when variation in abdomen profiles ($N = 32$) was compared with the total number of variations shown by other body parts ($N = 11$), a significant difference was found ($\chi^2_{\text{one sample}}=10.27$, $df=1$; $P<0.01$). In part, the greater variation in abdomen profiles may be attributed to low reproducibility shown by the abdomen from individuals 1 and 4 (Table 2). In part, in both situations, DNA obtained from abdomen might be suffered damages during the isolation phase, since these samples showed several absences in RAPD products obtained with all four primers used in amplifications reactions (Table 2 and Fig. 1). Regardless of their feeding habits, all insects, possess a range of enzymes in the midgut, located in the abdomen of the insect, where digestion occurs (Chapman 1982). It has been observed that proteases exist in the gut of adult insects and show activity over a wide pH range (Walker *et al.* 1998). Thus, some of the variations in abdomen RAPD profiles may be attributed to the action of digestive enzymes (ex. esterase) on DNA during the extraction stage.

Rabouam *et al.* (1999) attributed artefactual RAPD polymorphism to the presence of commensal organisms and fragment rearrangements during PCR amplification. According to these authors, artefacts accounted for 50-75% of all the RAPD fragments obtained, and they concluded that it is impossible to estimate the degree of DNA polymorphism by RAPD studies. Our results suggest that the absence of reproducibility did not result from exogenous material, such as pollen or microorganisms in the gut of bees, since only in four cases additional bands were observed in RAPD profiles from the same individual (Table 2). In contrast to males of eusocial *Apis mellifera*, which after emergence stay inside the nest for several days (Winston 1987), most reports

indicate that euglossine males leave the nest promptly and do not return (Dodson 1966). During their adult life, euglossine males need only nectar supplies (Dodson 1966), which provide energy for their activities. For that reason, the presence of pollen in the digestive tract of euglossine males is very improbable.

The four additional bands produced in RAPD reactions with primers OPX-06 and OPAM-14 (Table 2), probably are artefacts, since such bands may arise from heteroduplex formation between amplified products (Ayliffe *et al.* 1994) or from other secondary artifacts (Hadrys *et al.* 1992). Also, the few faint bands observed in the negative control, amplified with primer OPAM-14 (Fig. 1) were attributed to heteroduplex molecules (Ayliffe *et al.* 1994). Such bands in the negative control have already been reported by other authors (Pérez *et al.* 1998; Williams *et al.* 1990).

Overall, the current results indicates that the much higher variation observed in abdomen profiles ($\chi^2_{\text{one sample}}=10.27$; $df=1$; $p<0.01$) suggests that this body segment of bees and probably other insects should be avoid in DNA extraction procedures. Conversely, the low variation among RAPD profiles obtained from amplifications of head, legs and thorax/wings indicates that all these body parts of male bees are equally useful and secure for using in isolation and amplification procedures of total genomic DNA.

Acknowledgments

The authors are grateful to IAP (Instituto Ambiental do Paraná) and IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente) for permission to collect male euglossine bees at Parque Estadual “Mata dos Godoy”. A.N.T. Pascual and K.M. Suzuki thanks to CAPES for providing the scholarship. This study was supported by grants provided by FBPN (Fundação O Boticário de Proteção à Natureza) and Fundação Araucária.

3.7 Literature Cited

- Ayliffe, M.A. G.J. Lawrence, J.G. Ellis & A.J. Prior. 1994.** Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. *Nucl. Acids Res.* 22:1632-1636.
- Bickham, J.W., S. Sandhu, P.D.N. Hebert, L. Chickhi & R. Athwal. 2000.** Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat. Res.* 463:33-51.
- Carvalho, A.O.R. & Vieira, L.G.E. 2001.** Determinação das condições ótimas para análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Neotrop. Entomol.*30: 593-600.
- Chapman, R.F. 1982.** Digestion and absorption. In: *The Insects: Structure and Function*, 3rd ed. London: Hodder and Stoughton Ltd. 66-83.
- Chiappero, M.B. & C. N. Gardenal. 2001.** Inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) markers and their use in population studies of *Calomys musculus* (Rodentia, Muridae), the reservoir of Argentine Hemorrhagic Fever. *Hereditas* 135: 85-93.
- Coelho, A.S.G. 2000.** BOOD: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Software. Goiânia, UFG.
- Dodson, C.H. 1966.** Ethology of some bees of the tribe Euglossini (Hymenoptera: Apidae). *J. Kans. Entomol. Soc.* 39:607-629.
- Hadrys, H., M. Balick & B. Schierwater. 1992.** Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* 1:55-63.

- Harper, G.L., N. McClean & D. Goulson. 2003.** Microsatellite markers to assess the influence of population size, isolation and demographic change in the genetic structure of the UK butterfly *Polyommatus bellargus*. *Mol. Ecol.* 12:3349-3357.
- Hillis, D.M., C. Moritz & B.K. Mable (eds). 1996.** *Molecular Systematics*, 2nd ed. Sunderland, Cumbria: Sinauer Associates, Inc.
- Hunt, G.J. & R.E. Page Jr. 1992.** Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. *Theor. Appl. Genet.* 85:15-20.
- Keyghobady, N., J. Roland & C. Strobeck. 2005.** Genetic differentiation and gene flow among populations of the alpine butterfly, *Parnassius smintheus*, vary with landscape connectivity. *Mol. Ecol.* 14:1897-1909.
- Kjølnner, S., S.M. Sâstad, P. Taberlet & C. Brochmann. 2004.** Amplified fragment length polymorphism versus random amplified polymorphic DNA markers: clonal diversity in *Saxifraga cernua*. *Mol. Ecol.* 13:81-86.
- Martin, G.B., J.G.K. Williams & S.D. Tanksley. 1991.** Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2336-2340.
- Pérez, T., J.A. Albornoz & A. Domênguez. 1998.** An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Mol. Ecol.* 7:1347-1357.
- Rabouam, C., A.M. Comes, V. Bretagnolle, J-F. Humbert, G. Periquet & Y. Bigot. 1999.** Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. *Mol. Ecol.* 8:493-503.
- Rohlf, F.J. 2000.** NTSYSpc, numeral taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, Applied Biostatistics, Setauket, New York.

- Siegel, S. 1981.** Estatística não-paramétrica: para as ciências do comportamento. São Paulo: Ed. McGraw-Hill do Brasil, Ltda.
- Sneath, P.H.A. & R.R. Sokal. 1973.** Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco, California: WH Freeman.
- Sofia, S.H. F.M. Paula, A.M. Santos, F.S. Almeida & L.M.K. Sodré. 2005.** Genetic structure analysis of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae) populations from southern Brazilian Atlantic Forest remnants Gen. Mol. Biol. 28:479-484.
- Walker, A.J., L. Ford, M.E.N. Majerus, I.E. Geoghegan, N. Birch, J.A. Gatehouse & A.M.R. Gatehouse. 1998.** Characterisation of the mid-gut digestive proteinase activity of the two-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.) and its sensitivity to proteinase inhibitors. Insect Biochem. Mol. Biol. 28:173-180.
- Watts, P.C. R. Rouquette, I.J. Saccheri, S.J. Kemp & D.J. Thompson. 2004.** Molecular and ecological evidence for small-scale isolation by distance in an endangered damselfly, *Coenagrion mercuriale*. Mol. Ecol. 13:2931-2945.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.L. Livak & S.V. Tingey. 1990.** DNA Polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18:6531-6535.
- Winston, M.L. 1987.** The biology of the honeybee. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.

Tables

Table 1. Nucleotides sequences from primers used in RAPD reactions, number of amplified fragments and range of fragment sizes produced by different primers and average reproducibility estimates.

Primer	Nucleotide sequence	Number of fragments	Range of fragment size (bp)	Reproducibility (R_{xyz})
OPX-04	5' CCGCTACCGA 3'	14	524 - 3370	0.95
OPX-06	5' ACGCCAGAGG 3'	25	371 - 4053	0.92
OPX-16	5' CTCTGTTCGG 3'	9	706 - 2366	0.98
OPAM-14	5' TGGTTGCGGA 3'	21	374 - 2806	0.94

Table 2. Features of the RAPD fragments produced by amplification of genomic DNA isolated from individual body parts of *Euglossa pleosticta* males that did not show reproducibility with other body parts.

Number of theBee	1 Fragment name	2 Body part	3 Size (bp) of RAPD fragment	4 Kind of variation	5 Treatment
1	B2-X06	Abdomen	3963	Absence	A
1	B7-X06	Abdomen	2566	Absence	A
1	B8-X06	Thorax	2501	Absence	A
1	B8-X06	Abdomen	2501	Absence	A
1	B11-X06	Abdomen	2023	Absence	A
1	B1-AM14	Abdomen	2806	Absence	A
1	B7-AM14	Abdomen	1696	Absence	A
1	B12-AM14	Abdomen	1075	Presence	A
2	B2-AM14	Abdomen	2427	Absence	A
2	B14-AM14	Leg	846	Absence	W
3	B1-X04	Abdomen	3370	Absence	A
3	B1-X06	Abdomen	4053	Absence	A
3	B2-X06	Abdomen	3963	Absence	A
3	B3-X06	Abdomen	3648	Absence	A
3	B11-X06	Abdomen	2023	Absence	A
3	B13-X06	Abdomen	1471	Absence	A
4	B2-X06	Abdomen	3963	Absence	A
4	B4-X06	Abdomen	3501	Absence	A
4	B5-X06	Abdomen	3282	Absence	A
4	B8-X06	Head	2501	Absence	W
4	B8-X06	Abdomen	2501	Absence	A
4	B16-X06	Head	1103	Absence	W
4	B1-AM14	Abdomen	2806	Absence	A
4	B14-AM14	Abdomen	846	Absence	A
4	B17-AM14	Abdomen	605	Absence	A
5	B2-X16	Head	2207	Absence	W
5	B2-X16	Abdomen	2207	Absence	A
5	B17-AM14	Thorax	605	Presence	A
5	B17-AM14	Abdomen	605	Presence	A
6	B5-X06	Head	3282	Absence	W
7	B9-X06	Thorax	2477	Absence	W
7	B20-X06	Leg	862	Absence	A
7	B20-X06	Abdomen	862	Absence	W
9	B7-X04	Thorax	1868	Absence	W
9	B13-AM14	Abdomen	977	Absence	W
9	B17-AM14	Abdomen	605	Absence	W
11	B6-X04	Abdomen	2438	Absence	W
11	B5-X06	Head	3282	Absence	A
11	B9-X06	Abdomen	2477	Presence	W
12	B6-AM14	Abdomen	1821	Absence	W
12	B7-AM14	Abdomen	1696	Absence	W
12	B15-AM14	Abdomen	769	Absence	W
12	B15-AM14	Abdomen	769	Absence	W

W = water; A = Alcohol; the number of bee corresponds to its position on the gel; fragment name is represented by number of band (ex. B15 = 15th band), showed in descending size, followed by the corresponding primer.

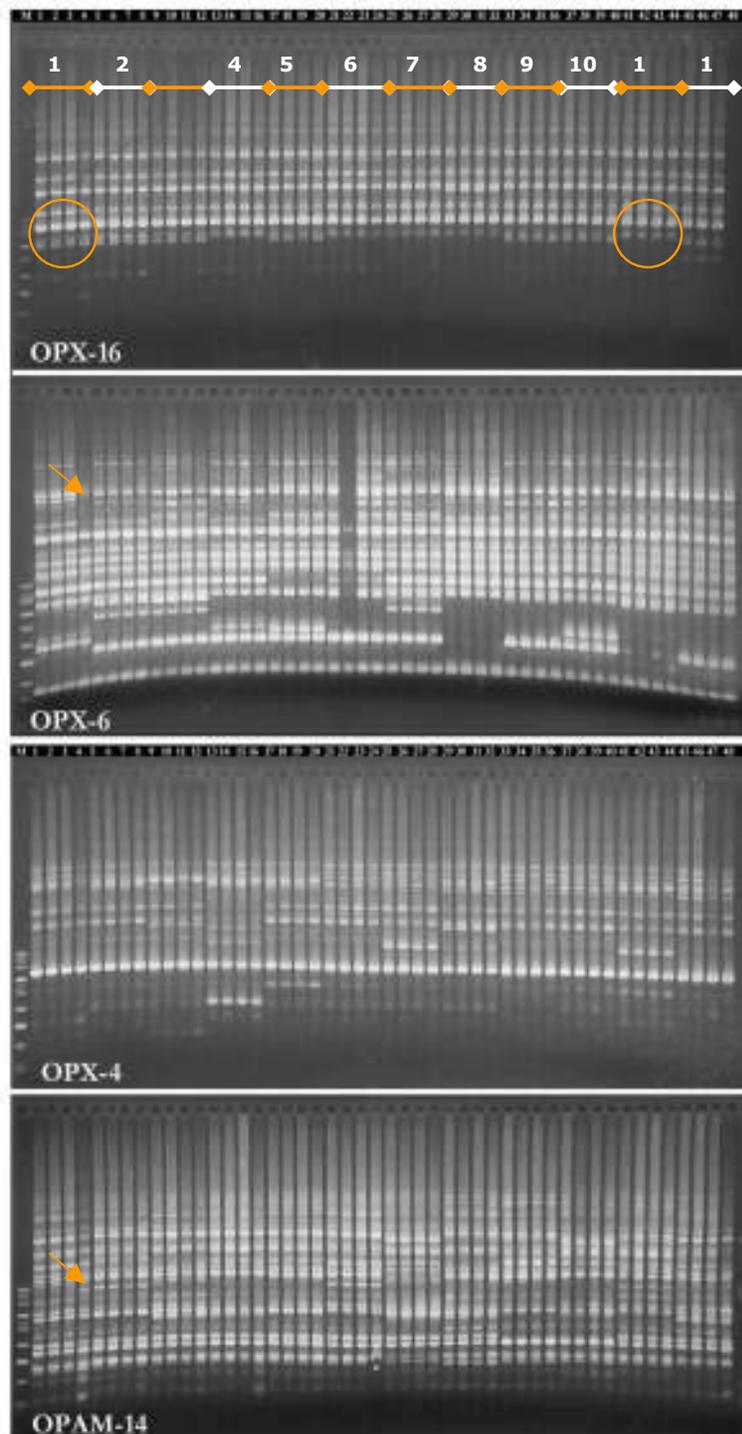


Figure 1. RAPD profiles of *Euglossa pleosticta* from different body segments, amplified with primers OPX-4, OPX-16 OPAM-14 and OPX-6. Line M = 100bp molecular weight marker. Samples of the same bee were arranged in the gel as follows: head, legs, thorax + wings and abdomen. Lines: 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18, 21, 22, 27, 28, 31, 32, 35, 36, 39, 40, 43, 44, 47, 48 = parts of bees washed with water. Lines: 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 23, 24, 25, 26, 29, 30, 33, 34, 37, 38, 41, 42, 45, 46 = parts of bees washed with alcohol. Last line = control. The arrows show examples of non reproducible bands and circles indicate examples of bands reproducibility in the same individual.

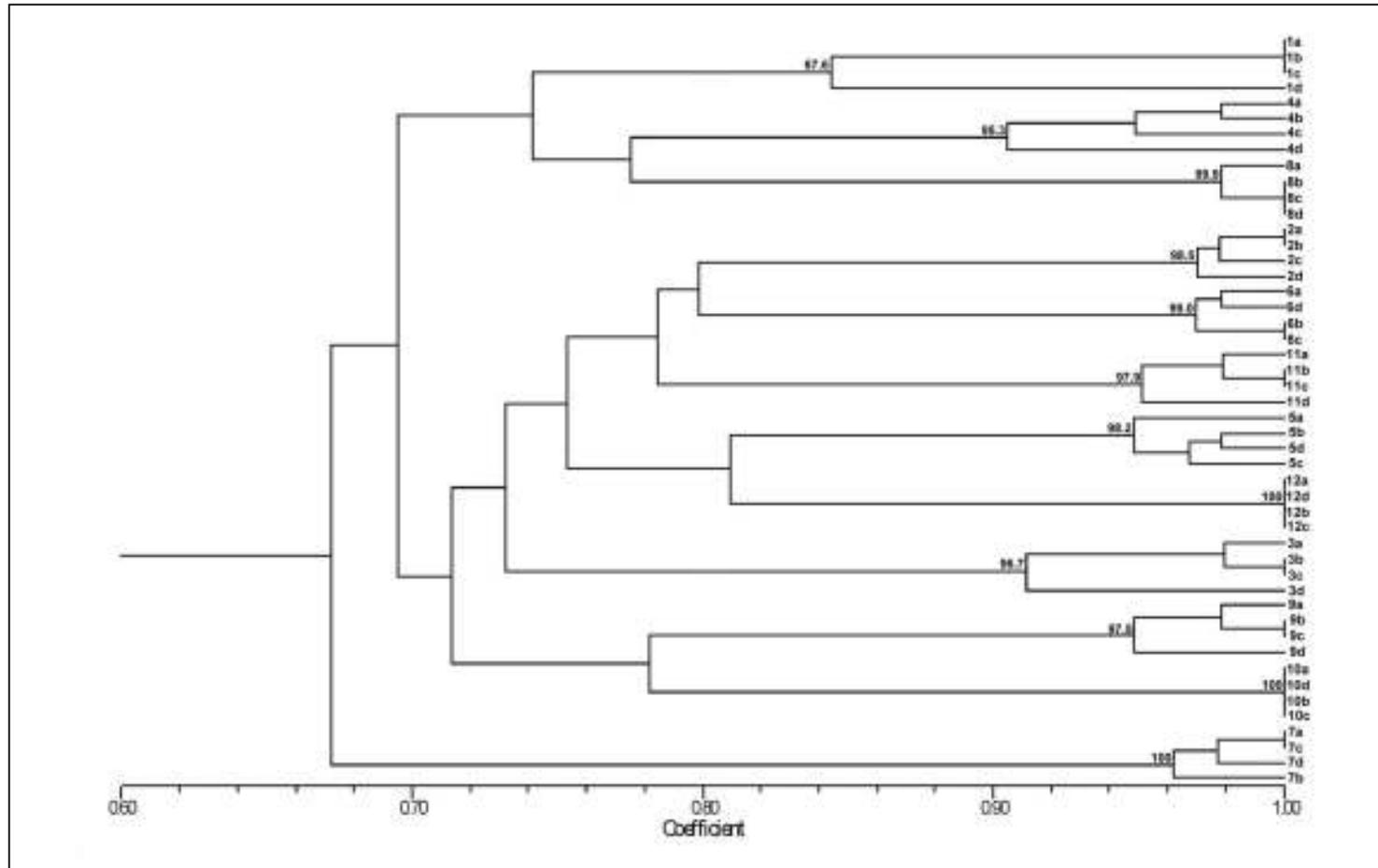


Figure 2. Dendrogram of genetic similarity constructed using the Jaccard coefficient and the UPGMA method for different body parts from 12 males of *Euglossa pleosticta*. Numbers from 1 to 12 represent each bee. a = head, b = legs, c = thorax + wings and d = abdomen.

ARTIGO 2**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Eulaema nigrita* (HYMENOPTERA,
APIDAE, EUGLOSSINA) EM REMANESCENTES DE MATA
ATLÂNTICA**

(Trabalho a ser submetido à revista *Biodiversity and Conservation*, Springer Netherlands).

**Diversidade Genética de *Eulaema nigríta* (Hymenoptera, Apidae, Euglossina) em
Remanescentes de Mata Atlântica**

Amalia N.T.Pascual¹, Natasha V. Meliciano¹, Karen M. Suzuki¹, Leda M. K. Sodré¹ and
Silvia H.Sofia^{1*}

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

*Author for correspondence: Silvia H. Sofia. Departamento de Biologia Geral,
Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, 86051-990, Londrina, PR,
Brazil. e-mail: shsofia@uel.br; phone: ++ (55) 43 33714437; fax (55) 43 33714207

Título resumido: Diversidade Genética de *Eulaema nigríta*

4.1 RESUMO

No presente estudo, marcadores RAPD foram usados na análise da diversidade genética de populações de *E. nigrita* de quatro fragmentos florestais, de tamanhos diferentes (entre 20 e 200 ha), em propriedades particulares, e uma reserva florestal governamental (680 ha) localizados na região norte do Paraná, sul do Brasil. As estimativas médias da proporção de locos polimórficos das cinco populações estudadas variaram de 53,61% (fragmento pequeno) a 60% (fragmento grande). Os valores dos testes θ_{p} e exato de Fisher não mostraram diferenças significativas para as várias análises comparativas realizadas, sugerindo ausência de diferenciação genética entre as populações. Corroborando ambas as estimativas, foram obtidos elevados valores de identidade genética de Nei (0,9754 – 0,9893) nas diferentes análises comparativas entre as populações das cinco áreas. Os resultados indicaram valores de Nm variando de 3,79 a 28,48, sugerindo um fluxo gênico entre as populações dos fragmentos analisados. As análises não mostraram qualquer relação ($P > 0,05$) entre os diferentes parâmetros genéticos estudados e as distâncias geográficas entre os fragmentos florestais. Os valores mais elevados de Nm (16,53, 27,84 e 28,48) podem estar refletindo possíveis eventos de extinção e colonização em três das populações estudadas. Os resultados indicam a ocorrência uma única população de *E. nigrita* na região estudada e a importância de se preservar fragmentos florestais de diversos tamanhos para a manutenção da diversidade genética desta espécie de abelhas euglossinas.

Palavras-chave: Apoidea, Euglossini, orchid bees, genetic diversity, RAPD markers

4.2 INTRODUÇÃO

A fragmentação e a perda de habitats estão entre os principais fatores responsáveis pela extinção de populações em todo o mundo (Wilcox e Murphy 1985). Durante a fragmentação das florestas o habitat original não só fica menor que a área total, como também as regiões remanescentes se tornam mais isoladas pelo uso diferencial da terra (Yahner e Mahan 2002). A perda de habitat traz conseqüências, tanto na distribuição geográfica como na composição genética das populações animais e vegetais, sendo, provavelmente, o primeiro fator que contribui com a extinção de espécies no mundo (Sih *et al.* 2000). Uma das principais conseqüências da fragmentação de florestas inclui a redução no tamanho das populações, que por sua vez pode resultar em uma diminuição nas variações genéticas intrapopulacionais e um possível comprometimento da capacidade adaptativa de tais populações (Guttman e Berg, 1998; Reed e Frankham, 2003).

Aizen e Feisinger (1994) mostram que em ambientes fragmentados as associações entre as plantas e seus polinizadores podem ser diretamente afetadas pelo declínio do número de polinizadores. A importância dos polinizadores na interação com as plantas, assim como os problemas atuais dos sistemas da polinização devido à redução dos habitats são bem ressaltados por Kearns *et al.* (2001).

As abelhas Euglossina estão entre os principais grupos de polinizadores de florestas neotropicais, onde atuam na polinização de aproximadamente 30 famílias de plantas (Dodson *et al.* 1969, Dressler 1982; Tonhasca *et al.* 2003). O grupo reúne cerca de 200 espécies de abelhas, muitas das quais são os polinizadores exclusivos de diversas espécies de orquídeas neotropicais (Ackerman 1983). Embora sejam estas abelhas com uma reconhecida capacidade de vôo, especialmente as espécies dos gêneros *Eulaema* e *Eufriesea* (Janzen 1971; Dressler 1982), não se encontra bem esclarecido até o

momento se a capacidade de deslocamento das euglossinas envolve unicamente a transposição de áreas de mata contínua ou também a transposição de áreas abertas (Powell e Powell 1987; Raw 1989; Tonhasca et al. 2003).

Nesse grupo de abelhas, *Eulaema nigrita* Lepeletier, 1841 é uma espécie de grande porte (Nemésio 2002; Silveira et al. 2002; Roubik e Hanson 2004), que apresenta aparentemente uma elevada capacidade de dispersão (Waldschmidt et al. 2005). Estudos mostram que *E. nigrita* é uma das espécies dominantes na comunidade de Euglossina em grande parte dos levantamentos realizados em remanescentes de Mata Atlântica (Nemésio 2004), sendo normalmente encontrada em áreas abertas e bordas de florestas (Waldschmidt et al. 2005). Em termos conservacionistas, uma maior compreensão da ecologia desta espécie torna-se de particular importância, tendo em vista que esta pode ser uma espécie bioindicadora de ambientes abertos e/ou perturbados (Peruquetti et al. 1999; Nemésio 2004).

Na região Neotropical, a Mata Atlântica, considerada a segunda maior formação de floresta tropical da América do Sul, reconhecida por sua alta biodiversidade e endemismos (Tonhasca et al. 2003), encontra-se atualmente com apenas cerca de 7,4% de sua superfície original, sendo a maior parte deste valor representada por um enorme número de fragmentos florestais de tamanhos variados, formando uma paisagem descontínua (Morellato e Haddad 2000; Di Bitteti et al. 2003).

Apesar da importância das abelhas euglossinas como agentes polinizadores da flora neotropical ainda são escassos os estudos investigando o possível efeito da fragmentação sobre a diversidade genética de populações destas abelhas em remanescentes de Mata Atlântica (Sofia et al. 2005; Waldschmidt et al. 2005).

Na última década, os marcadores RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) têm sido frequentemente usados em estudos de conservação de uma variedade

de organismos (Kimberling et al. 1996; Cooper 2000; Mattner et al. 2002; Torres et al. 2003; Mäki-Petäys et al. 2005; Bickel et al. 2006). Além disto, análises da estrutura populacional com base em fragmentos de RAPD a partir de material haplóide têm produzido resultados menos distorcidos do que as análises produzidas com material diplóide (Isabel *et al.*, 1999). Segundo Clark & Lanigan (1993), para dados obtidos a partir de organismos ou tecidos haplóides, os fragmentos gerados pela técnica de RAPD podem ser tratados de forma bastante similar aos dados produzidos pela técnica de RFLP.

Neste contexto e, considerando ainda que machos de abelhas representam amostras bastante adequadas para estimar frequências alélicas e tamanhos efetivos de populações (Kraus *et al.*, 2003), a utilização de machos euglossinas na avaliação da diversidade genética das populações de espécies deste grupo de abelhas torna-se bastante pertinente.

No presente estudo a técnica de RAPD, a qual tem se mostrado bastante útil para as análises genéticas de populações de insetos (Harry et al. 1998; Mäki-Petäys et al. 2005; Sofia et al. 2005; Bickel et al. 2006), foi empregada para a análise da diversidade genética de populações de *E. nigrita* de cinco fragmentos florestais, remanescentes de Mata Atlântica no sul do Brasil.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Áreas de estudo

As abelhas foram coletadas em cinco fragmentos florestais situados no norte do estado do Paraná, sul do Brasil (Figura 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), (Tabela 1). O quinto fragmento estudado, Parque Estadual “Mata dos Godoy”, constitui uma reserva governamental com uma área de cerca de 680 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). Todos os fragmentos estudados constituem reservas contendo vegetação remanescente de Floresta Estacional Semidecidual, o tipo de vegetação nativa presente na região norte do estado do Paraná até o início do século XIX (Alonso 1977; Torezan 2002), apresentando graus diferentes de preservação (Tabela 1). Uma característica comum aos fragmentos selecionados é que todos apresentam sinais de perturbação antropogênica e se encontram circundados por áreas cultivadas ou pastagens.

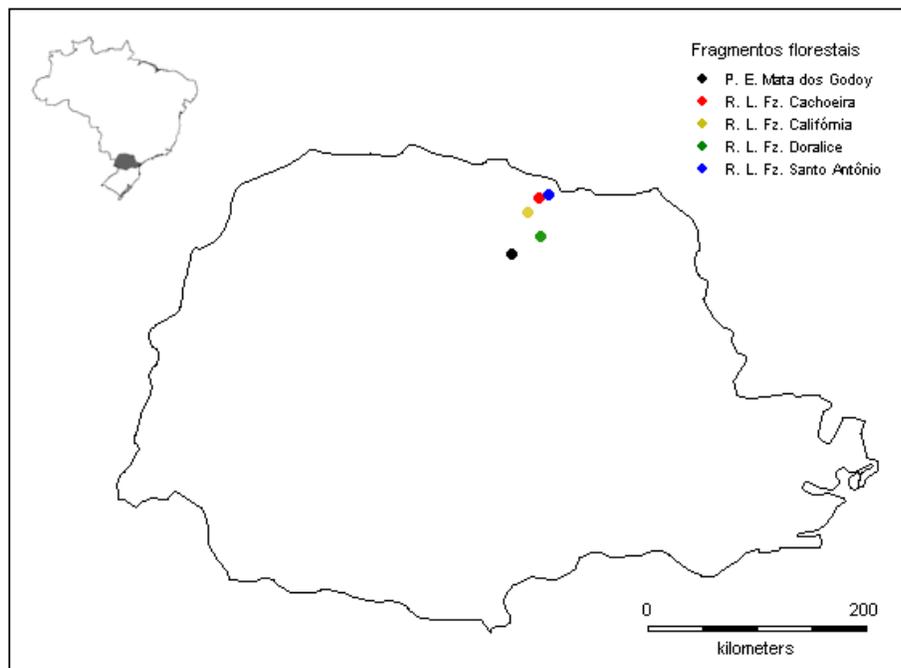


Figura 1. Localização dos fragmentos florestais situados no norte do estado de Paraná, sul do Brasil. P.E.= Parque Estadual ; R.L. Fz.= Reserva Legal-Fazenda.

Tabela 1. Caracterização dos cinco fragmentos de mata estudados em termos de: tamanho (ha), localização, coordenadas geográficas, tipo de vegetação e denominação. Na última coluna são apresentados os números de coleta realizados em cada área.

Áreas de Estudo (Abreviação)	Superfície (ha)	Reserva	Município (Coordenadas Geográficas)	Tipo de Vegetação	Tipo de Fragmento	Número de coletas
Parque Estadual Mata dos Godoy (PMG)	680 (+2200)	Estadual	Londrina (23°27' S; 51°15' W)	Primária	Grande	8
Fazenda Cachoeira 2C (F2C)	117	Particular (Reserva Legal)	Sertanópolis (23°03' S; 51°02' W)	Secundária	Grande	10
Fazenda Doralice (FDO)	200	Particular (Reserva Legal)	Ibiporã (23°16' S; 51°03' W)	Primária	Grande	4
Fazenda Santo Antônio (FSA)	70	Particular (Reserva Legal)	Sertaneja (23°02' S; 50°50' W)	Secundária	Médio	9
Fazenda Califórnia (FCA)	20	Particular (Reserva Legal)	Sertanópolis (23°03' S; 51°02' W)	Secundária	Pequeno	6

Para a escolha dos fragmentos determinou-se que estes deveriam estar situados a uma distância mínima de 5 km entre si, para evitar assim distorções entre as estimativas entre eles devido à comprovada capacidade de vôo das *Euglossina* de grande porte. As distâncias entre os fragmentos são apresentadas na Tabela 2. As distâncias entre os fragmentos foram estimadas com o auxílio de um aparelho de GPS (Garmin, 12 XL).

Tabela 2. Distâncias estimadas em km entre os cinco fragmentos de mata estudados. PMG = Parque Estadual “Mata dos Godoy”, F2C = Fazenda Cachoeira 2C, FDO = Fazenda Doralice, FSA = Fazenda Santo Antônio e FCA = Fazenda Califórnia.

	PMG	F2C	FDO	FSA	FCA
F2C	55,84 km	***			
FDO	30,49 km	33,75 km	***		
FSA	62,54 km	7,03 km	36,53 km	***	
FCA	39,96 km	15,15 km	23,77 km	23,42 km	***

4.3.2 Metodologia

Coleta das Abelhas

A metodologia de coleta das abelhas foi baseada em Rebêlo e Garófalo (1991) e Sofia e Suzuki (2004), com algumas modificações. Machos de *Euglossina* foram atraídos às iscas-odores de papel absorvente embebidas em essências químicas de eucaliptol, eugenol ou vanilina, presas às ramagens de árvores e arbustos da mata, a aproximadamente 1,5 m de altura do solo e capturados em seguida com auxílio de uma rede entomológica. As coletas foram realizadas nos meses de abril e dezembro de 2004

e janeiro a abril de 2005, no período entre 10:00 e 13:00 horas, perfazendo um total de 37 dias (Tabela 1) e cerca de 111 horas de coleta. Os machos coletados foram colocados em frascos individuais, onde foram anotados: data, local, horário, tipo de essência e coletor.

No laboratório, o material 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 genômico. Alguns indivíduos da espécie estudada foram montados em alfinetes entomológicos como espécimes testemunhos e encontram-se depositados no Museu de Zoologia da Universidade de Londrina (MZUEL).

Extração de DNA e Quantificação das Amostras

Foram analisados 20 machos de cada fragmento. A técnica de extração de DNA foi baseada no método empregado por Sofia et al. 2005. Antes das extrações as abelhas foram lavadas com álcool 70% para a remoção de possíveis contaminantes exógenos como pólen ou fungos. Nas extrações foram retirados todos os abdomens. O corpo sem o abdome foi bem macerado, com auxílio de um pistilo, em um almofariz contendo nitrogênio líquido. Este macerado foi transferido para um tubo de microcentrífuga, onde se adicionou 800 μL de tampão de extração (Tris-HCl pH 8,0 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 1%, 200mL H_2O estéril) e 5 μL de proteinase K (20 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$). Após homogeneização, cada tubo foi mantido em banho-maria por 2 horas à 62°C . Após este período, o DNA genômico foi extraído em 3 lavagens sucessivas com igual volume de fenol, fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1, v.v.v) e finalmente, clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, v.v). Em cada uma das lavagens as amostras eram centrifugadas a 6200 g por 15 min e o sobrenadante transferido em seguida para um

tubo limpo e esterilizado. Após a última lavagem, o material sobrenadante foi transferido a um tubo novo, adicionando-se então o volume correspondente a 2,5 vezes da quantidade do volume do sobrenadante, de etanol absoluto (- 20°C) e 10% de NaCl 3M. Após esta etapa, os tubos foram mantidos durante 12 horas em freezer (-20°C), quando então este material foi centrifugado a 10500 g por 15 min. O *pellet* (precipitado) formado no fundo do tubo foi lavado com etanol 70% e novamente centrifugado por 10 min a 10500 g. O material obtido da extração foi seco à temperatura ambiente por cerca de duas horas, solubilizado em TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0), e então, armazenado a -20°C.

A concentração de DNA obtido nas extrações foi determinada em fluorímetro DyNA Quant 200 (Hoefer). Para a determinação da concentração as amostras foram diluídas na proporção 1:10 (v.v), colocando-se 20 µL da amostra do DNA obtido nas extrações e 180 µL de TE. O fluorímetro foi calibrado em 100 ng.mL⁻¹, usando-se DNA padrão de timo de bezerro (Pharmacia Biotech) em uma concentração 1:10 do estoque 1 mg.mL⁻¹, solução padrão para dosagem composta por 0,1 µg.mL⁻¹ do corante fluorescente DQ 201 Hoechst 33258 (Pharmacia Biotech) e TNE (Tris 100 mM, EDTA 10 mM, NaCl 2 M). Foram efetuadas duas leituras para cada amostra, calculada a média aritmética destas e por fim, o valor obtido foi utilizado nos cálculos das diluições de DNA para uma concentração de 5ng.µL⁻¹.

Amplificação das Amostras

A amplificação do DNA genômico total das abelhas foi baseada na metodologia descrita por Williams et al. (1990). As reações de RAPD foram produzidas em um volume final de 25 µL, contendo 15 ng de DNA, 250 µM de dNTP (Pharmacia), 0,3

μM de *primer* (Operon Technologies, Alameda, CA, USA), 4 mM de MgCl_2 e 2 U da enzima DNA polimerase, tampão de reação (10mM 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. Considerando que as reações de RAPD são sensíveis a variações nas concentrações de seus reagentes (Chiappero e Gardenal 2001) vários testes de otimização foram realizados antes da determinação das concentrações dos reagentes a serem utilizados. Além disto, as mesmas concentrações de reagentes foram mantidas em todas as reações de RAPD. 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 .

Análises Eletroforética e Genética de Populações

As amostras dos machos de *E. nigrita* de cada fragmento florestal foram agrupadas em pares nos géis, resultando em seis comparações, três das quais envolvendo apenas fragmentos de mata de tamanhos diferentes pertencentes a propriedades privadas: Comparativos C1, C2 e C3 (Tabela 3). As outras três

comparações foram realizadas entre os machos coletados na PMG (reserva governamental de tamanho grande) e os machos das três áreas privadas: Comparativos C4, C5 e C6 (Tabela 3).

Após a amplificação as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,4%, a 3 V.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 (20µL 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.

A análise de RAPD foi determinada por comparação direta dos perfis eletroforéticos do DNA amplificado dos indivíduos analisados, com cada um dos *primers*. Os dados obtidos foram introduzidos nos programas computacionais na forma de matrizes com variáveis binárias, o número 1 representando a presença de banda de RAPD, e o número 0 a ausência da mesma. Somente as bandas que puderam ser visualizadas com certeza foram incluídas nas análises. Adicionalmente, somente foram considerados os locos polimórficos cujos alelos mais raros tiveram uma frequência igual ou superior a 5% (cf. Almeida et al. 2003). Cada loco foi tratado como um sistema de dois alelos, com somente um dos alelos por loco sendo amplificado pela PCR. Foi assumido que os alelos dos diferentes locos não co-migraram para a mesma posição no gel e que as populações estavam em equilíbrio Hardy-Weinberg (Lynch e Milligan 1994).

As análises genéticas envolveram as três comparações (C1, C2 e C3), as quais incluíram a população de abelhas da reserva particular de mata da Fazenda Cachoeira 2C (F2C), o qual foi considerado um fragmento de tamanho grande (> 100 ha), com as populações de *Eulaema nigrita* coletadas nas três outras reservas particulares de

tamanhos grande, pequeno e médio, respectivamente: Fazenda Doralice (FDO), Fazenda Califórnia (FCA) e Fazenda Santo Antônio (FSA). Além destes três comparativos, outros três envolvendo as populações da “Mata dos Godoy” (PMG) e de abelhas dos fragmentos F2C (grande), FSA (médio) e FCA (pequeno) também foram realizados, denominados, respectivamente, C4, C5 e C6.

O programa computacional TFGA 1.3 (Miller 1997) foi utilizado nas seguintes análises: i) quantificação da variabilidade genética a partir da proporção de locos polimórficos (\bar{P}), usando-se o critério de 95%; ii) Teste Exato de Fisher, aplicado para o cálculo de diferenças significativas das freqüências dos marcadores nas diferentes populações, (para o cálculo do erro padrão foram utilizados 10 grupos com 1000 trocas por grupo e 2000 passos de “dememorização”); iii) identidade e distância genética de Nei (1978); iv) estimativa da divergência da freqüência gênica entre as populações, calculada pelo teste θ_p (θ), que é uma estimativa de F_{ST} (Miller 1997), utilizando 1000 interações para gerar o intervalo de confiança (estimativa de Jackknife). A significância de θ_p foi medida por meio do teste do qui-quadrado (χ^2) pela fórmula: $\chi^2 = 2.N. \theta.(\kappa-1)$, com $(\kappa-1).(s-1)$ graus de liberdade, onde N é o total de indivíduos amostrados, κ é o número de alelos e s é o número de populações analisadas para o loco gênico (Waples 1987 *apud* Solé-Cava, 2001). O cálculo do número de migrantes por geração (Nm), que representa o fluxo gênico entre as populações, foi estimado a partir do valor de θ_p por meio da fórmula $Nm = (1 - \theta)/(4 \theta)$ (Black 1997). Valores de Nm superiores a 1 foram considerados como evidência de fluxo gênico (Slatkin e Barton 1989).

A diversidade alélica entre as populações dos diferentes fragmentos de mata foi obtida pela aplicação do teste G, que estima a significância das diferenças na freqüência alélica dos diferentes locos de RAPD, por meio do programa Popgene 1:31 (Yeh e

Boyle 1997). Para uma melhor visualização destes resultados foi feito o cálculo da proporção de locos polimórficos significativamente diferentes, definido como o número de locos de RAPD com diferenças significativas ($P = 0,05$) nas frequências alélicas entre diferentes populações, dividido pelo número total de locos polimórficos.

O coeficiente de correlação de Spearman (Zar 1996) foi empregado para testar possíveis correlações entre vários parâmetros genéticos (ex. distância genética, Nm e valores de theta), bem como entre estes parâmetros e as distâncias geográficas entre os diferentes fragmentos de mata.

Para a análise da similaridade genética entre os indivíduos dos diferentes fragmentos foi utilizado o programa computacional NTSYS-PC 2.1 (Rohlf 2000), empregando-se o coeficiente de Jaccard (J) (Sneath e Sokal 1973) e método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) que permite a construção do dendrograma de similaridade genética. Programa computacional BOOD (Coelho 2000) foi empregado para determinar as consistências dos agrupamentos formados e do número de locos analisados para as diferentes populações estudadas.

4.4. RESULTADOS

Foi analisado um total de 100 machos de *E. nigrata*, sendo 20 de cada um dos cinco fragmentos de mata estudados.

No total foram selecionados 16 *primers*, os quais produziram entre 7 e 26 locos (Tabela 3).

Os números de locos encontrados para as diversas comparações variaram de 170 (F2C-FSA) a 190 locos (F2C-FDO) e a porcentagem de locos polimórficos nas análises

comparativas entre os pares de populações dos diferentes fragmentos variou de 53,71% (PMG-FCA) a 64,74% (F2C-FDO), (Tabela 3). As análises referentes à consistência dos números totais de locos analisados para os diferentes pares de populações revelaram que nas três análises comparativas entre a população da reserva governamental (PMG) e as populações de *E. nigrita* dos fragmentos privados de tamanhos grande (F2C), médio (FSA) e pequeno (FCA) o coeficiente de variação foi superior a 5%, indicando possivelmente um número insuficiente de locos analisados. Entretanto, nos três casos os valores obtidos mantiveram-se muito próximos a 5%, variando de 5,4 % (PMG-SA) a 6,5% (PMG-CA).

Na Figura 2 encontram-se representadas as estimativas médias das porcentagens de locos polimórficos (P) calculadas para as populações de *E. nigrita* dos fragmentos grandes (PMG, F2C, FDO), médio (FSA) e pequeno (FCA). Estes valores médios foram estimados a partir das porcentagens dos comparativos 4, 5 e 6 para PMG; 1, 2, 3 e 4 para F2C; 2 e 5 para o fragmento FCA e 3 e 6 para FSA. O maior valor encontrado foi para a população de FDO (60%), uma das duas reservas legais de tamanho grande, e o menor valor para a população do fragmento privado pequeno FCA (53,61%).

Tabela 3. Relação de *primers* utilizados nas reações de RAPD de *Eulaema nigrita*, número total de locos, número de locos polimórficos produzidos e porcentagem (%) de locos polimórficos (\bar{P}) nas seis análises comparativas entre as populações dos fragmentos estudados. F2C = Fazenda Cachoeira 2C, FDO = Fazenda Doralice, FSA = Fazenda Santo Antônio, FCA = Fazenda Califórnia e PMG = Parque Mata dos Godoy (reserva governamental).

Primer	Comparativo 1 (F2C-FDO)		Comparativo 2 (F2C-FCA)		Comparativo 3 (F2C-FSA)		Comparativo 4 (PMG-F2C)		Comparativo 5 (PMG-FCA)		Comparativo 6 (PMG-FSA)	
	Total locos	Locos polimórficos										
OPA 7	11	5	11	5	11	6	11	5	11	5	11	5
OPA 11	11	6	11	6	10	6	10	9	10	6	10	6
OPA 18	11	5	11	3	11	5	11	3	11	3	11	5
OPA 19	7	5	7	6	7	5	8	7	8	7	8	7
OPAC 3	8	3	7	3	7	5	8	2	8	2	7	2
OPAC 4	14	11	8	3	8	3	8	5	8	4	8	4
OPAC 14	13	9	10	6	11	6	11	6	11	6	10	6
OPAC 20	13	2	13	1	13	2	13	1	13	1	13	5
OPC 2	18	16	17	14	16	14	16	12	17	13	16	12
OPC 20	9	7	9	6	9	6	9	5	9	5	10	6
OPAM 7	26	18	24	16	19	10	23	16	24	15	20	16
OPAM 9	10	8	8	4	9	5	9	6	9	4	9	7
OPAM 18	9	7	10	8	9	5	10	8	9	8	9	8
OPAM 20	8	6	8	4	8	3	9	5	9	4	9	5
OPW 6	12	6	13	7	12	6	10	5	10	5	12	7
OPW 10	10	9	9	7	10	8	8	6	8	6	8	7
Total de locos	190	123	176	99	170	95	174	101	175	94	171	108
% locos polimórficos		64,74%		56,25%		55,88 %		58,04%		53,71%		63,16%

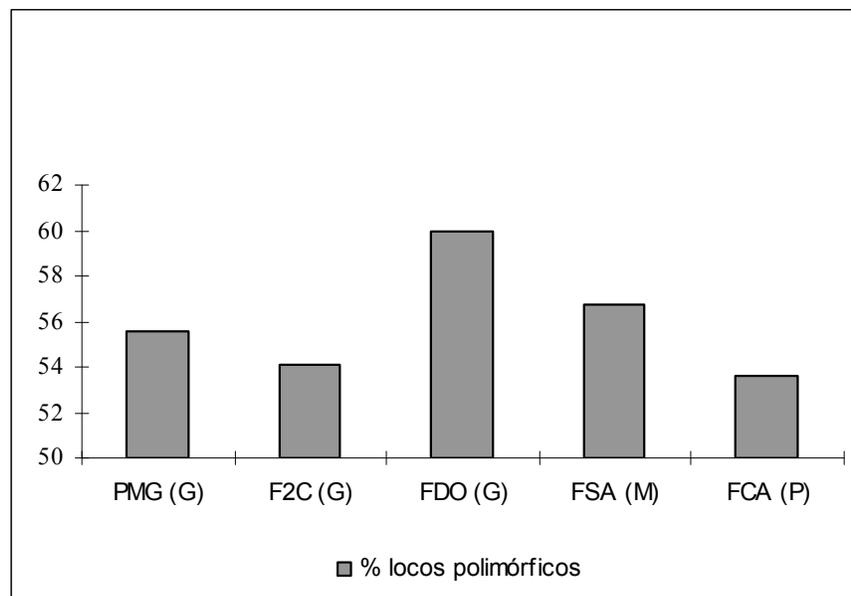


Figura 2. Porcentagens de locos polimórficos (\bar{P}) das populações de *Eulaema nigrata* dos cinco fragmentos estudados: PMG, F2C, FDO, FSA e FCA. (G) = grande, (M) = Médio, e (P) = pequeno. Valores médios obtidos de diferentes comparativos.

Os valores de θ_{p_i} não se mostraram significativamente diferentes de zero para as seis análises comparativas: C1 (F2C-FDO), C2 (F2C-FCA), C3 (F2C-FSA), PMG-F2C (C4), PMG-FCA (C5) e C6 (PMG-FSA), sugerindo a ausência de diferenciação genética entre as populações de *E. nigrata* destes fragmentos. Em relação aos valores obtidos pela aplicação do teste exato de Fisher, estes também não se mostraram significativamente diferentes para nenhum dos seis comparativos (Tabela 4). Corroborando estes resultados, foram detectados valores reduzidos de distância genética para os diferentes pares de populações estudadas. O maior valor de distância (0,024) e, conseqüentemente, o menor valor de identidade genética (0,9754) foi detectado para as populações das reservas PMG e F2C (Comparativo 4).

Os valores de Nm , que estima o fluxo gênico entre as populações, variaram de 3,79 (C4), entre as duas populações das reservas governamental e particular de tamanhos grande (PMG-F2C), a 28,48, correspondente à comparação entre as reservas particulares de tamanho medio (FSA) e governamental grande (PMG) (Tabela 4).

Na Figura 3 é apresentada a relação entre as distâncias geográficas entre os fragmentos florestais estudados e os valores estimados de Nm . Apesar de uma aparente correlação negativa entre estes dois parâmetros, o teste de correlação de Spearman mostrou que esta não foi significativa ($P > 0,05$).

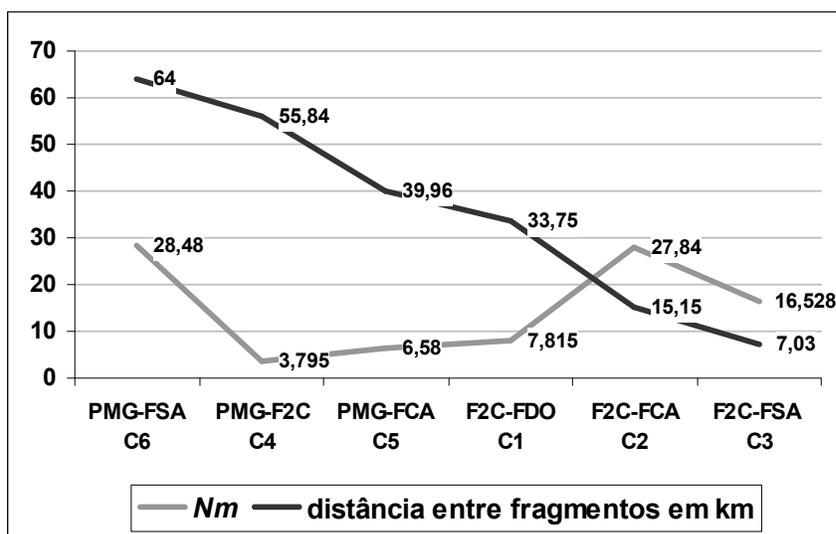


Figura 3. Relação entre as distâncias entre os fragmentos florestais (PMG, F2C, FDO, FSA e FCA) e os valores de Nm obtidos nos seis estudos comparativos das populações de *Eulaema nigrita* do Norte de Paraná. C1 a C6 = análises comparativas.

Tabela 4. Parâmetros estimativos da diversidade genética: variância da frequência gênica entre populações (θ_{tp}), número médio de migrantes por geração (Nm), teste exato de Fisher, distância genética (D) e Identidade (I) de Nei (1978) e Teste G entre as populações de *Eulaema nigrita* dos fragmentos estudados. PMG = Parque Estadual Mata dos Godoy, F2C = Fazenda Cachoeira 2C, FDO = Fazenda Doralice, FSA = Fazenda Santo Antônio e FCA = Fazenda Califórnia.

Populações (Distância)	Teste Theta				Teste Exato de Fisher		Nei (1978)		Nm	Teste G*		
	θ_{tp}	Jackknife	χ^2	P (gl=1)	χ^2	P (gl)	D	I		LSD	TLP	%
F2C-FDO (33,75 km)	0,0310	0,0311 (0,0133)	2,48	>0,05	202,8493	> 0,05 (gl = 234)	0,0149	0,9853	7,815	15	109	13,76
F2C-FCA (15,15 km)	0,0089	0,0090 (0,0088)	0,71	>0,05	149,8986	> 0,05 (gl = 200)	0,0108	0,9905	27,840	9	90	10
F2C-FSA (7,03 km)	0,0149	0,0151 (0,0154)	1,19	>0,05	132,2688	> 0,05 (gl = 190)	0,0095	0,9893	16,528	6	87	6,9
PMG-F2C (55,84 km)	0,0618	0,0620 (0,0176)	3,79	>0,05	237,2687	> 0,05 (gl=188)	0,0249	0,9754	3,795	14	163	8,58
PMG-FCA (39,96 km)	0,0366	0,0367 (0,0150)	2,93	>0,05	170,059	> 0,05 (gl=186)	0,0158	0,9843	6,58	16	158	10,12
PMG-FSA (64,0 km)	0,0087	0,0088 (0,0084)	0,696	>0,05	152,5244	> 0,05 (gl=206)	0,0108	0,9893	28,48	8	98	8,16

() Desvio padrão; $\chi^2_c = 3,84$; Teste G*: LSD: locos com frequências alélicas significativamente diferentes. TPL: total de locos polimórficos registrados. %: porcentagem de locos com frequências alélicas significativamente diferentes.

Adicionalmente, a análise da diversidade genotípica revelada pela aplicação do teste G, revelou pouca variação entre as frequências dos alelos dos diferentes locos das abelhas das diferentes reservas legais estudadas, com os seguintes valores de porcentagem de significância: 13,8% (F2C-FDO), 10,0% (F2C-FCA) e 6,9% (F2C-FSA), 8,6% (PMG-F2C), 10,1% (PMG-FCA) e 8,2% (PMG-FSA), respectivamente (Tabela 4).

De um modo geral, as seis análises comparativas de similaridade genética mostraram apenas uma tendência de pares de machos de abelhas dos diferentes fragmentos florestais formarem pequenos grupos entre si. Entretanto, os valores de 'bootstrap' obtidos para os agrupamentos se mostraram, geralmente, inferiores a 50%, indicando pouca consistência nos agrupamentos formados (Figuras 5 a 10 – anexos).

Na maioria dos casos os valores estimados de similaridade genética entre os indivíduos analisados foram superiores a 60%. Além disto, das análises realizadas, observou-se uma maior similaridade entre os machos de abelhas do fragmento F2C com os das demais reservas particulares (FDO, FCA e FSA), (Figuras 5, 6 e 7 – anexos).

4.5. DISCUSSÃO

A diversidade genética de uma população pode ser estimada a partir das variações de polimorfismos de marcadores RAPD entre indivíduos, bem como entre diferentes populações de uma mesma espécie (Bagley et al. 2001; Lowe et al. 2004). Recentemente, marcadores RAPD têm sido aplicados como ferramentas em estudos sobre a variabilidade e a estrutura genética de algumas espécies de Euglossina (Sofia et al. 2005; Waldschmidt et al. 2005).

A variabilidade genética, representada pelas porcentagens de locos polimórficos, em todas as populações de machos de *E. nigrita* estudadas no presente trabalho mostrou valores acima de 50% para todas as populações estudadas desta espécie (Figure 2). Valores de 57,28% de locos polimórficos foram apresentados por Sofia et al. (2005) para machos de *Eufriesea violacea*, outra espécie de Euglossina aparentemente mais sensível que *E. nigrita* a uma redução no tamanho de fragmentos florestais (Sofia e Suzuki 2004). Considerando que os fragmentos de maior tamanho (PMG) e menor tamanho (FCA) mostraram valores muito similares de proporção de locos polimórficos (cerca de 70%), pode-se inferir que os tamanhos dos fragmentos não estão determinando as diferenças nos valores de variabilidade genética encontrados para as cinco populações estudadas. Segundo Waldschmidt et al. (2005), tanto a área como as distâncias entre fragmentos de mata são dois parâmetros fundamentais para se levar em consideração para explicar a diversidade de espécies, a dinâmica das populações e a estrutura genética em fragmentos naturais ou resultantes de mudanças antrópicas da paisagem. Contudo, estes autores ressaltam que outros fatores podem influenciar o efeito da fragmentação nas populações naturais, entre os quais se incluem: aspectos da bionomia da espécie, a estrutura espacial do fragmento florestal, as diferenças entre fragmentos, o efeito da borda, a maneira de uso do solo na matriz entre fragmentos, e também a existência de barreiras contra a dispersão.

Populações naturais normalmente têm níveis altos de variação genética (cf. Solé-Cava 2001). Este fato não acontece normalmente na ordem Hymenoptera que apresenta valores baixos, caso que é geralmente atribuído ao fenômeno de haplodiploidia presente neste grupo (Crespi 1991; Packer e Owen 2001). Estimativas de heterozigosidade são utilizadas para comparação de variabilidade genética entre grupos haplodiplóides, neste caso não foi possível estabelecer uma comparação de forma direta com outros trabalhos,

já que foram unicamente coletados machos, qualquer estimativa deveria ser pressupondo as populações em total equilíbrio de Hardy-Weinberg e apresentando a relação sexual 1:1, dados que precisariam ser corroborados. Existe uma grande divergência em quanto a razão sexual de populações de *E. nigrita*, estes valores tomados de diferentes autores variam de 0,27 até 0,86, como é apresentado em Peruquetti e Campos (1997).

De um modo geral, os resultados obtidos nas análises de diversidade genética entre as populações de *E. nigrita* analisadas sugerem a ocorrência de uma única população de *E. nigrita* entre os vários fragmentos estudados. Os valores referentes ao teste θ_p , o qual estima as variâncias entre as frequências alélicas de diferentes populações, não se mostraram significativamente diferentes de zero ($P > 0,05$), indicando ausência de diferenciação genética entre as várias populações analisadas (Tabela 4). De forma similar, as análises obtidas com o teste exato de Fisher (estimativa de diferenças nas frequências de marcadores entre as populações) indicaram também uma ausência de diferenciação genética entre os pares de populações analisados (Tabela 4).

A deriva genética pode ter um papel importante na diferenciação das populações, particularmente quando o tamanho efetivo destas é reduzido e o fluxo gênico limitado (Hartl e Clark 1997). Tendo em vista que valores de Nm maior que 1 são indicativos de fluxo gênico entre populações (Lowe et al. 2004), e que as várias análises comparativas realizadas mostraram valores de $Nm > 2$ (Tabela 4), tais resultados indicam a ocorrência de fluxo gênico entre as populações dos diferentes fragmentos de mata analisados. Por outro lado, Packer e Owen (2001) argumentam que valores de $Nm > 10$ podem, na verdade, estar indicando extinção recente de populações, seguida de possíveis eventos de recolonização. No presente trabalho, valores de Nm superiores a 10 foram

encontrados para as análises entre as populações de *E. nigrita* dos fragmentos F2C-FSA (16,53), F2C-FCA (27,84) e PMG-FSA (28,48; Tabela 4). Assim, tais resultados podem estar refletindo possíveis eventos de extinção de algumas das populações estudadas, particularmente, no que se refere às populações de fragmentos aparentemente com maior grau de perturbação ambiental, onde estão presentes vegetações do tipo secundária, em íntimo contato com uma matriz circundante com acentuada ação antrópica (ex.: pecuária, agricultura).

As análises também revelaram uma tendência para uma correlação negativa entre a distância em quilômetros (km) entre os fragmentos e os valores Nm (Figura 3), na qual as distâncias maiores mostraram uma correspondência em quase todos os casos, com valores menores de Nm , o que de certo modo estaria de acordo com o modelo de distância proposto por Wright (1943). Apenas no caso de F2C-FSA, cujo Nm foi muito inferior ao estimado para a análise comparativa C2 (F2C-FCA) esta possível correlação entre estes dois parâmetros torna-se inconsistente. Por outro lado, estes valores poderiam ser explicados, em parte, devido ao fato de os fragmentos F2C e FSA, se encontrarem separados pelo rio Tibagi, o que poderia estar constituindo uma barreira física, a qual atuaria não impedindo, mas inibindo o deslocamento de abelhas entre F2C e FSA. Assim, populações a menores distâncias podem apresentar maiores diferenças, porque qualquer barreira afeta a possibilidade de intercâmbio entre diferentes locais (Lowe et al. 2004). Entretanto, a capacidade de espécies euglossinas transpor corpos d'água já foi descrita por alguns autores (Dressler 1982; Murren 2002). Neste caso, a presença do rio Tibagi entre estas reservas F2C e FSA não representaria por si só uma barreira física para o deslocamento destas abelhas, considerando que espécies de abelhas como *E. nigrita*, são de grande porte, e estão dotadas de uma capacidade de deslocamento através de áreas abertas (Dressler 1982). Talvez por isso, como foi

revelado em outros estudos, populações de *Eulaema nigrata* não apresentaram variação em sua abundância entre fragmentos florestais de diferentes tamanhos (Sofia e Suzuki, 2004), assim como não apresentaram diferenças na sua variabilidade genética quando comparada entre fragmentos de mata secundária de diferentes tamanhos (Walschmidt et al. 2005).

Adicionalmente, vários autores têm reconhecido que *E. nigrata* é uma espécie de áreas abertas ou mesmo perturbadas (Peruquetti et al. 1999; Rebêlo 2001), o que também poderia explicar, em parte, os resultados encontrados. Outra possibilidade ainda para estes resultados, como Packer e Owen (2001) expõem, em organismos que tiveram ampla faixa de distribuição em tempos prévios à agricultura e que agora se tornaram escassas e distribuídas em populações fragmentadas, os valores de Nm podem se mostrar elevados mesmo que não esteja acontecendo atualmente intercâmbio de migrantes entre elas. Deve-se ressaltar que estes valores de Nm são uma estimativa indireta obtida a partir das frequências gênicas de locos polimórficos e para corroborar estes dados de fluxo gênico de um modo mais preciso, deveriam ser feitos estudos de captura, marca e recaptura no campo.

A população do fragmento médio (FSA) apresentou um comportamento diferente em relação ao teste θ_{ap} , contrariamente aos demais comparativos entre fragmentos privados e a reserva PMG; seu valor resultou o mais baixo de todos (0,0087), indicando a prevenção na diferenciação genética entre as populações estudadas como consequência dos processos dispersivos, como a deriva genética, inclusive entre os fragmentos mais distantes (PMG-FSA). Neste sentido, a possibilidade exposta previamente para o Nm , se ajustaria também a este resultado, deixando muito próximas geneticamente às populações que estão atualmente mais distantes e isoladas.

As distâncias genéticas entre populações evidenciam os arranjos geográficos das populações e podem explicar graus de isolamento por efeito da distância (IPED) Bickel et al. (2006). Os valores reduzidos de distância genética de Nei (1978) e elevados de identidade genética revelaram também junto com outros estimadores, uma alta similaridade genética entre os indivíduos das cinco populações estudadas, corroborando os resultados obtidos de Nm e a ausência de isolamento apesar das distâncias consideradas (até 64 km) entre estas populações.

Os diferentes parâmetros de diversidade genética empregados neste estudo indicam uma alta homogeneidade nos resultados produzidos pelas diferentes análises genéticas, indicando, como já destacado, a ocorrência de uma única população de *E. nigrita* na região estudada. Sofia et al. (2005) sugerem para três populações de *Eufriesea violacea* que estas se têm mantido geneticamente similares às populações nativas presentes antes da fragmentação, em parte, por causa da acentuada sazonalidade e da característica reprodutiva desta espécie, a qual apresenta apenas uma geração por ano. Ao contrário de *Eufriesea violacea*, *Eulaema nigrita* é uma espécie com atividade menos sazonal e que apresenta mais de uma geração por ano (Zucchi et al. 1969). Contudo, deve-se destacar que a ausência de diferenciação entre as populações pode ser decorrente do reduzido tempo de fragmentação (cerca de 70 anos) das florestas do norte do Paraná (Torezan 2002). Outra explicação provável seria que por serem estas duas espécies euglossinas abelhas de grande porte com alta capacidade de vôo, estas apresentem uma mesma tendência à baixa diferenciação genética entre suas populações. Dick et al. (2004) constataram, em estudos com genes de DNA mitocondrial, que não existe uma estrutura filogeográfica ao longo de uma ampla escala geográfica em 14 espécies de Euglossina, entre as quais *Eulaema nigrita*, a qual apresentou haplótipos idênticos em toda a escala geográfica deste estudo. Representando assim, de acordo a

estes autores, a mais fraca estrutura filogeográfica já reportada para qualquer grupo de organismos de ampla distribuição neotropical. A baixa divergência entre as espécies foi interpretada como incomum e como uma evidência de uma recente dispersão de todo o grupo Euglossina.

Em resumo, os parâmetros indicadores da diversidade genética das populações que foram estimados: locos polimórficos, o teste θ_p (estimador do F_{st}), distância e identidade genéticas, Nm e o teste G não apresentaram valores que indiquem que existam diferenças significativas entre as populações de *E. nigrita* de fragmentos de mata de tamanhos diferentes, com características fisionômicas diferentes, incluindo tipo de vegetação ou tipo de reserva privada ou governamental. Tais resultados concordam com aqueles obtidos para *Eufriesea violacea* por Sofia et al. (2005) e para *Eulaema nigrita* por Waldschmidt et al. (2005), mostrando a mesma tendência a uma baixa e moderada diferenciação genética entre as populações de machos de *E. nigrita*.

Áreas menores que 100 ha são consideradas por alguns autores, insuficientes para a manutenção a longo prazo de populações viáveis tanto de animais como de vegetais (Chiarello 1999; Turner e Corlett 1996). Embora outros autores, baseados no modelo de metapopulação, sugiram a conservação de fragmentos florestais menores e destaquem sua importância como formas de suporte para as áreas maiores protegidas e como reservatórios de espécies nativas (Turner e Corlett 1996; Chiarello 2000). Os presentes resultados indicam a importância de uma conservação e manejo adequado de fragmentos florestais de diferentes tamanhos em propriedades privadas como forma de conservação da espécie *E. nigrita*. Contudo, sugere-se que futuros estudos envolvendo outras espécies euglossinas e outros tipos de marcadores moleculares sejam desenvolvidos para que se consiga ter uma avaliação mais aprofundada sobre as populações destes insetos em remanescentes florestais em florestas tropicais.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária pelo apoio financeiro e à CAPES pela bolsa de estudo de A.N.T.

Pascual e K.M. Suzuki.

4.6. REFERÊNCIAS

- Ackerman JD (1983) Specificity and mutual dependency of the orchid-euglossine bee interactions. *Biol J Linn Soc* 20:301-314
- Aizen MA e Feinsinger P (1994) Habitat fragmentation, native insect pollinators, and feral honeybees in Argentine "Chaco Serrano". *Ecol Appl* 4:378-392
- Almeida FS, Sodr e LMK, Contel EPB (2003) Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tiet  and Paranapanema rivers (Brazil). *Genet Mol Biol* 26:301-305
- Alonso MTA (1977) Vegeta o. In: Geografia do Brasil: Regi o Sul, v. 5. Rio de Janeiro: IBGE. Sergraf. pp81-109
- Bagley MJ, Anderson SL, May B (2001) Choice for methodology for assessing genetic impacts of environmental stressors: polymorphism and reproducibility of RAPD and AFLP fingerprints. *Ecotoxicology* 10:239-244
- Bickel TO, Br hl CA, Gadau JR et al (2006) Influence of habitat fragmentation on the genetic variability in leaf litter ant populations in tropical rainforests of Sabah, Borneo. *Biodiv Conserv* 15:157-175
- Black B (1997) RAPDFst 4.0.1. A Fortran Program estimate F_{st} and effective migration rates among subpopulations using RAPD-PCR files. Colorado State University
- Chiappero MB, Gardenal CN (2001) Inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) markers and their use in population studies of *Calomys musculinus* (Rodentia, Muridae), the reservoir of Argentine Hemorrhagic Fever. *Hereditas* 135:85-93
- Cooper ML (2000) Random amplified polymorphic DNA analysis of southern brown bandicoot (*Isodon obesulus*) populations in Western Australia reveals genetic differentiation related to environmental variables. *Mol Ecol* 9:469-479

- Di Bitteti MS, Placci G, Dietz LA (2003) Uma visão de Biodiversidade para a 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 Fundation
- Chiarello AG (1999) Effects of fragmentation of the Atlantic forest on mammal communities in south-eastern Brazil. *Conservation Biology* 89: 71-82
- Chiarello AG (2000) Density and population size of mammals in remnants of Brazilian Atlantic Forest. *Conserv Biol* 14:1649-1657
- Coelho ASG (2000) BOOD: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Software. Goiânia, UFG
- Crespi BJ (1991) Heterozygosity in the haplodiploid Thysanoptera. *Evolution* 45:458-464
- Dick CW, Roubik DW, Gruber KF et al (2004) Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae:Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. *Mol Ecol* 13:3775-3785
- Dodson CH, Dressler RL, Hills HG et al (1969) Biologically active compounds in orchid. *Science* 164:1243-1249
- Dressler RL (1982) Biology of orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics* 13:373-94
- Guttman SI, Berg D (1998) Changes in the genetic diversity of aquatic organisms in the great lakes: causes and consequences. *Setac News* 23-24
- Harry M, Robin S, Lachaise D (1998) Use of polymorphic genetic markers (RAPD) in evolutionary and applied entomology. *Annals of Society Entomological of France* 34:9-32

- Hartl DL, Clark AG (1997) Principles of population genetics. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts
- Isabel N, Beaulieu J, Thériault P et al (1999) Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. Mol Ecol 8:477-483
- Janzen DH (1971) Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. Science 171:203-205
- Kearns CA (2001) North American Dipteran Pollinators: Assessing their value and Conservation Status. Conserv Ecol 5:1-9
- Kimberling DN, Ferreira AR, Shuster SM et al (1996) RAPD marker estimation of genetic structure among isolated northern leopard frog populations in the south-western USA. Mol Ecol 5:521-529
- Lowe A, Harris S, Ashton P (2004) Ecological Genetics. Design, analysis and application. Blackwell Publishing
- Lynch M, Milligan BG (1994) Analysis of population structure with RAPD markers. Mol Ecol 3:91-99
- Mäki-Petäys H, Zakharov A, Viljakainen L et al (2005) Genetics changes associated to declining populations of *Formica* ants in fragmented Forest landscape. Mol Ecol 14:733-742
- Mattner J, Zawko G, Rossett M et al (2002) Conservation genetics and implications for restoration of *Hemigenia exilis* (Lamiaceae), a serpentine endemic from Western Australia. Biol Conserv 107:37-45
- Miller MP (1997) Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3. A Windows program for the analysis of allozymes and molecular population genetic data. Computer software distributed by author

- Morellato LPC, Haddad CFB (2000) Introduction: The Atlantic Forest. *Biotropica* 32:786-792
- Murren CJ (2002) Effects of habitat fragmentation on pollination: pollinators, pollinia viability and reproductive success. *J Ecol* 90:100-107
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590
- Nemésio A (2002) Notes on the occurrence of an aberrant coloration in *Eulaema nigrata* (Hymenoptera: Apidae: Euglossina) in forest fragments in Southeastern Brazil. *Lundiana* 3:75-77
- Nemésio A (2004) Composição e riqueza em espécies e densidade populacional de machos de Euglossina (Hymenoptera: Apidae) de remanescentes florestais de Mata Atlântica no estado de Minas Gerais, Brasil. Master Thesis. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais
- Packer L, Owen R (2001) Population genetics aspects of pollinator decline. *Conservation Ecology* 5, art. 4. [online] URL: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art4/>
- Peruquetti RC, Campos LAO (1997) Aspectos da biologia de *Euplusia violacea* (Blanchard) (Hymenoptera:Apidae:Euglossine). *Rev bras Zool* 13:91-97
- Peruquetti RC, Campos LAO, Coelho CDP et al (1999) Abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância, riqueza e aspectos biológicos. *Rev bras Zool* 16:101-118
- Powell AH, Powell GNN (1987) Population dynamics of male euglossine bees in Amazonian forest fragments. *Biotropica* 19:176-79.
- Raeder U, Broda P (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* 1:17-20

- Raw A (1989) The dispersal of euglossine bees between isolated patches of eastern Brazilian wet forest (Hymenoptera, Apidae). *Revta Bras Entomol* 33:103-107
- Rebêlo JMM (2001) História natural das Euglossíneas. As abelhas das orquídeas. São Luis: Lithograf Editora
- Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv Biol* 17:230-237
- Rohlf FJ (2000) NTSYSpc, numeral taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, Applier Biostatistics, Setauket, New York
- Roubik DW, Hanson PH (2004) Abejas de orquídeas de la América tropical. Biología y guía de campo (Orchid bees of Tropical América) Biology and field guide. Heredia, Costa Rica: INBio Press
- Sih A, Jonsson BG, Luikart G (2000) Habitat loss: ecological, evolutionary and genetic consequences. *Tree* 15:132-134
- Silveira FA, Melo GAR, Almeida EAB (2002) Abelhas brasileiras. Sistemática e Identificação. Ministério do Médio Ambiente PROBIO-PNUD. Fundação Araucária. Belo Horizonte, Brasil
- Slatkin M, Barton HH (1989) A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43:1349-1368
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco, California: WH Freeman
- Sofia SH, Paula FM, Santos AM et al (2005) Genetic structure analysis of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae) populations from Southern Brazilian Atlantic rainforest remnants. *Genet Molec Biol* 28:479-484

- Sofia SH, Suzuki KM (2004) Comunidade de machos de abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em fragmentos florestais no Sul do Brasil. *Neotrop Entomol* 33:693-702
- Solé-Cava AJ (2001) Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Matioli SR (ed) *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos
- Tonhasca Jr A, Albuquerque GS, Blackmer JL (2003) Dispersal of Euglossine bees between fragments of the Brazilian Atlantic Forest. *J Trop Ecol* 19:99-102
- Torezan JM (2002) Nota sobre a vegetação da bacia do rio Tibagi. In: Medri ME, Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JA (eds) *A bacia do rio Tibagi*. Londrina: Edição dos Editores
- Torres E, Iriondo JM, Pérez C (2003) Genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae): allozyme and RAPD analysis. *Am J Bot* 90:85-92.
- Turner IM, e Corlett RT (1996) The conservation value of small, isolated fragments of lowland tropical rain forest. *Tree* 11:330-333
- Waldschmidt AM, Lopes LA, Marco Jr P et al (2005) Genetic of Euglossini bees (Hymenoptera) in fragments of the Atlantic forest in the region of Viçosa, MG. *Braz J Biol* 65:541-549
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ et al (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 18:6531-6535
- Wilcox BA, Murphy DD (1985) Conservation strategy: the effects of fragmentation on extinction. *Am Nat* 125:879-887
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28:114-138
- Wright S (1978) *Evolution and genetics of populations*. London: University of Chicago Press

- Yahner RH, Mahan CG (2002) Animal behavior in fragmented landscapes. In: Gutzwiller K (ed) Concepts and applications of landscape ecology in biological conservation. New York: Springer-Verlag
- Yeh FC, Boyle T (1997) Population genetic analysis of co-dominant and dominant marker and quantitative traits. Belg J Bot 129:157
- Zar JH (1996) Biostatistical analysis. 3rd ed. New Jersey: Prentice Hall
- Zucchi R, Oliveira BM, Camargo JMF (1969) Biological observations on a tropical parasocial bee, *Eulaema nigrita*, with a review on the biology Euglossinae (Hymenoptera:Apidae) A comparative study. J Fac Sci Hokk Univ Series IV Zool 17:271-380

Anexos - (Artigo 2)

Anexo 1

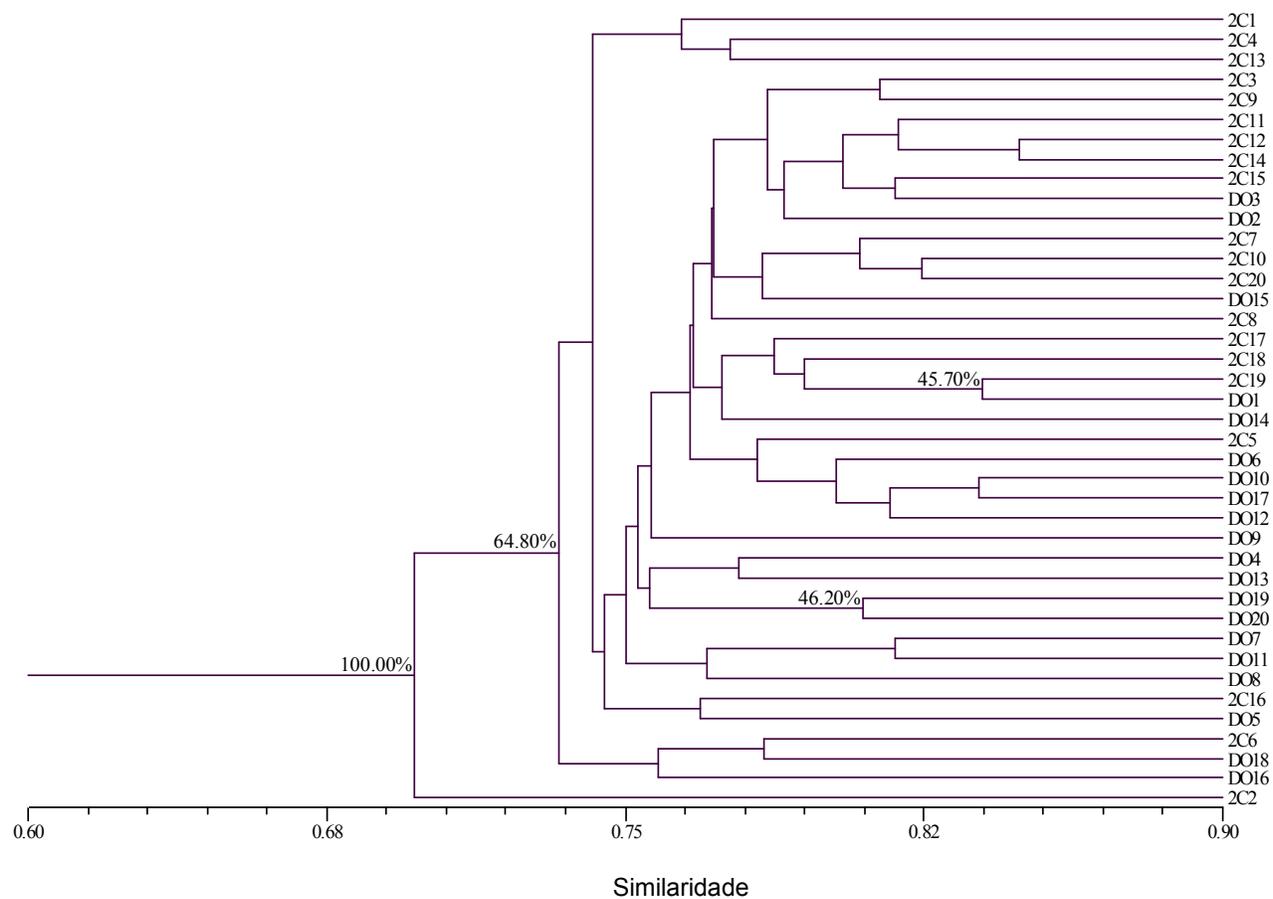


Figura 5. Dendrograma de similaridade genética obtido com base em marcadores RAPD e pela aplicação do coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA para a espécie *Eulaema nigrita*. 1A–20A = indivíduos coletados na Fazenda Cachoeira 2C (F2C); 1B–20B = indivíduos coletados na Fazenda Doralice (FDO). Ambas as áreas > 100 ha (fragmentos grandes).

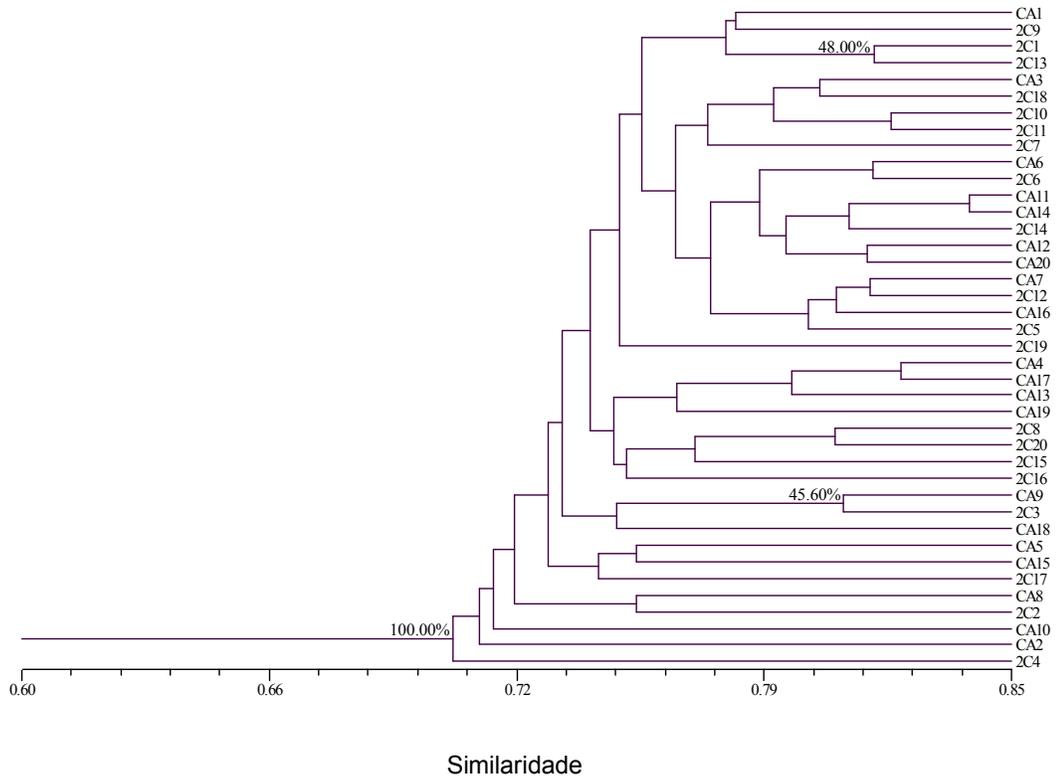


Figura 6. Dendrograma de similaridade genética coeficiente de Jaccard e método UPGMA para a espécie *Eulaema nigrita* utilizando-se os dados obtidos por meio da técnica de RAPD. 1C–2C = indivíduos coletados na Fazenda Califórnia (FCA) = fragmento pequeno; 1A–20A = indivíduos coletados na Fazenda Cachoeira 2C (F2C) = fragmento grande.

Anexo 3

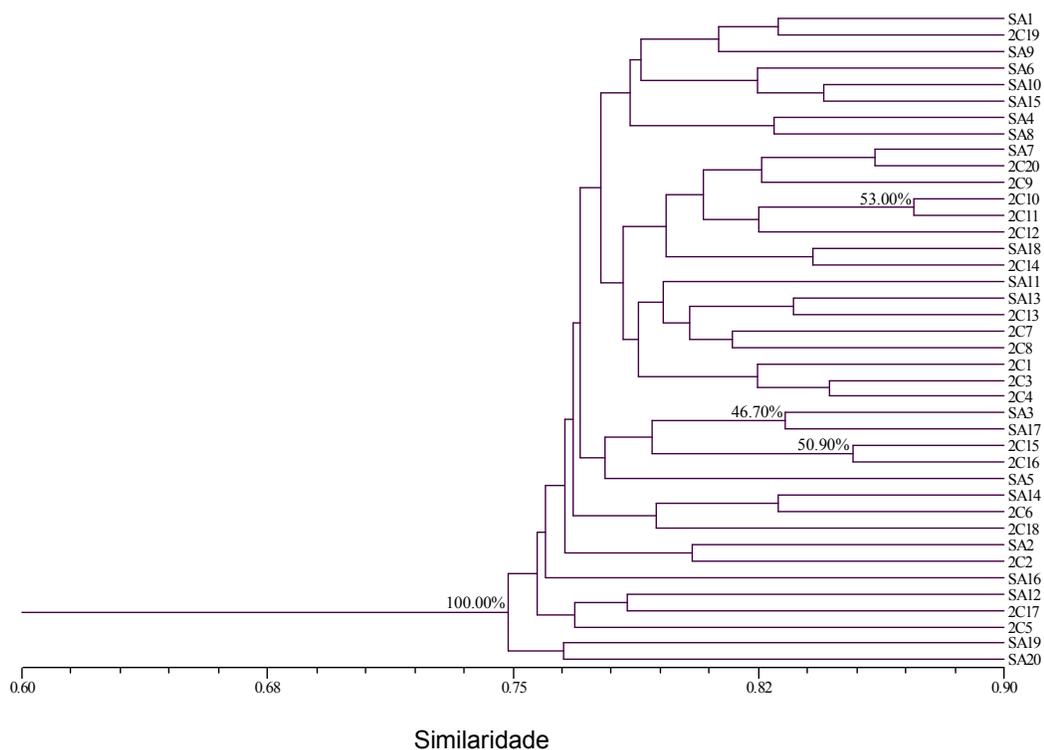


Figura 7. Dendrograma de similaridade genética obtido com base em marcadores RAPD e pela aplicação do coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA para a espécie *Eulaema nigrita*. 1SA–20SA = indivíduos coletados na Fazenda Santo Antônio (FSA) = fragmento médio; 1A–20A = indivíduos coletados na Fazenda Cachoeira 2C (F2C).

Anexo 4

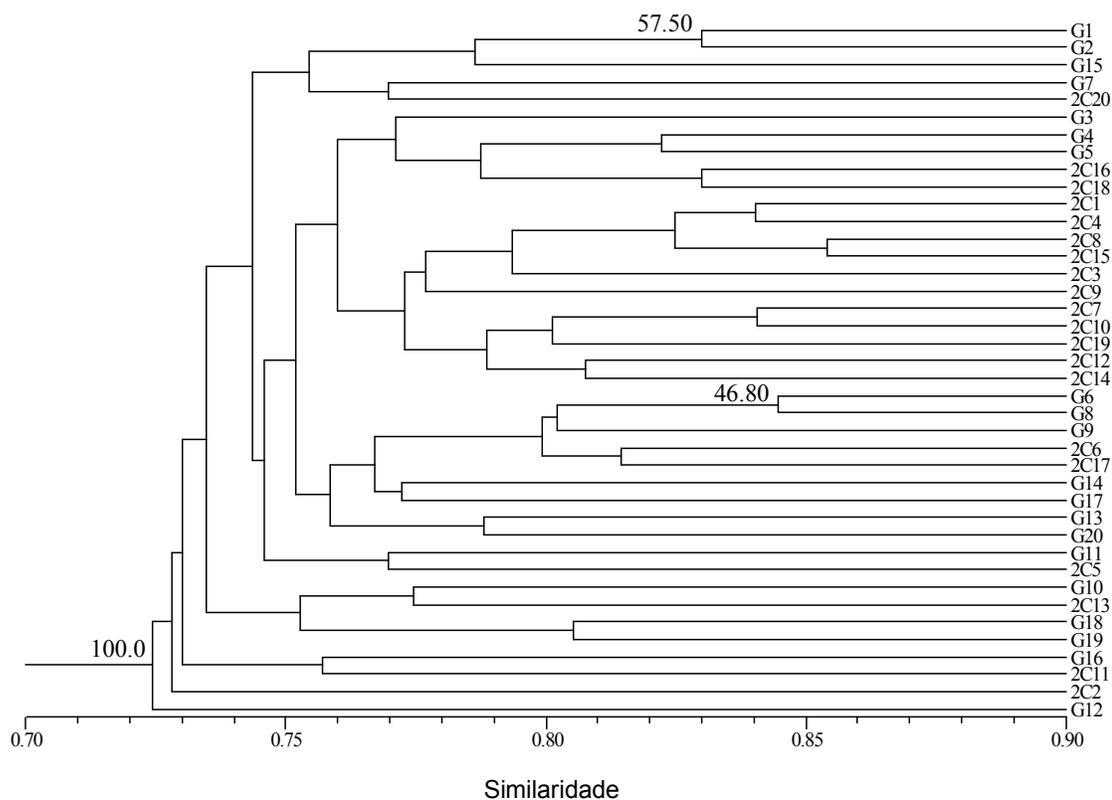


Figura 8. Dendrograma de similaridade genética obtido com base em marcadores RAPD e pela aplicação do coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA para a espécie *Eulaema nigrita*. 1G–20G = indivíduos coletados no Parque Estadual “Mata dos Godoy” (PMG) = fragmento grande; 1CH–20CH = indivíduos coletados na Fazenda Cachoeira 2C= fragmento grande (F2C).

Anexo 5

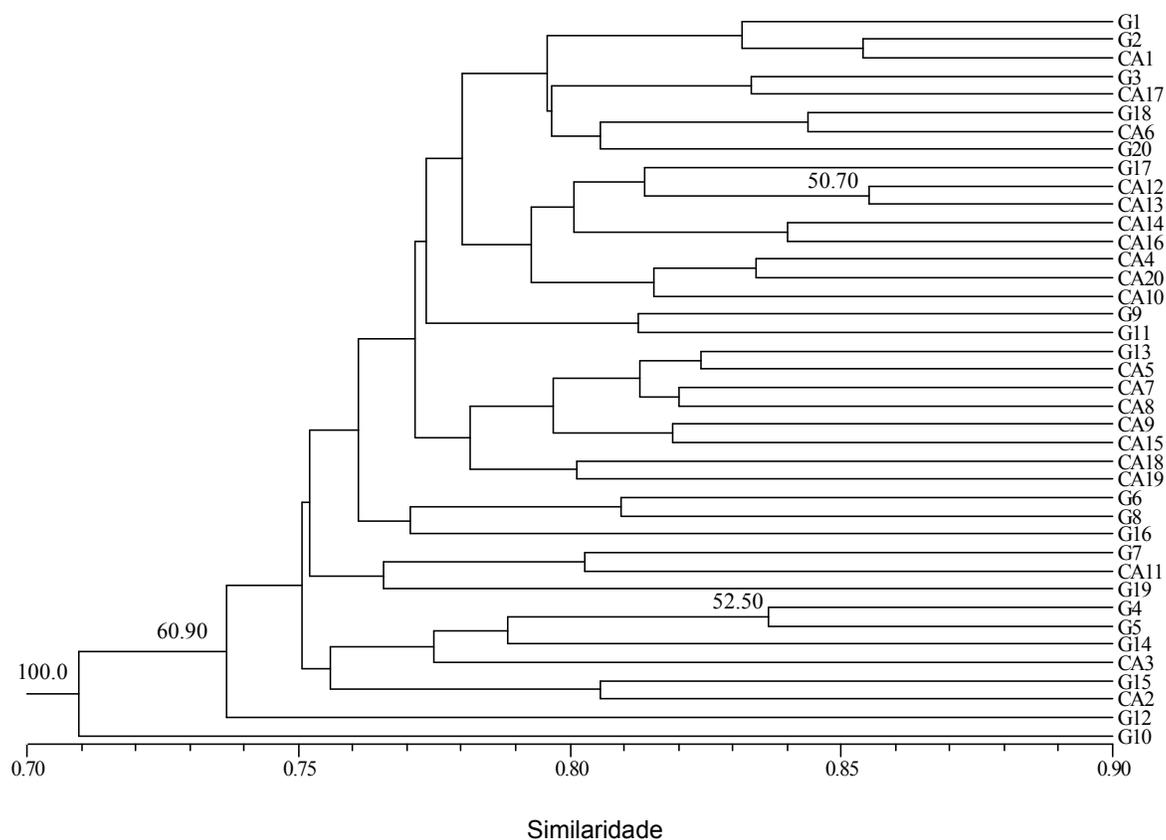


Figura 9. Dendrograma de similaridade genética obtido com base em marcadores RAPD e pela aplicação do coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA para a espécie *Eulaema nigrita*. 1G–20G = indivíduos coletados no Parque Estadual “Mata dos Godoy” (PMG) = fragmento grande; 1C–20C = indivíduos coletados na Fazenda Califórnia= fragmento pequeno (FCA).

Anexo 6

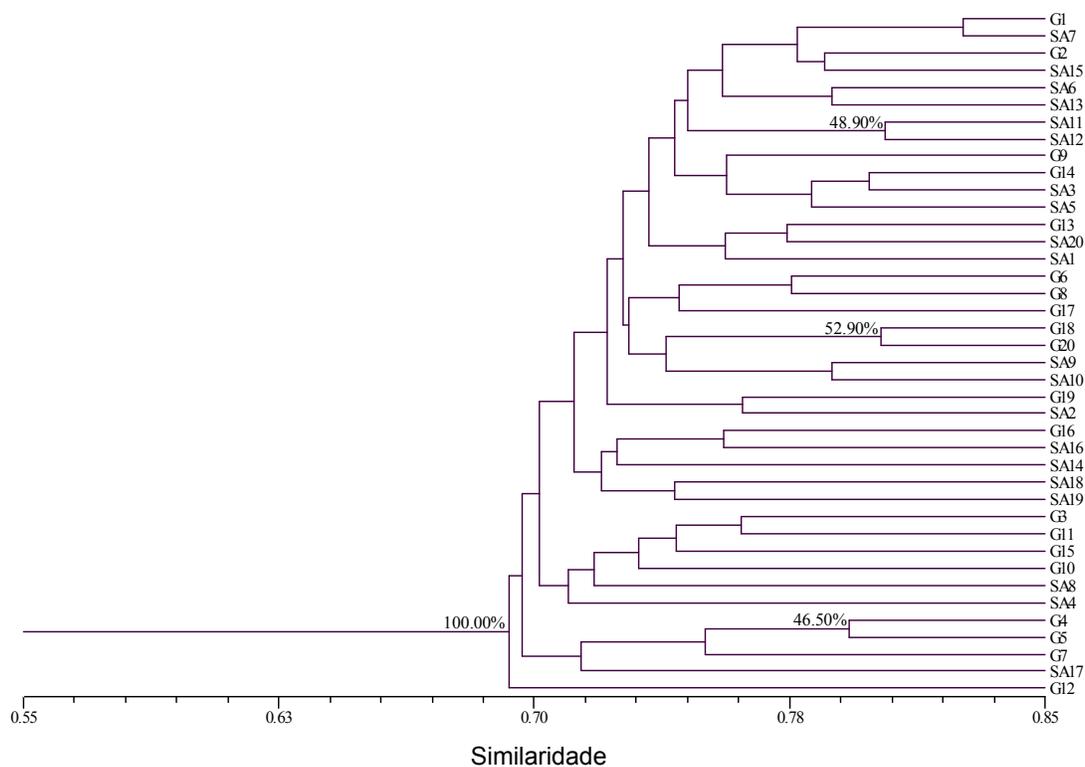


Figura 10. Dendrograma de similaridade genética obtido com base em marcadores RAPD e pela aplicação do coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA para a espécie *Eulaema nigrita*. 1G–20G = indivíduos coletados no Parque Estadual “Mata dos Godoy” (PMG) = fragmento grande; 1SA–20SA = indivíduos coletados na Fazenda Santo Antônio= fragmento médio (FSA).

5. CONCLUSÕES

- A alta repetibilidade nos perfis de RAPD entre as diferentes partes do corpo de cada indivíduo de *Euglossa pleosticta* confirma a repetibilidade desta técnica quando a mesma é adequadamente otimizada.
- As duas lavagens (água ou álcool) do material biológico realizadas previamente à extração de DNA foram igualmente eficientes, mostrando assim que o uso de qualquer um dos dois tratamentos pode ser utilizado na lavagem das abelhas antes da extração de DNA genômico.
- A diferença de repetibilidade entre as partes diferentes do corpo sugere o uso de cabeça, tórax + asas e pernas, de machos de euglossíneos para a extração de DNA genômico para fins de amplificação pela técnica RAPD-PCR.
- Estes trabalhos, em conjunto, reforçaram a aplicabilidade e a repetibilidade dos marcadores do RAPD para estudos de Euglossina.
- Os parâmetros indicadores da diversidade genética das populações de *Eulaema nigrata* estimados não apresentaram valores que indiquem diferenças entre as populações de *E. nigrata* de propriedades privadas de tamanhos diferentes, bem como entre tais populações e a população desta espécie presente em um remanescente de floresta melhor preservado (Mata dos Godoy).
- Estes resultados sugerem a existência de uma população única destas abelhas nas áreas de estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, M.T.A. Vegetação. In: **Geografia do Brasil: Região Sul**, v. 5. Rio de Janeiro: IBGE. SERGRAF. p. 81-109. 1977.

ACKERMAN J.D. Specificity and mutual dependency of the orchid-euglossine bee interactions. **Biol. J. Linn. Soc.** v. 20, p. 301-314. 1983.

AIZEN, M.A.; FEISINGER, P. Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a Chaco Dry Forest, Argentina. **Ecology**, v.75, p. 330-351. 1994.

ALLNUT, T.R. Genetic variation in the threatened South American conifer *Pilgerodum uviferum* (Cupressaceae), detected using RAPD markers. **Biol. Conserv.** v. 114, p. 243-253. 2003.

ALMEIDA, F.S.; SODRÉ, L.M.K.; CONTEL, E.P.B. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema rivers (Brazil). **Genet. Mol. Biology** v. 26, p. 301-305. 2003.

AYLIFFE, M.A.; LAWRENCE, G.J.; ELLIS, J.G.; PRIOR, A.J. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. **Nucl. Acids Res.** v. 22, p.1632-1636. 1994.

AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. 2^a ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. 2004. 684p.

BAGLEY, M.J.; ANDERSON, S.L.; MAY, B. Choice for methodology for assessing genetic impacts of environmental stressors: polymorphism and reproducibility of RAPD and AFLP fingerprints. **Ecotoxicology** 10: 239-244. 2001.

BECKER, P.; MOURE, J.S.; PERALTA, F.J.A. More about Euglossine bees in Amazonian forest fragments. **Biotropica** v. 23, p. 586-91. 1991.

BECKELHAMER R.C. Intraspecific genetic variation and haplodiploidy, eusociality, and polygyny in the Hymenoptera. **Evolution** v. 37, p. 540-545. 1983.

BICKEL T.O., BRÜHL C.A, GADAU J.R., HÖLLDOBLER B. E LINSENMAIR E. Influence of habitat fragmentation on the genetic variability in leaf litter ant populations in tropical rainforests of Sabah, Borneo. **Biodiv. Conserv.** v. 15, p. 157-175. 2006.

BICKHAM, J.W.; SANDHU, S.; HEBERT, P.D.N.; CHICKHI, L.; ATHWAL, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutat. Res.** v. 463, p. 33-51. 2000.

BLACK, B. RAPDFst 4.0.1. A Fortran Program estimate F_{st} and effective migration rates among subpopulations using RAPD-PCR files. Colorado State University. 1997.

BRAGA, P.I. Atração de abelhas polinizadoras de Orchidaceae com auxílio de iscas-odores na campina, campirana e floresta tropical úmida da região de Manaus. **Ciênc. Cult.** v. 28, 7. p. 767-773.

BROSE, U. Island biogeography of temporary wetland carabid beetle communities. **J. Biogeog.** v. 30, p. 879–888, 2003.

BRITO, C.M.; RÊGO, M.M.C. Community of male Euglossini bees (Hymenoptera: Apidae) in a secondary forest, Alcântara, MA, Brazil. **Braz. J. Biol.** v. 61, p. 631-638. 2001.

CAMERON, S.A. Phylogeny and biology of Neotropical orchid bees (Euglossini). **Ann. Rev. Entomol.** v. 49, p.377-404. 2004.

CARVALHO, A.O.R.; VIEIRA, L.G.E. Determinação das condições ótimas para análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Neotrop. Entomol.** v. 30: p. 593-600. 2001.

CASTRO, M.S. Bee fauna of some tropical and exotic fruits: potential pollinators and their conservation. In: KEVAN, P. & IMPERATRIZ FONSECA, V.L., **Pollinating Bees - The Conservation Link between Agriculture and Nature-Ministry of Environment**. Brasília. p. 275-288, 2002.

CHAPMAN, R.F. Digestion and absorption. In: **The Insects: Structure and Function**, 3a. ed. London: Hodder and Stoughton Ltd. pp. 66-83. 1982.

CHIAPPERO, M.B.; C. GARDENAL, N. Inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) markers and their use in population studies of *Calomys musculus* (Rodentia, Muridae), the reservoir of Argentine Hemorrhagic Fever. **Hereditas** v. 135, p.85-93. 2001.

CHIARELLO, A.G. Effects of fragmentation of the Atlantic forest on mammal communities in south-eastern Brazil. **Biol. Conserv.** 89:71-82. 1999.

CLARK, A.G.; LANIGAN, C.M.S. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. **Mol. Biol. Evol.** v. 10, p. 1096-1111. 1993.

COELHO, A.S.G. BOOD: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Software. Goiânia, UFG. 2000.

COOPER, M.L. Random amplified polymorphic DNA analysis of southern brown bandicoot (*Isoodon obesulus*) populations in Western Australia reveals genetic differentiation related to environmental variables. **Mol. Ecol.** v. 9, p. 469-479. 2000.

COSTA, J.P.O. **Avaliação da reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Cinco anos depois de seu reconhecimento pelo programa MaB, UNESCO**. Série Cadernos da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. CETESB. 1997.

CRESPI, B.J. Heterozygosity in the haplodiploid Thysanoptera. **Evolution** v. 45, p. 458-464. 1991.

CULLEN, L. Jr.; SCHMINK, M.; VALLADARES-PADUA, C.Y.; RODRIGUEZ MORATO, M.I. Agroforestry benefit zones: a tool for the conservation and management of Atlantic Forest fragments, São Paulo, Brazil. **Nat. Areas J.** v. 21, p. 346-356. 2001.

DEGEN, B.; ROUBIK, D.W. Effects of animal pollination on pollen dispersal, selfing and effective population size of tropical bees: a simulation study. **Biotropica** v. 3639-53. 2004.

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

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

DODSON, C.H. Ethology of some bees of the tribe Euglossini (Hymenoptera: Apidae). **J. Kansas Entomol. Soc.** v. 39, p. 607-629. 1966.

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

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

DRESSLER, R.L. Biology of orchid bees (Euglossini). **Annu. Rev. Ecol. Syst.** v. 13, p. 373-94. 1982.

ELTZ, T.; WITTHEN, W.M.; ROUBIK, D.W.; LINSENMAIR, K.E. Fragrance collection, storage, and accumulation by individual male orchid bees. **J. Chem. Ecol.** 25: 157-176. 1999.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Ann. Rev. Entomol. Syst.** V. 34, p. 487-515. 2003.

FERGUSON, A.; TAGGART, J.B.; PRODOHL, P.A.; McMEEL, O.; THOMPSON, C.; STONE, C.; MCGUINNITY, P.; HYNES, R.A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population, with special reference Salmo. **J. Fish. Biol.** v. 47, p. 103-126. 1995.

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

GARNER, A.; RACHLOW, J.L.; HICKS J.F. Patterns of Genetic Diversity and its Loss in Mammalian Populations. **Conservation Biology.** v. 19, 1215-1221. 2005.

GOMES, L.F.; BRITO, R.M.; POMPOLO, S.G.; CAMPOS, L.A.O. & PERUQUETTI, R.C. Karyotype and C- and G- banding patterns of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Hereditas** v. 128, p. 73-76. 1998.

GOULÃO, L.; CABRITA, L.; OLIVEIRA, C.M.; LEITÃO, J.M. Comparing RAPD and AFLP analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. Rapd and AFLP analysis of apples. **Euphytica** v. 119, p. 259-270. 2001.

GRAUR, D. Gene diversity in Hymenoptera. **Evolution** v. 39, p. 190-199. 1985.

GUTTMAN, S.I.; BERG, D. Changes in the genetic diversity of aquatic organisms in the great lakes: causes and consequences. **Setac News** p. 23-24. 1998.

HADRYŚ, H.; BALICK, M.; SCHIERWATER, B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Mol. Ecol.** v. 1, p. 55-63. 1992.

HAIG, S.M. Molecular contributions to conservation. **Ecology** v. 79, p. 413-425. 1998.

HARPER, G.L.; MCCLEAN, N.; GOULSON, D. Microsatellite markers to assess the influence of population size, isolation and demographic change in the genetic structure of the UK butterfly *Polyommatus bellargus*. **Mol. Ecol.** v. 12, p. 3349-3357. 2003.

HARRY, M.; ROBIN, S.; LACHAISE, D. Use of polymorphic genetic markers (RAPD) in evolutionary and applied entomology. **Ann. Soc. Entomol. France** v. 34, p. 9-32. 1998.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of population genetics**. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 1997. 542p.

HILLIS, D.M., MORITZ, C.; MABLE, B.K. (eds). **Molecular Systematics**, 2^a ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. 1996.

HOLSINGER, K. Edge effects. Disponível em: <http://darwin.eeb.uconn.edu/eeb310/lecture-notes/fragmentation/node1.html>. Acesso: dezembro 2005.

HUNT, G.J.; PAGE, R.E., Jr. Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. **Theor. Appl. Genet.** v. 85, p. 15-20. 1992.

IKEDA, M.; TANIGUCHI, N. Genetic variation and divergence in populations of ayu *Plecoglossus altivelis*, including endangered subspecies, inferred from PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA D-loop region. **Fisheries Science**. v.68,18-26, 2002.

ISABEL, N.; BEAULIEU, J.; THÉRIAULT, P.; BOUSQUET, J. Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. **Mol. Ecol.** v. 8, p. 477-483. 1999.

IUCN. Cuidando do Planeta Terra, uma estratégia para o futuro da vida. IUCN / PNUMA / WWF. 1991. 246p.

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

KEARNS, C.A. North American Dipteran Pollinators: Assessing their value and Conservation Status. **Conserv. Ecol.** v. 5: 1-9. 2001.

KERR, W.E. A variação do número de cromossomos na evolução dos Hymenoptera. **Scient. Genet.** v. 4, 3, p.182-190. 1952.

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

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

KIMURA, M.; WEISS, G.M. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation of genetic with distance. **Genetics** v. 49, p. 561-576. 1964.

KRAUS, F.B.; NEUMANN, P.; SCHARPENBERG, H.; van PRAAGH, J.; MORITZ, R.F.A. Male fitness of honeybee colonies (*Apis mellifera* L.). **J. Evol. Biol.** v. 16, p. 914-920. 2003.

KEYGHOBADY, N., ROLAND, J.; STROBECK, C. Genetic differentiation and gene flow among populations of the alpine butterfly, *Parnassius smintheus*, vary with landscape connectivity. **Mol. Ecol.** v. 14, p. 1897-1909. 2005.

KJØLNER, S.; SÅSTAD, S.M.; TABERLET, P.; BROCHMANN, C. Amplified fragment length polymorphism versus random amplified polymorphic DNA markers: clonal diversity in *Saxifraga cernua*. **Mol. Ecol.** 13:81-86. 2004.

LACADENA, J.R. **Genética**. 4^a ed. Universidad Complutense de Madrid, ciudad: Madrid. 1988. 1549p.

LAURANCE W. F.; LAURANCE S. G.; FERREIRA L. V.; RANKIN DE MERONA J. M.; GASCON C.; LOVEJOY T.E. Biomass collapse in Amazonian forest fragments. **Science** v. 278, p. 1117-1118. 1997.

LOXDALE, H.D.; LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. **Bull. Entomol. Res.** v. 88, 577-600. 1998.

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

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

MÄKI-PETÄYS, H.; ZAKHAROV, A.; VILJAKAINEN, L.; CORANDER J.; PAMILO P. Genetics changes associated to declining populations of *Formica* ants in fragmented Forest landscape. **Mol. Ecol.** v. 14, p.733-742. 2005.

MARTIN, G.B.; WILLIAMS J.G.K.; TANSKLEY, S.D. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 88, p. 2336-2340. 1991.

MATTNER, J.; ZAWKO, G.; ROSSETT, M.; KRAUSS, S.L.; DIXON, K.W.; SIVASITHAMPARAM, K. Conservation genetics and implications for restoration of *Hemigenia exilis* (Lamiaceae), a serpentine endemic from Western Australia. **Biol. Conserv.** v. 107, p. 37-45. 2002.

MICHEL-SALZAT, A.; CAMERON, S.A.; OLIVEIRA, M.L. Phylogeny of the orchid bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossini): DNA and morphology yield equivalent patterns. **Mol. Phylog. Evol.** v. 32, p. 309-323. 2004.

MICHENER, C.D. **The social behavior of the bees – A comparative study.** Cambridge, Harvard University Press. 1974. 404p.

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

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

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). **Bul. Mus. Para. Emílio Goeldi, sér. Zool.** v. 10, p. 95-105. 1994.

MORATO, E.F.; CAMPOS, L.A.O.; MOURE, J.S. Abelhas Euglossini (Hymenoptera: Apidae) coletadas na Amazônia Central. **Rev. Bras. Ent.** v. 36, p.767-771. 1992.

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

MULLIS, K.B; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.** v. 155, p.335-350. 1987.

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

NADIG, S.G.; LEE, K.L.; ADAMS, S.M. Evaluating alterations of genetic diversity in sunfish populations exposed to contaminants using RAPD assay. **Aquat. Toxicol.** v. 43, p. 163-178. 1998.

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

NEMÉSIO, A. Notes on the occurrence of an aberrant coloration in *Eulaema nigrata* (Hymenoptera: Apidae: Euglossina) in forest fragments in Southeastern Brazil. **Lundiana** v. 3, p.75-77. 2002.

NEMÉSIO, A. **Composição e riqueza em espécies e densidade populacional de machos de Euglossina (Hymenoptera: Apidae) de remanescentes florestais de Mata Atlântica no estado de Minas Gerais.** Dissertação (Mestrado em Ecologia, manejo e conservação). Universidade Federal de Minas Gerais, 146 p. 2004.

NEMÉSIO, A.; SILVEIRA, F.A. Deriving ecological relationships from geographical correlations between host and parasitic species: an example with orchid bees. **J. Biogeog.** v. 33, p. 91-97. 2006.

NIELSEN, E.E.; HANSEN, M.M.; LOESCHCKE, V. Genetic structure of European populations of *Salmo salar* L. (Atlantic salmon) inferred from mitochondrial DNA. **Heredity** v. 77, p. 351-358, 1996.

NORRIS, D.E.; SHURTLEFF, A.C.; TOURÉ, Y.T.; LANZARO, G.C. Microsatellite DNA polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae). **J. Medical Entomol.** v. 38, p. 336-340. 2001.

OLIVEIRA-FILHO, A.T.; FONTES, M.A.L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica** v. 32, 4. p. 793-810. 2000.

OSPINA-TORRES, R. Revisión de la morfología genital masculina de *Eulaema* (Hymenoptera: Apidae). **Rev. Biol. Trop.** v. 46, p. 749-762, 1998.

PACKER, L.; OWEN, R. Population genetics aspects of pollinator decline. **Conserv. Ecol.** v. 5, art. 4. [online] URL: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art4/>.

PAMILO, P.; CROZIER, R.H. Genetic variation in male haploids under deterministic selection. **Genetics** v. 98, p. 119-214. 1981.

PAULA, F.M. **Variabilidade e estrutura genética de populações de abelhas Euglossinae (Hymenoptera:Apidae) em fragmentos florestais no Norte do Paraná.**

Monografia Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. 52p. 2003.

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

PEREIRA-MARTINS S.R.; Biologia de *Eulaema nigrita*. 1. Construção de células, oviposição e desenvolvimento. **Papéis Avulsos Zool.** v. 37, p. 227-235. 1991a.

PEREIRA-MARTINS, S.R. "Biologia de *Eulaema nigrita*. 2. Atividades nidais. **Papéis Avulsos Zool.** v. 37, p. 237-243. 1991b.

PEREIRA-MARTINS, S.R.; KERR W.E. Biologia de *Eulaema nigrita*. 3 Inferências evolutivas. **Papéis Avulsos Zool.** v. 37, p. 245-250. 1991c.

PÉREZ, T.; ALBORNOZ, J.A.; DOMÊNGUEZ, A. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Mol. Ecol.** v. 7, p.1347-1357. 1998.

PERUQUETTI, R.C. CAMPOS, L.A.O., COELHO, C.D.P., ABRANTES, C.V.M. & LISBOA, L.C.O. Abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância, riqueza e aspectos biológicos. **Revta bras. Zool.** v. 16, p. 101-118. 1999.

POMPOLO, S.G.; TAKAHASHI, C.S.; KERR, W.E. Os cromossomos de *Eulaema nigrita* (Hymenoptera: Apidae, Euglossini) In: **Anais da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, São Paulo: USP, v. 38. 1986.

POWELL, A.H.; POWELL, G.N.N. Population dynamics of male euglossine bees in Amazonian forest fragments. **Biotropica** v. 19, p. 176-79. 1987.

RABOUAM, C., COMES, A.M.; BRETAGNOLLE, V.; HUMBERT, J-F.; PERIQUET, G.; BIGOT, Y. Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. **Mol. Ecol.** v. 8, p. 493-503. 1999.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Lett.**

Appl. Microbil., v. 1, p. 17-20. 1985.

RAMÍREZ, S.; DRESSLER, R.L.; OSPINA, M. Abejas euglosinas (Hymenoptera: Apidae) de la región Neotropical: Listado de especies con notas sobre su biología. **Biota Colombiana** v. 3, p. 7-118. 2002.

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

REBÊLO, J.M.M. **História natural das Euglossíneas. As abelhas das orquídeas.** São Luis: Lithograf Editora. 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. **Rev. Bras. Biol.** v. 51, p. 787-799. 1991.

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

ROHLF, F.J. **NTSYSpc, numeral taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1.** Exeter Software, Applier Biostatistics, Setauket, New York. 2000.

ROUBIK, D.W. Tropical pollinators in the canopy and understory: field data and theory for stratum preferences. **J. Insect Behav.** v. 6, p. 659-673. 1993.

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

RYMAN, N.; UTTER, F.; LAIKRE, L. Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. **Rev. Fish Biol. Fish.** v. 5, p. 417-446. 1995.

SANTOS, A.M.; SOFIA, S.H. Populações de *Eufriesea violacea* em dois fragmentos no norte do Paraná. **Anais do Encontro Sobre Abelhas** v. 5, p. 257. 2002a.

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 Scient.** v. 24, p. 375-381. 2002b.

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

SAVARD, J.L.; CLERGEAU, P.; MENNECHEZ, G. Biodiversity concepts and urban ecosystems. **Land. Urban Plann.** v. 48, p.131-142. 2000.

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

SIH, A.; JONSSON, B.G.; LUIKART, G. Habitat loss: ecological, evolutionary and genetic consequences. **Tree** v. 15, p. 132-134. 2000.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica: para as ciências do comportamento.** São Paulo: Ed. McGraw-Hill do Brasil, Ltda. 1981.

SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA, E.A.B. **Abelhas brasileiras. Sistemática e Identificação.** Ministério do Médio Ambiente PROBIO-PNUD. Fundação Araucária. Belo Horizonte, Brasil. 2002. 253 p.

SLATKIN, M.; BARTON, H.H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution** 43: 1349-1368. 1989.

SOARES, F.S.; MEDRI, M.E. 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: Edição dos Editores. pp. 69-79. 2002.

SOFIA, S.H.; SUZUKI, K.M. Comunidade de machos de abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em fragmentos florestais no Sul do Brasil. **Neotr. Entomol.** v. 33, p. 693-702. 2004.

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

SOFIA, S.H.; PAULA F.M.; SANTOS, A.M.; ALMEIDA F.S.; SODRÉ L.M.K. Genetic structure analysis of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae) populations from Southern Brazilian Atlantic rainforest remnants. **Genet. Mol. Biol.** v. 28, p. 479-484. 2005.

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

SNEATH, P.H.A.; SOKAL R.R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco, California: WH Freeman. 1973.

S.O.S MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS; INSTITUTO SÓCIO-AMBIENTAL. **Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período 1990/1995**. Fundação SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais e Instituto Sócio-ambiental, São Paulo, Brasil. 1998.

STOW, A.J.; BRISCOE, D.A. Impact of habitat fragmentation on allelic diversity at microsatellite loci in Cunningham's shink (*Egernia cunninghami*); a preliminary study. **Conserv. Genet.** v. 6, p. 455-459. 2005.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Tree** v. 15, 199-203. 2000.

TARELHO, Z.V.S. **Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea**. Ribeirão Preto, SP: FFCLRP-USP, Dissertação (Mestrado em Genética). 75 p. 1973.

TELLES, M.P.C.; RESENDE, V.L.; SOARES, T.N.; RODRIGUES, F.M.; JÁCOMO, A.T. A.; SILVEIRA, L. Avaliação do padrão de amplificação de marcadores moleculares em bandos de queixada (*Tayassu pecari*) do Parque nacional das Emas. **Ciênc. Anim. Brasil.** v. 4, p. 7-14. 2003.

TONHASCA, Jr. A.; BLACKMER J.L., ALBURQUERQUE, G.S. Within-habitat heterogeneity of euglossine bee populations: a re-evaluation of the evidence. **J. Trop. Ecol.** v. 18, p. 929-933. 2002.

TONHASCA, Jr. A.; ALBURQUERQUE, G.S.; BLACKMER J.L. Dispersal of Euglossine bees between fragments of the Brazilian Atlantic Forest. **J. Trop. Ecol.** v. 19, p. 99-102. 2003.

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

TORRES, E.; IRIONDO, J.M.; PÉREZ, C. Genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae): allozyme and RAPD analysis. **Am. J. Bot.** v. 90, p. 85-92. 2003.

TURNER, I.M.; CORLETT, R.T. The conservation value of small, isolated fragments of lowland tropical rain forest. **Tree** v. 11, p. 330-333. 1996.

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

VALLADARES-PADUA, C.; PADUA, S. M. Y CULLEN, L. Jr. Within and surrounding the Morro do Diabo State Park: biological value, conflicts, mitigation and sustainable development alternatives. **Environ. Sci. Policy** v. 5, p. 69-78. 2002.

WALDSCHMIDT, A.M.; LOPES, L.A.; MARCO J.R., P.; CAMPOS, L.A. Genetic of Euglossini bees (Hymenoptera) in fragments of the Atlantic forest in the region of Viçosa, MG. **Braz. J. Biol.** v. 65, p. 541-549. 2005.

WALKER, A.J., FORD L.; MAJERUS, M.E.N.; GEOGHEGAN, I.E.; BIRCH, N.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Characterisation of the mid-gut digestive proteinase activity of the two-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.) and its sensitivity to proteinase inhibitors. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 28:173-180. 1998.

WATTS, P.C.; ROUQUETTE, R.; SACCHERI, I.J.; KEMP, S.J.; THOMPSON, D.J. Molecular and ecological evidence for small-scale isolation by distance in an endangered damselfly, *Coenagrion mercuriale*. **Mol. Ecol.** v. 13, p. 2931-2945. 2004.

WELSH, J.; MACCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucl. Acids Res.**, v. 18, p. 7213-7218. 1990.

WHITLOCK, M.C.; McCAULEY, D.E. Indirect measures of gene flow and migration F_{ST} not equal to $1/(4Nm + 1)$. **Heredity** v. 82, p. 117-125. 1999.

WILCOX, B.A.; MURPHY, D.D. Conservation strategy: the effects of fragmentation on extinction. **Amer. Nat.** v. 125, p. 879-887. 1985.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK A.R.; LIVAK K.J.; RAFALSKI A.J.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.**, v. 18, p. 6531-6535. 1990.

WILLIAMS, N.H. The biology of orchids and euglossine bees, In: ARDITTI J. Orchid biology: reviews and perspectives, Ithaca, NY: Cornell Univ. p. 119-171.1982.

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

WILLIAMS, N.H.; WHITTEN, W.N. Orchid floral fragrance and male euglossine bees. Methods and advances in the last sesquidecade. **Biol. Bull.** v. 164, 355-395. 1983.

WINSTON, M.L. **The biology of the honeybee.** Cambridge, Massachussets: Harvard University Press. 1987.

WOLF, P.G.; DOCHE, B.; GIELLY, L.; TABERLET, P. Genetic structure of *Rhododendron ferrugineum* at a wide range of spatial scales. **J. Heredity** v. 95, p. 301-308. 2004.

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

WRIGHT, S. **Evolution and genetics of populations.** London: University of Chicago Press, 1978. 565p.

XU, C-Y.; ZHANG, W-J.; FU, C-Z.; LU, B-R. Genetic diversity of alligator weed in China by RAPD analysis. **Biodiv. Conserv.** v. 13, p. 637-645.

YAHNER, R.H.; MAHAN, C.G. Animal behavior in fragmented landscapes. In: GUTZWILLER K. (ed.). **Concepts and applications of landscape ecology in biological conservation.** New York: Springer-Verlag. pp. 266-285. 2002.

YEH, F.C.; BOYLE, T. Population genetic analysis of co-dominant and dominant marker and quantitative traits. **Belgian J. Bot.** v. 129, p.157. 1997.

ZAYED, A.; ROUBIK, D.W.; PACKER, L. Use of diploid male frequency data as an indicator of pollinator decline. **Proc. R. Soc. Lond. (suppl.), Biol. Lett.** 2003.

ZAR, J.H. Biostatistical analysis. 3a. ed. MACELROY, W.D. e SWANSON, C.P. New Jersey: Prentice Hall. 1996. 663 p.

ZUCCHI, R.; OLIVEIRA, B.M.; CAMARGO, J.M.F. Biological observations on a tropical parasocial bee, *Eulaema nigrita*, with a review on the biology Euglossinae

(Hymenoptera: Apidae) A comparative study. **J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Series IV Zool.** v. 17:271-380. 1969.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)