



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA**

---

**FRANCIELLY MEDEIROS DE OLIVEIRA**

**Diversidade genética de *Euglossa pleosticta*  
(Hymenoptera: Apidae) de sete fragmentos florestais no  
norte do Paraná, sul do Brasil**

---

**LONDRINA  
2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.



**Universidade Estadual de Londrina**



**Instituto Agronômico do Paraná**



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

---

**FRANCIELLY MEDEIROS DE OLIVEIRA**

**Diversidade genética de *Euglossa pleosticta*  
(Hymenoptera: Apidae) de sete fragmentos florestais no  
norte do Paraná, sul do Brasil**

---

LONDRINA  
2009

**FRANCIELLY MEDEIROS DE OLIVEIRA**

**Diversidade genética de *Euglossa pleosticta*  
(Hymenoptera: Apidae) de sete fragmentos florestais no  
norte do Paraná, sul do Brasil**

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

Orientadora: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Helena Sofia**

**LONDRINA  
2009**

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

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

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

Orientador: Silvia Helena Sofia.  
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2009.  
Inclui bibliografia.

1. Abelha – Diversidade genética – Teses. 2. Marcadores moleculares – Teses. 3. Diversidade biológica – Conservação – Teses. I. Sofia, Silvia Helena. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

**Diversidade genética de *Euglossa pleosticta*  
(Hymenoptera: Apidae) de sete fragmentos florestais no  
norte do Paraná, sul do Brasil**

Banca Examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Helena Sofia (Orientadora)  
Depto. de Biologia Geral / UEL

Profa. Dra. Claudete de Fátima Ruas  
Depto. de Biologia Geral / UEL

Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza  
Depto. de Biologia Geral / UEL

Londrina, 30 de março de 2009.

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

## *AGRADECIMENTOS*

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

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

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

À profa. Dra. Claudete de Fátima Ruas e prof. Dr. Rogério Fernandes, membros da banca examinadora, pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho e pelas valiosas sugestões que foram dadas durante o Exame de Qualificação;

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

À Sueli Miranda, Secretaria do Programa de Pós-Gradua o em Genética e Biologia Molecular.

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

Aos meus amigos do Lagea: Yuldi, Natália, Rafa, Vanessa, Carla, Dalita, Cacondi, Bruna e Carol; em especial, a todos os

abelhudos - Karen, Douglas, Gabi, Alessandra, Leandro, Stéphaney, Bruno e Olavo - por todo o auxílio prestado.

Ao meu amigo Leandro pela amizade, carinho e cumplicidade.

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

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

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

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

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

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

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

Aos meus tios Paulo e Florinda pela ajuda e carinho.

A toda a minha família: Minha Vózinha Lourdes, meus tios João, Cláudio, Dó, Ademir, Rock... Tias Neuzi, Silvia, Fia,

Preta, Fátima... Primos Jean, Carlos, Rafael, Ralph Serginho... Primas Michele, Vanessa, Paola, Pâmela, Manu, Mariana, Dani e Madrinha Zilda pelo amor e carinho. À Margarethe por estar sempre ajudando a minha mãe durante a minha ausência.

Ao meu irmão que eu amo demais;

Ao meu Pai Alecio...

À Deus, Obrigada por Tudo!!!

1 OLIVEIRA, FRANCIELLY MEDEIROS, DE. **Diversidade genética de *Euglossa***  
2 ***pleosticta* (Hymenoptera: Apidae) de sete fragmentos florestais no norte do**  
3 **Paraná, sul do Brasil.** 2009. Dissertação de Mestrado Em Genética e Biologia  
4 Molecular. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

## 7 **Resumo**

9 As abelhas Euglossini apresentam distribuição intrínseca aos neotrópicos, onde são  
10 polinizadores importantes de um grande número de famílias de plantas. *Euglossa pleosticta*  
11 Dressler é uma espécie com ocorrência relatada exclusivamente para o território brasileiro,  
12 onde mostra uma ampla distribuição geográfica. Apesar de ser um constituinte importante  
13 das comunidades de Euglossini em remanescentes de Mata Atlântica no sul e sudeste do  
14 Brasil, não existem ainda estudos sobre a diversidade genética de populações de *E.*  
15 *pleosticta* presentes nos remanescentes deste bioma brasileiro tão severamente ameaçado.  
16 Neste estudo a diversidade genética de populações de *E. pleosticta* de sete fragmentos de  
17 florestais, localizados no estado do Paraná, foi investigada por meio de marcadores PCR-  
18 RFLP e microssatélites, obtidos a partir da análise de 157 machos desta espécie. Nas  
19 análises de PCR-RFLP, amplicons do gene 16S-(rDNA) e da região entre os genes  
20 citocromo C oxidase I e II (COI-COII) do DNAmT de *E. pleosticta* foram cortados com as  
21 endonucleases *Asel*, *DraI* e *SspI*, resultando em nove haplótipos-compostos, dos quais  
22 quatro foram haplótipos exclusivos. Nas análises de microssatélites foram amplificados sete  
23 locos, resultando na identificação de 57 alelos, os quais variaram em número de seis a dez  
24 alelos por loco amplificado. A análise de variância molecular (AMOVA), aplicada aos dados  
25 mitocondriais, indicou estruturação não significativa e ausência de variação genética entre  
26 as sete amostras analisadas. Os valores estimados de divergência de nucleotídeos ( $\delta$ ), de  
27 0,0000 a 0,0420, indicam baixa divergência de nucleotídeos entre as amostras. De modo  
28 distinto, as análises de microssatélites, revelaram uma partição significativa na variação  
29 genética entre os grupos de abelhas dos sete fragmentos florestais, com valores de  $F_{ST}$   
30 (0,036 - 0,169) indicativos de baixa a alta diferenciação genética entre os 21 pares de  
31 amostras analisados. A falta de estruturação genética entre as amostras de *E. pleosticta*,  
32 revelada pelos marcadores mitocondriais, parece ser decorrente da maior conservação do  
33 genoma mitocondrial quando comparado às regiões de microssatélites. Os resultados  
34 sugerem que a fragmentação da Mata Atlântica na região estudada resultou na ocorrência  
35 de subpopulações de *E. pleosticta* nesta região.

36  
37 **Palavras-chave:** Euglossini, *Euglossa pleosticta*, fragmentos florestais, microssatélites,  
38 DNA mitocondrial.

1 OLIVEIRA, FRANCIELLY MEDEIROS, DE. **Genetic diversity of *Euglossa***  
2 ***pleosticta* (Hymenoptera: Apidae) from seven Forest fragments in northern**  
3 **Paraná, southern Brazil.** 2009. Dissertation of Postgraduation (Masters) In Genetic  
4 and Molecular Biology. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.  
5

### 6 **Abstract**

7  
8 The Euglossini bees show an intrinsic distribution to neotropics, where they are important  
9 pollinators of many plant families. *Euglossa pleosticta* Dressler is a euglossine bee found  
10 exclusively in Brazilian territory, where this species shows a wide geographic distribution.  
11 Despite these bees constitute an important component of the Euglossini fauna in Atlantic  
12 Forest remnants in southern and southeastern Brazil, there is no information about the  
13 genetic diversity of *E. pleosticta* populations present throughout this severely threaten  
14 Brazilian biome. In this study, the genetic diversity of *E. pleosticta* from seven forest  
15 fragments in northern Paraná state was investigated using PCR-RFLP and microsatellites  
16 markers, produced by the analysis of 157 males of this species. In the PCR-RFLP analysis,  
17 amplicons of gene 16S-(rDNA) and the region between cytochrome oxidase I and II (COI-  
18 COII) genes of mtDNA were cut with enzymes *Asel*, *DraI* e *Sspl*, resulting in nine composite-  
19 haplotypes, four of which were exclusive haplotypes. The microsatellites analysis involved  
20 the amplification of seven loci and identification of 57 alleles, which varied in number from 6  
21 to 10 per loci. The analysis of molecular variance (AMOVA), applied to PCR-RFLP markers,  
22 showed no significant structuring of genetic variation among the seven samples analyzed. A  
23 low nucleotide divergence ( $\delta$ ), with values varying from 0.0000 to 0.0420, was also detected  
24 among these samples. In contrast, the microsatellites analysis revealed a significant partition  
25 in the genetic variation among all *E. pleosticta* samples, with values of  $F_{ST}$  (0,036 - 0,169)  
26 indicating genetic differentiation varying from low to high between pairs of samples. The  
27 absence of genetic differentiation between pairwise samples revealed by mitochondrial  
28 markers could be attributed to the higher conservation of this genome compared to  
29 microsatellites regions. The present findings suggest that the Atlantic Forest fragmentation  
30 across the studied region determined the occurrence of subpopulations of *E. pleosticta* in this  
31 region.  
32

33 **Key Words:** Euglossini, *Euglossa pleosticta*, forest fragments, microsatellites, mtDNA

## SUMÁRIO

<b>I. Introdução</b>	01
<b>II. Objetivos</b>	11
II.1 Objetivo Geral	11
II.2 Objetivos Específico	11
<b>III. Artigo</b>	12
Resumo	14
1. Introdução	15
2. Material e Métodos	17
2.1. Áreas de Estudo	17
2.2. Coleta das Abelhas e Extração de DNA	21
2.3 Marcadores PCR - RFLP e Microsatélites	22
2.4 Análises dos dados	24
3. Resultados e Discussão	26
Agradecimentos	44
4. Referências	45
<b>IV. Conclusões</b>	51
<b>V. Referências Bibliográficas</b>	52

## 1 I. Introdução

2  
3 Após um longo período de destruição, a Mata Atlântica encontra-se reduzida  
4 à cerca de 7% da floresta original. Esta é considerada a segunda maior formação de  
5 floresta tropical da América do Sul, sendo reconhecida por sua alta biodiversidade e  
6 endemismos (DI BITTETI et al., 2003; TONHASCA et al., 2003). Em ecossistemas  
7 tropicais, como é o caso da Floresta Atlântica, a diversidade de espécies vegetais é  
8 extremamente alta quando comparada com a de outras regiões (WILSON, 1988  
9 *apud* SCHLINDWEIN, 2000).

10 No Paraná, sul do Brasil, as áreas de florestas foram ocupadas para a  
11 formação de cidades e desenvolvimento da agricultura, causando a devastação da  
12 Mata Atlântica. Atualmente, a região norte do estado do Paraná possui apenas entre  
13 2 e 4% de sua cobertura vegetal original (SOARES; MEDRI, 2002; TOREZAN,  
14 2002).

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

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

1 do habitat em busca de recursos escassos, como por exemplo, recursos alimentares  
2 com disponibilidade variável no tempo e no espaço (PRIMACK; RODRIGUES,  
3 2001).

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

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

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

1            Apesar de serem abelhas aparentemente sensíveis à fragmentação de  
2 habitats, particularmente em áreas de Mata Atlântica, ainda são poucos os relatos  
3 dos efeitos da fragmentação sobre a fauna de Euglossini (PERUQUETTI et al.,  
4 1999; TONHASCA; ALBUQUERQUE; BLACKMER; 2003; SOFIA et al., 2005;  
5 AGUIAR; GAGLIANONE, 2008). Alguns estudos têm indicado que a riqueza e a  
6 diversidade das comunidades de Euglossini podem ser afetadas de forma  
7 significativa pelo tamanho do fragmento e da cobertura e condições de conservação  
8 destes (SOFIA; SUZUKI, 2004; AGUIAR; GAGLIANONE, 2008). Foi demonstrado  
9 recentemente que a abundância destas abelhas se mostrou positivamente  
10 correlacionada com o tamanho dos fragmentos florestais estudados e negativamente  
11 relacionada com a forma (razão borda:área) destes (BROSI, 2009). Ainda segundo  
12 este autor, a fragmentação florestal parece afetar mais intensamente a fauna de  
13 Euglossini do que outros grupos de abelhas. A conservação mais efetiva destas  
14 abelhas aparentemente requer a presença de áreas de florestas (BROSI et al.,  
15 2008).

16            As Euglossini são abelhas reconhecidamente dotadas de grande capacidade  
17 de vôo (JANZEN, 1971). Embora áreas desmatadas possam constituir barreiras para  
18 o deslocamento de algumas espécies desta tribo (POWELL; POWELL, 1987), vários  
19 estudos mostram que tais abelhas são capazes de se deslocar entre fragmentos  
20 florestais (RAW, 1989; TONHASCA; ALBUQUERQUE; BLACKMER, 2003) ou  
21 mesmo transpor distâncias de cerca de 500 m sobre corpos d'água separando, por  
22 exemplo, ilha e continente (MURREN, 2002). Tonhasca, Albuquerque e Blackmer  
23 (2003) observaram que diversas espécies de Euglossini transitam livremente entre  
24 remanescentes maiores de floresta e fragmentos de mata espalhados em áreas de  
25 pastagens. Contudo, não se sabe exatamente qual a distância limite para os  
26 deslocamentos das diferentes espécies em ambientes fragmentados. Encontra-se  
27 bem estabelecido na literatura que fragmentos florestais podem funcionar como ilhas  
28 ou trampolins, contribuindo para o deslocamento de animais e manutenção do fluxo  
29 gênico das populações presentes em ambientes fragmentados (DI BITTETI et al.,  
30 2003; METZGER, 2004). Contudo, se de algum modo a fragmentação de habitats  
31 inibir ou limitar o fluxo gênico entre as abelhas de fragmentos florestais distintos,  
32 pode-se esperar em longo prazo um declínio na variação genética das populações  
33 afetadas de abelhas (MORATO, 1998). Tal possibilidade torna-se um problema  
34 ainda mais preocupante quando se considera o fato de que estudos têm mostrado

1 que diversas espécies de Hymenoptera apresentam normalmente uma variação  
2 genética menor quando comparada a insetos de outros grupos (BERKEHALMER,  
3 1983; GRAUR, 1985; CRESPI, 1991; SHOEMAKER et al., 1992; PACKER; OWEN,  
4 2001). Dentre os himenópteros, as abelhas, vespas e formigas são elementos  
5 fundamentais dos ecossistemas terrestres, onde desempenham papéis ecológicos  
6 importantes em ecossistemas naturais e agrícolas (ZAYED; PACKER, 2005). Neste  
7 grupo de insetos as abelhas destacam-se como polinizadores e são, na atualidade,  
8 foco de atenção em diversos estudos, os quais têm apontado um declínio mundial  
9 na diversidade e abundância de tais insetos (WILLIAMS; MINCKLEY; SILVEIRA,  
10 2001; STEFFAN-DEWENTER; POTTS; PACKER, 2005).

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

33 Uma das características dos himenópteros é o sistema haplodiplóide de  
34 determinação de sexo, no qual fêmeas se desenvolvem de ovos fecundados, sendo,

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

16 Enquanto em insetos diplóides o sexo de um indivíduo é determinado por um  
17 balanço entre cromossomos sexuais e autossômicos, os cromossomos sexuais  
18 propriamente ditos não ocorrem em himenópteros, sendo desta forma difícil de  
19 justificar para tais insetos o modelo de balanço cromossômico na determinação  
20 sexual (UNRUH; MESSING, 1993). Na verdade, o modo de determinação sexual  
21 experimentalmente demonstrado nestes insetos é o mecanismo de alelos (sexuais)  
22 múltiplos (ou mecanismo de Whiting) (WILSON, 1971; UNRUH; MESSING, 1993).  
23 Atualmente, o mecanismo proposto, e mais amplamente aceito, para explicar a  
24 determinação sexual em himenópteros, baseado nos estudos de P.H Whiting, é o da  
25 determinação sexual por um único loco, apresentando uma variedade de alelos  
26 (sexuais) ou si-CSD (do inglês *single-locus complementary sex determination*)  
27 (ZAYED; PACKER, 2005). Em tal mecanismo, indivíduos diplóides heterozigotos  
28 desenvolvem-se em fêmeas e haplóides (hemizigotos) em machos. Este mecanismo  
29 já foi demonstrado para várias espécies de abelhas (UNRUH; MESSING, 1993).  
30 Entretanto, se em homozigose, nos cromossomos materno e paterno, os alelos  
31 sexuais resultarão no desenvolvimento de um macho diplóide (indivíduo homozigoto  
32 diplóide, portanto) (WILSON, 1971; COOK, 1993). Em razão de machos diplóides  
33 serem não funcionais (estéreis) e com baixo valor adaptativo, existe uma forte

1 seleção contra estes e ao mesmo tempo uma seleção para uma alta diversidade de  
2 alelos sexuais.

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

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

1 afetam, como tamanho efetivo da população, fluxo gênico e sistemas de  
2 acasalamento. Os níveis de fluxo gênico da população também auxiliam na análise  
3 da intensidade em que a fragmentação impede a troca gênica entre as populações  
4 (PEREZ-SWEENEY; RODRIGUES; MELNICK, 2004).

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

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

25 O motivo para o elevado polimorfismo alélico relaciona-se ao fato de a taxa de  
26 mutação em regiões de microssatélite ser mais alta do que em outras partes do  
27 genoma, com variação de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  nucleotídeos por loco, por geração. Erros  
28 durante a recombinação, *crossing-over* desigual e deslizamento da polimerase na  
29 replicação ou no reparo do DNA podem explicar esta alta taxa de mutação  
30 (OLIVEIRA et al., 2006). Em consequência deste fato, particularmente, dentro do  
31 conjunto de técnicas que se utilizam da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR),  
32 atualmente, a técnica de microssatélites é a mais difundida na análise de  
33 polimorfismos (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001).

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

7 O fator limitante para o emprego da técnica de microssatélites é a  
8 disponibilidade de informação (em termos de sequências de nucleotídeos) a respeito  
9 das regiões que possuam repetições para o organismo que se deseja estudar  
10 (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001; OLIVEIRA et al., 2006). Mas, pesquisas  
11 mostram que pares de *primers* determinados para uma espécie podem ser utilizados  
12 em outras espécies do mesmo gênero ou para espécies de gêneros próximos da  
13 mesma família, possibilitando a redução de custos elevados que o desenvolvimento  
14 de *primers* específicos de microssatélites muitas vezes impõe (OLIVEIRA et al.,  
15 2006). Em um estudo recente, Souza et al. (2007) desenvolveram vários *primers* de  
16 microssatélites com base no genoma de duas espécies de abelhas Euglossini. Tais  
17 *primers* se mostraram eficientes para amplificação de diferentes locos polimórficos  
18 de microssatélites em diversas espécies do grupo.

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

31 De acordo com Arias, Francisco e Silvestre (2003), nas décadas de 1970-80,  
32 a molécula de DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) passou a fazer parte de muitos estudos  
33 envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas e o entendimento de vários  
34 aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos (cf.

1 HILLIS; MORITZ; MABLE, 1996; AVISE, 2004). O conhecimento de diversas  
2 sequências de DNAm<sub>t</sub> de vários filos levou ao desenvolvimento de *primers*  
3 universais, que permitem o acesso ao genoma do DNAm<sub>t</sub> de espécies  
4 desconhecidas, o sequenciamento e a comparação de genes homólogos de  
5 espécies próximas e de populações de uma dada espécie (PALUMBI, 1996).

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

24 Em abelhas estes dois genes mitocondriais têm sido utilizados para estudos  
25 da estrutura genética de diferentes espécies, mas principalmente em estudos  
26 envolvendo a abelha *Apis mellifera* vários estudos têm se baseado em marcadores  
27 mitocondriais para o estudo da estrutura genética de populações (HALL; SMITH,  
28 1991; BOUGA et al., 2005; COLLET; ARIAS; DEL LAMA, 2007; LÓPEZ-URIBE; DEL  
29 LAMA, 2007). Além disto, a região intergênica COI-COII tem também sido objeto de  
30 análise em estudos com populações de abelhas (COLLET et al., 2006; INSUAN et  
31 al., 2007). Na maioria destes estudos a técnica de PCR-RFLP foi a principal técnica  
32 utilizada para a obtenção dos marcadores moleculares, técnica esta que tem se  
33 mostrado eficiente em estudo de populações de abelhas (BOUGA et al., 2005;  
34 COLLET; ARIAS; DEL LAMA, 2007).

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

9

## 1 II. Objetivos

### 3 II.1. Objetivo geral

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

### 10 II.2. Objetivos específicos

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

25

1 **III. Artigo**

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12 Diversidade Genética de Abelhas *Euglossa pleosticta* (Hymenoptera, Apidae) de  
13 Sete Fragmentos de Mata no norte do Paraná, sul do Brasil

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29 Trabalho a ser submetido ao Periódico *Genetics and Molecular Biology*

30

31

32

1 **Diversidade genética de abelhas *Euglossa pleosticta* (Hymenoptera, Apidae,**  
2 **Euglossini) de sete fragmentos de mata no norte do Paraná, sul do Brasi**

3

4 Francielly M. de Oliveira, Alessandra N. Alves, Gabriele A. Freiria e Silvia H. Sofia \*

5

6 *Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de*  
7 *Biologia Geral, Londrina, PR, Brasil.*

8

9 Título resumido: Diversidade genética de *E. pleosticta*

10

11 *Palavras-chave:* DNAm, estrutura genética, Mata Atlântica, PCR-RFLP,  
12 microssatélites

13

14 \***Autor para correspondência**

15 Silvia Helena Sofia

16 Universidade Estadual de Londrina

17 Centro de Ciências Biológicas

18 Departamento de Biologia Geral

19 Caixa Postal 6001, 86051-990

20 Londrina, Paraná, Brasil

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

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

23

## 1 **Resumo**

2  
3  
4 Neste estudo a diversidade genética de populações de *Euglossa pleosticta* de  
5 sete fragmentos de Mata Atlântica foi investigada por meio de marcadores PCR-  
6 RFLP e microssatélites, obtidos a partir da análise de 157 machos desta espécie.  
7 Nas análises de PCR-RFLP, amplicons das regiões 16S-(rDNA) e COI-COII do  
8 DNAm<sub>t</sub> foram cortados com as endonucleases *Asel*, *DraI* e *SspI*, resultando em  
9 nove haplótipos-compostos. Nas análises de microssatélites foram amplificados sete  
10 locos, resultando na identificação de 57 alelos distintos. A AMOVA, realizada a partir  
11 dos dados de PCR-RFLP, indicou estruturação não significativa na variação genética  
12 das amostras analisadas, com 100% da variação dentro dos grupos. Os valores  
13 estimados de divergência de nucleotídeos ( $\delta$ ), de 0,0000 a 0,0420, indicou baixa  
14 divergência de nucleotídeos entre as amostras. De modo distinto, as análises de  
15 microssatélites, indicaram uma partição significativa na variação genética entre os  
16 grupos de abelhas dos sete fragmentos florestais, com valores de  $F_{ST}$  (0,036 - 0,169)  
17 indicativos de baixa a alta diferenciação genética entre os 21 pares. Os resultados  
18 para os locos de microssatélites analisados sugerem possíveis efeitos de deriva  
19 genética, restrição do fluxo gênico, aumento da endogamia ou ainda efeitos de  
20 gargalo de garrafa entre as abelhas dos diferentes fragmentos, reforçando a  
21 necessidade de uma maior atenção à estrutura genética da população de *E.*  
22 *pleosticta* em toda a região estudada para uma melhor conservação da diversidade  
23 genética.

## 1 **Introdução**

2

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

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

15 Nos últimos anos, alguns trabalhos têm demonstrado o efeito negativo da  
16 fragmentação sobre as populações de Euglossini (Aguiar e Gaglianone, 2008; Brosi,  
17 2009; Giangarelli *et al.*, 2009). Além disto, embora tenha sido demonstrado que  
18 algumas espécies desta tribo sejam capazes de transpor áreas desmatadas (Raw,  
19 1989; Tonhasca *et al.*, 2003) e coletar fragrâncias fora dos limites dos fragmentos  
20 (Milet-Pinheiro e Schlindwein, 2005), aparentemente áreas fragmentadas podem  
21 constituir barreiras para determinadas espécies, impedindo o deslocamento destas  
22 para áreas circunvizinhas (Powell e Powell, 1987; Morato, 1994; Peruquetti *et al.*,  
23 1999). Tal fato poderia resultar na redução do fluxo gênico e da variabilidade  
24 genética, com um possível comprometimento a longo prazo da sobrevivência destas  
25 populações (Morato, 1998) e de populações de outras espécies, podendo gerar um

1 efeito cascata nesses ecossistemas, devido a diminuição da capacidade adaptativa  
2 e conseqüentemente, resultando na extinção de tais populações.

3 Nas últimas décadas, várias técnicas moleculares têm sido empregadas como  
4 ferramentas no estudo da biodiversidade molecular de diferentes organismos, as  
5 quais vêm demonstrando um alto potencial para estimar o efeito da fragmentação  
6 dos habitats e a estruturação genética das populações (Waldschmidt *et al.*, 2005).  
7 Algumas destas técnicas são baseadas nas análises do DNA mitocondrial (DNAmt)  
8 dos animais investigados, enquanto outras se baseiam na análise no genoma total  
9 do organismo (Awise, 2004; Chenuil, 2006). Alguns estudos genéticos de populações  
10 têm combinado o uso de marcadores nucleares e análises do genoma mitocondrial,  
11 obtendo resultados positivos, principalmente porque estes dois marcadores revelam  
12 diferentes tipos de informação, tanto na capacidade de encontrar diferenciação  
13 genética, como também de detectar diferentes processos ecológicos e evolutivos  
14 (Haavie *et al.*, 2000).

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

1           Em áreas de Mata Atlântica, ainda são poucos os relatos dos efeitos da  
2 fragmentação sobre a fauna de Euglossini (Peruquetti *et al.*, 1999; Tonhasca *et al.*,  
3 2003). No sul e sudeste do Brasil, *Euglossa pleosticta* é um constituinte importante  
4 das comunidades de Euglossini em remanescentes deste bioma, sendo uma das  
5 espécies de ocorrência normalmente frequente. Apesar disto, não existem ainda  
6 estudos sobre a diversidade genética de populações desta espécie. Assim, o  
7 presente trabalho teve como objetivo investigar, com base em marcadores  
8 moleculares mitocondriais e nucleares, a diversidade genética de populações de *E.*  
9 *pleosticta* de sete fragmentos de Mata Atlântica no norte do estado do Paraná, sul  
10 do Brasil. Para a obtenção dos marcadores genéticos foram empregadas as técnicas  
11 de PCR-RFLP e microssatélites, duas técnicas moleculares que têm se mostrado  
12 eficazes para o estudo da estrutura genética de populações de diferentes espécies  
13 de abelhas (Widmer e Schmid-Hempel, 1999; Collet *et al.* 2006; Insuan *et al.*, 2007).

14

## 15 **2. Materiais e Métodos**

16

### 17 2.1. Áreas de estudo

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

23           Dos sete fragmentos estudados, o maior em tamanho (fragmento A), constitui  
24 uma reserva governamental (Parque Estadual “Mata dos Godoy”), com cerca de 580  
25 ha de floresta madura ainda bastante conservada, que forma junto com outros

1 fragmentos de mata fora dos limites da reserva, um grande fragmento florestal, com  
2 cerca de 2800 ha (Sofia *et al.*, 2005). Outros quatro fragmentos estudados  
3 constituem reservas de mata em propriedades rurais particulares, são estes:  
4 fragmentos B, C, D e E com tamanhos variando de 180 a 14,6 ha (Tabela 1). Com  
5 exceção do fragmento B, com 170 ha de vegetação originalmente nativa ainda  
6 preservada, os outros quatro fragmentos de mata privados apresentam a vegetação  
7 consideravelmente alterada e representada por mata secundária. Todos estes cinco  
8 fragmentos encontram-se circundados por áreas agrícolas ou pastagens, que  
9 avançam até a borda destes fragmentos. Os últimos dois fragmentos estudados  
10 (fragmentos F e G) encontram-se localizados em área urbana, sendo o fragmento F  
11 uma reserva governamental (Parque Municipal “Arthur Thomas”), com 66 ha e o  
12 fragmento G, uma mata de 13,4 ha, localizada no campus da Universidade Estadual  
13 de Londrina cuja vegetação foi consideravelmente modificada por ação antrópica  
14 (Tabela 1). As distâncias aproximadas entre os sete fragmentos estão indicadas na  
15 (Tabela 2).

16

17

18

19

20

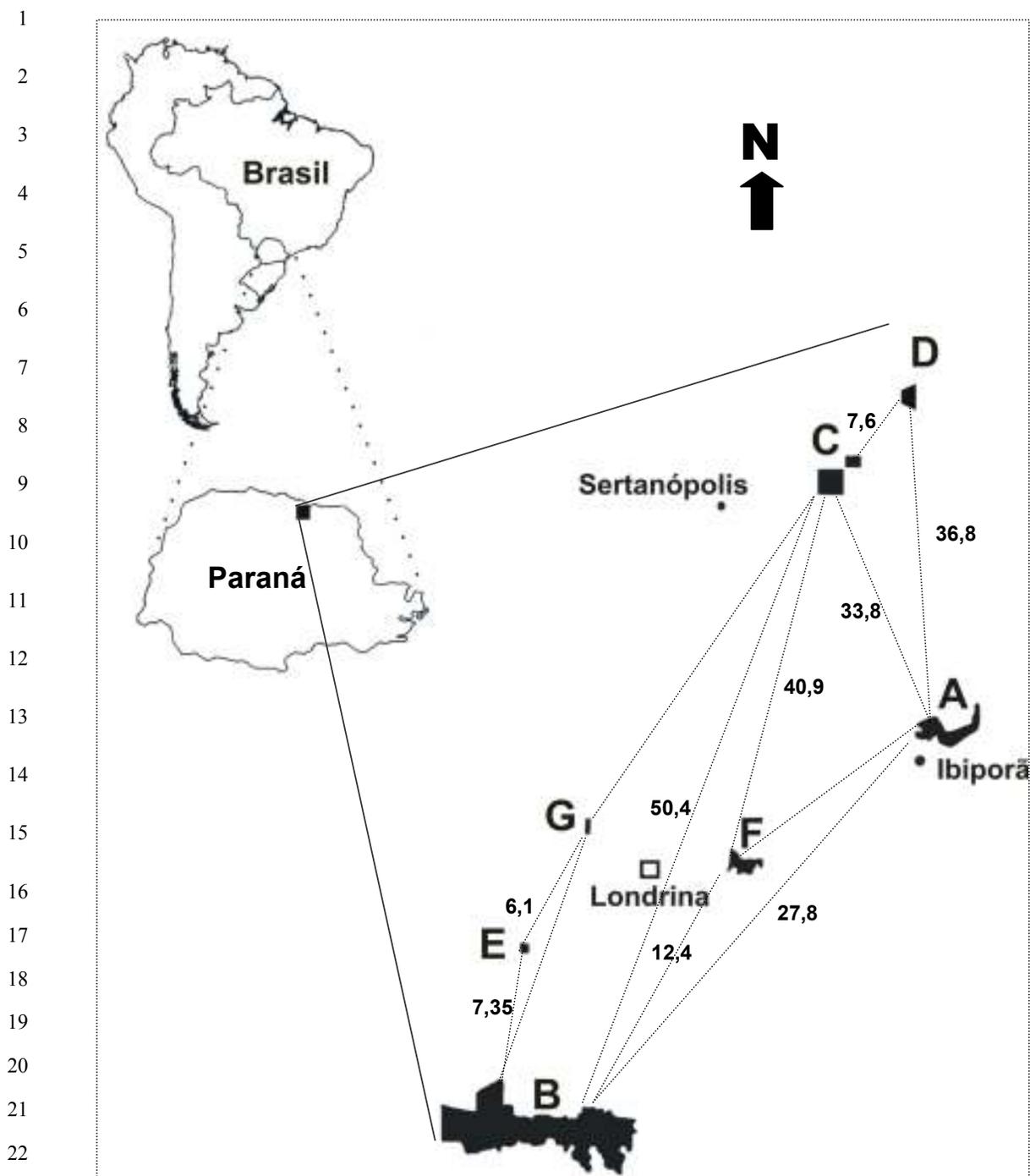
21

22

23

24

25



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

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

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

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

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

2

3

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

11

12

13 **2.2. Coleta das abelhas e extração de DNA**

14 A captura dos machos teve como base a metodologia descrita por Sofia e

15 Suzuki (2004). Para a atração das abelhas, foram utilizadas iscas-odores de três

16 essências químicas, eucaliptol, eugenol e vanilina, as quais têm se mostrado

17 eficientes na atração de machos de Euglossini na região estudada (Sofia *et al.*,

18 2004) Os machos atraídos às iscas foram coletados com uma rede entomológica e

19 acondicionados vivos em frascos individuais. O material coletado foi identificado no

20 laboratório sob estereomicroscópio (Zeiss), com base em uma coleção de referência.

21 Após a identificação, as abelhas foram mantidas em *freezer*, à temperatura de –

22 20°C, até a extração do DNA total.

23 Foi analisado um número variando de 20 a 24 machos de *E. pleosticta* de

24 cada fragmento florestal, totalizando 157 indivíduos (Figura 2). Antes das extrações

25 as abelhas foram lavadas em álcool 70% para a remoção de contaminantes, como

26 pólen ou fungos. O DNA total das amostras foi extraído por meio de três lavagens

sucessivas em: fenol; fenol/clorofórmio/álcool isoamílico; e, clorofórmio/álcool

1 isoamílico conforme metodologia descrita por Sofia *et al.* (2005). O material obtido  
2 da extração foi ressuspenso em 100  $\mu\text{L}$  de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e  
3 armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

4

### 5 2.3. Marcadores PCR - RFLP e Microsatélites

6

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

10 Para a obtenção de marcadores PCR-RFLP foram amplificadas as regiões  
11 16S (rDNA) e intergênica COI-COII do genoma mitocondrial das abelhas. Os pares  
12 de *primers* 16SWb (3'-CACCTGTTTATCAAAAACAT-5') (Dowton e Austin, 1994) e  
13 874-16S (3'-TATAGATAGAAACCAATCTG-5') (Cameron *et al.*, 1992) e, 5'-  
14 TCTATACCACGACGTTATTC-3' e 5'-GATCAATATCATTGATGACC-3' (Hall e Smith,  
15 1991), desenvolvidos para a espécie de abelha *Apis mellifera*, foram empregados  
16 para as ampliações das regiões 16S e COI-COII, respectivamente.

17 As reações de amplificação das regiões 16S e entre os genes COI-COII,  
18 foram produzidas em um volume total de  $25\ \mu\text{L}$ , contendo a concentração tampão de  
19 reação 1x,  $0,2\ \mu\text{M}$  de dNTP, 3 mM de  $\text{MgCl}_2$ ,  $0,5\ \mu\text{M}$  de cada *primer*, 1,5 U de Taq  
20 polimerase (VJR), 10 ng de DNA e água ultrapura para completar o volume da  
21 reação. As ampliações ocorreram em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.)  
22 e o protocolo de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a  $94^{\circ}\text{C}$  por 4  
23 min, seguida de 35 ciclos de 30 s a  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s a  $42^{\circ}\text{C}$  e 45 s a  $64^{\circ}\text{C}$ ; com uma  
24 extensão final de 4 min a  $72^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, alíquotas dos produtos da PCR  
25 foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% e tampão de corrida TBE

1 (Tris 0,89 mM, 0,89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA, pH 8,3), diluído 1:20 (v:v).  
2 Após eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio, visualizados e  
3 fotografados sob transluminador luz UV, usando-se o sistema da fotodocumentação  
4 digital Kodak EDAS 290. Marcador de 100 pb (Invitrogen) foi aplicado ao gel para a  
5 estimativa do peso molecular dos produtos amplificados.

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

15 Para a obtenção de marcadores microssatélites foi utilizado o protocolo de  
16 Souza *et al.* (2007), com algumas modificações. As reações de PCR, foram  
17 produzidas em um volume total de 15 µL, contendo tampão de reação 1x, 0,25 mM  
18 de dNTP, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada *primer*, 1 U de Taq polimerase (VJR),  
19 10ng de DNA e água ultrapura para completar o volume da reação. As amplificações  
20 foram realizadas em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.), de acordo com o  
21 seguinte protocolo: uma desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguida de 29 ciclos  
22 de 30 s a 94 °C para desnaturação, 20 s a 56 °C/ 60 °C/62 °C. (sendo as  
23 temperaturas de anelamento otimizadas para cada *primer* de microssatélite  
24 utilizado), 1 min a 72 °C para extensão, com uma extensão final de 10 minutos a 72  
25 °C. Nas amplificações foram utilizados 9 *primers* diferentes (Egc 17, Egc 18, Egc 24,

1 Egc 26, Egc 30a, Egc 30b, Egc 35, Egc 37 e Egc 51) desenvolvidos para a espécie  
2 *Euglossa cordata* (Souza *et al.*, 2007).

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

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

11

## 12 2.4. Análise dos dados

13

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

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

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

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

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

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

### 5 **3. Resultados e Discussão**

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

10 Apenas as endonucleases *Dral*, *Asel* e *Sspl*, das 16 endonucleases testadas,  
11 se mostraram efetivas na produção de fragmentos de restrição. Na Figura 3 é  
12 mostrado um perfil eletroforético dos fragmentos de restrição obtidos para a região  
13 16S, digerida com a enzima *Asel*, de alguns indivíduos de *E. pleosticta* coletados no  
14 fragmento de mata E, com cerca de 15 ha (Tabela 1).

15 As três endonucleases que resultaram em fragmentos de restrição para as  
16 duas regiões mitocondriais amplificadas são enzimas de corte raro, que reconhecem  
17 sequências de seis pares de bases em sítios AT (*Asel*: 5'AT $\nabla$ TAAT3' -  
18 3'TAAT $\Delta$ TAA5'; *Dral*: 5'TTT $\nabla$ AAA3' - 3'AAA $\Delta$ TTT5'; e *Sspl*: 5'AAT $\nabla$ VATT 3' -  
19 3'TTA $\Delta$ TAA5'). A eficiência destas três enzimas em reconhecer e cortar apenas  
20 regiões entre bases AT no genoma mitocondrial de *E. pleosticta* pode ser atribuída a  
21 reconhecida predominância destas duas bases no DNAm de abelhas (Crozier e  
22 Crozier, 1993; Silvestre *et al.*, 2008), característica esta também observada para  
23 diversas espécies da tribo Euglossini (Dick *et al.*, 2004). Tendo em vista o menor  
24 número de pontes de hidrogênios entre os pares de bases AT do que entre os pares

1 CG, genomas ricos em bases AT são potencialmente mais propensos a incidência  
 2 de inserções e deleções ('indels') (Arias e Infante-Malachias, 2001).

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

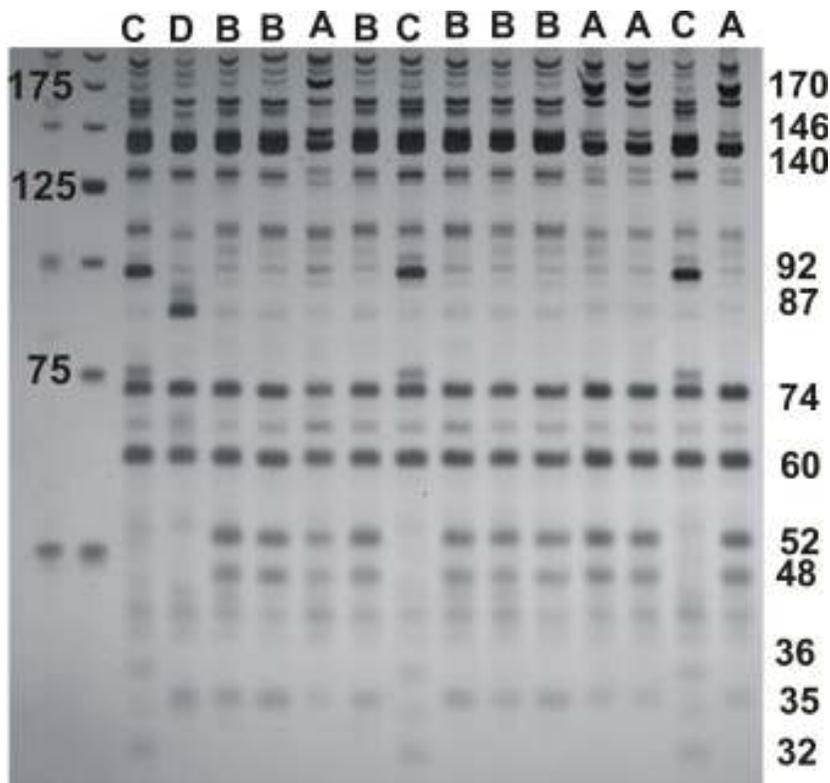
25

26

27

28

29



18 **Figura 3** - Perfil eletroforético, em um gel de poliacrilamida 9%, mostrando os 4  
 19 haplótipos (A-D) obtidos para a região 16S digerida, com a enzima *Asel*, de machos  
 20 de *E. pleostica* coletados no fragmento de mata E (14,6 ha). Nas duas primeiras  
 21 colunas aparecem os marcadores de peso molecular de 50 e 25 pb,  
 22 respectivamente. À direita da figura são mostrados os pesos moleculares (pb) dos  
 23 fragmentos de restrição que aparecem no gel.

25 No caso da região 16S, *Asel*, *Dral* e *Sspl* produziram entre 4 e 8 fragmentos  
 26 de restrição, enquanto que para a região COI-COII somente as duas primeiras  
 27 endonucleases foram capazes de reconhecer e cortar o segmento amplificado,  
 28 produzindo entre 3 e 5 fragmentos de restrição para a espécie estudada (Tabela 3).  
 29 Para a região 16S, foram identificados 4 haplótipos distintos para a enzima *Asel* (A,

1 B, C e D), 3 haplótipos com a enzima *Dral* (A, B e C) e 2 haplótipos com a *Sspl*. As  
2 enzimas *Dral* e *Vspl* (um isoesquizômero de *Asel*) se mostraram também eficazes  
3 na produção de fragmentos de restrição em segmentos dos genes mitocondriais  
4 16S de outras três espécies de *Euglossa*: *E. cordata*, *E. securigera* e *E. townsendi*  
5 (López-Uribe e Del Lama, 2007).

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

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

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

4

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

5

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

12 O polimorfismo de tamanho de fragmentos resulta de mutações nos sítios de  
13 restrição ou de inserções/deleções (*indels*), ou rearranjos entre os sítios de  
14 clivagem, como translocações e inversões, que alteram a distância entre os sítios de  
15 restrição (Hillis *et al.*, 1996). Segundo McLean *et al.* (1999) haplótipos ancestrais são  
16 geralmente mais frequentes e amplamente distribuídos entre populações. Com base  
17 neste pressuposto, os haplótipos AAAAA e BAAAA seriam provavelmente os mais  
18 antigos nas sub-populações de *E. pleosticta* das regiões estudadas, enquanto que,  
19 os haplótipos menos frequentes, incluindo os quatro exclusivos, teriam se originado,  
20 ao longo das diferentes gerações, de haplótipos ancestrais, como o AAAAA.

21 O número de haplótipos por fragmento estudado variou de 4 a 6, com as  
22 amostras dos remanescentes A e C, duas reservas particulares com tamanhos entre  
23 150 e 200 ha, apresentando o maior número de haplótipos (Tabela 4).  
24 Surpreendentemente, a amostra do fragmento B, uma reserva governamental com

1 cerca de 580 ha de mata primária ainda bem preservada (Tabela 1), foi uma das que  
2 apresentou apenas 4 haplótipos.

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

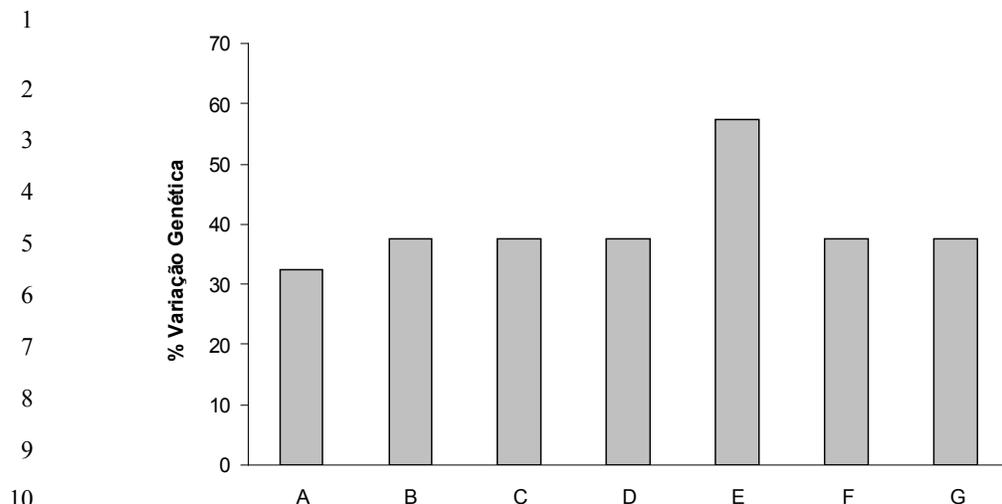
HAPLÓTIPOS	TIPO	Fragmentos Florestais						
		A	B	C	D	E	F	G
A A A A A	I	0,391	0,348	0,416	0,454	0,350	0,458	0,476
B A A A A	II	0,434	0,521	0,208	0,364	0,350	0,333	0,285
B A A B A	III	-	-	0,042	-	-	-	-
B B A B A	IV	-	-	0,042	-	-	0,042	-
C B A A A	V	0,043	-	-	-	-	-	-
C B A B A	VI	0,043	0,086	0,083	0,045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

8 De um modo geral os valores estimados de diversidade de haplótipos ( $h$ )  
9 dentro de cada amostra de *E. pleosticta* se mostraram mais ou menos próximos e  
10 pouco elevados, variando de 0,62 (amostra B) a 0,76 (amostra E) (Tabela 4). A  
11 diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ) dentro de cada amostra estudada foi também  
12 consideravelmente baixa, com valores variando de 0,77 (fragmento B) a 0,94%  
13 (fragmento E), e uma média de 0,83%. De forma similar, esta diversidade de

1 nucleotídeos entre os diferentes pares de amostras também revelou valores baixos,  
2 variando de 0,75 a 0,88% (dados não mostrados). Os valores estimados de  
3 divergência de nucleotídeos ( $\delta$ ) entre os pares de amostras se mostraram bastante  
4 baixos, variando de 0,0000 a 0,0420 (amostras B-C), indicando, assim, baixa  
5 divergência de nucleotídeos entre os diferentes pares (dados não mostrados).

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

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



11 **Figura 4** - Estimativa de variação genética (%) de amostras de machos de *E.*  
 12 *pleosticta* dos sete fragmentos florestais estudados (A-G), obtida com base na  
 13 proporção de locos polimórficos, calculados a partir de marcadores PCR-RFLP  
 14 gerados pela restrição de segmentos das regiões mitocondriais 16S (rDNA) e  
 15 intergênica COI-COII.

16 Em relação às análises de marcadores microssatélites, foi observado que dos  
 17 nove locos de microssatélites investigados, sete foram amplificados com sucesso e  
 18 se mostraram polimórficos, com uma variação de 6 a 10 alelos identificados por loco,  
 19 totalizando 57 alelos distintos identificados (Tabela 6). Para os locos Egc 30a e Egc  
 20 30b as amplificações não se mostraram eficientes, e estes foram excluídos das  
 21 análises. Souza *et al.* (2007) analisando estes mesmos locos de microssatélites para  
 22 quatro machos de *E. pleosticta* também encontraram polimorfismos para todos os  
 23 locos analisados, com um número de alelos variando de dois a quatro alelos por  
 24 loco.

25 Com exceção do loco Egc 35, alelos exclusivos foram encontrados para todos  
 26 os locos analisados, em frequências variando de 4,16 (alelo a 9 do loco Egc18) a  
 27 36,84% (alelo 6 do loco Egc 26). Na Figura 6 é mostrado um perfil eletroforético,  
 28 obtido para o loco Egc 26, mostrando os vários alelos de marcadores microssatélites

1 encontrados para os 21 machos de *E. pleosticta* coletados no fragmento G  
2 (Horto/UEL).

3 No presente trabalho, os marcadores microssatélites revelaram  
4 heterozigidade esperada (He) em todos os locos analisados, variando de 0,2410  
5 (loco Egc 26, amostra D) a 0,8889 (loco Egc 18, amostra A). Tais valores de He se  
6 mostram mais ou menos similares aos obtidos com estes marcadores para esta e  
7 outras espécies de abelhas. No caso de *E. pleosticta*, para os quatro machos  
8 analisados desta espécie, Souza *et al.* (2007) encontraram valores de  
9 heterozigidade esperada variando de 0,38 a 0,75. Com base em amostras de 67  
10 machos e 67 fêmeas de outra espécie de *Euglossa*, *E. cordata*, estes mesmos  
11 autores encontraram, para os nove locos de microssatélites analisados, valores de  
12 heterozigidade esperada variando de 0,51 a 0,92, enquanto Widmer e Schmid-  
13 Hempel (1999), a partir da análise de fêmeas das abelhas sociais da espécie  
14 *Bombus pascuorum*, encontraram para os seis locos de microssatélites analisados  
15 valores de heterozigidade esperada variando de 0,045 a 0,872.

16

17

1 **Tabela 6** - Frequências de alelos de microssatélites nas amostras de machos de  
 2 *Euglossa pleosticta* dos sete fragmentos florestais estudados (A-G). Tamanhos das  
 3 amostras são apresentados entre parênteses. pb = pares de bases do alelo  
 4 observado. Para informações sobre as localidades consultar a Tabela 1.

5

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

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

Continuação

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

1 \*parcela perdida para o determinado loco.

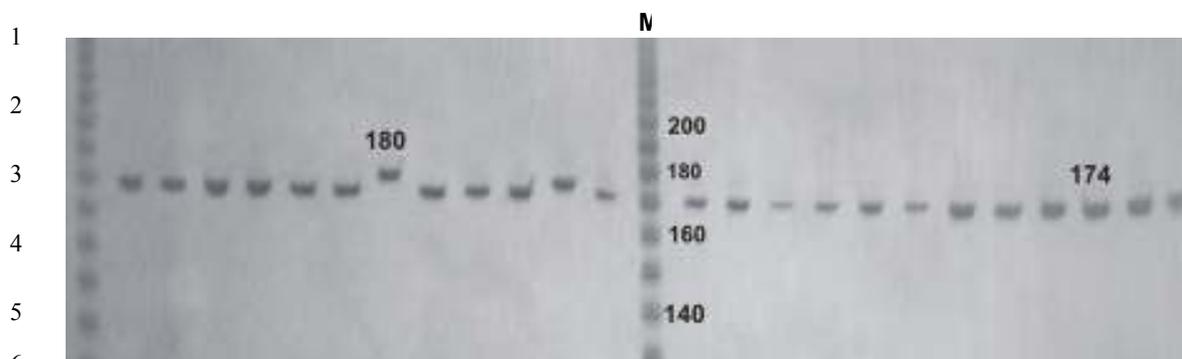
2

3

4

5

6



7 **Figura 5** - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 8%, obtido com o *primer* Egc  
 8 26 (Souza *et al.*, 2007), mostrando dois alelos de microssatélites encontrados para  
 9 os 24 machos de *E. pleosticta* coletados no remanescente florestal F. M: Marcador  
 10 de peso molecular de 10pb.

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

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

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

21 (5% de significância, ns= não significativo)

22

1 **Tabela 8** - Análise da Variância Molecular (AMOVA) e comparação da variância da  
 2 frequência gênica ( $\Phi_{ST}$  e  $F_{ST}$ ) par a par, entre grupos de *E. pleosticta* dos sete  
 3 fragmentos florestais estudados, baseados em marcadores PCR-RFLP (obtidos a partir  
 4 da amplificação de segmentos de genes mitocondriais 16S e COI-COII) e marcadores  
 5 microssatélites (obtidos para os locos Egc 17, Egc 18, Egc 24, Egc 26, Egc 35, Egc 37 e  
 6 Egc 51).

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

Continuação da Tabela

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

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

4 As comparações, com base nos marcadores PCR-RFLP, realizadas entre os  
5 diferentes pares de amostras também indicaram, em todos os casos, ausência de  
6 diferenciação genética entre as amostras das diferentes localidades (Tabela 8).  
7 Além disto, quase todos os valores de  $\phi_{ST}$  encontrados foram negativos,  
8 provavelmente em razão de alguma imprecisão no algoritmo usado pelo programa  
9 computacional na estimativa dos valores de  $\phi_{ST}$  (Foster *et al.*, 2006). De modo  
10 bastante distinto, a AMOVA aplicada aos dados de microssatélites nas 21  
11 comparações entre pares de amostras revelou, em todos os casos, valores de  $F_{ST}$   
12 estatisticamente diferentes de zero, indicando diferenciação genética entre as  
13 amostras de *E. pleosticta* dos diferentes fragmentos (Tabela 6). Os valores de  $F_{ST}$   
14 obtidos nestas comparações variaram de 0,03698 (par A-B) a 0,1639 (par C-F). De

1 acordo com Wright (1978), valores teóricos de  $F_{ST}$  variando conforme a seguinte  
2 escala: zero a 0,05 a 0,05; 0,05 a 0,15 e de 0,15 a 0,25 são indicativos de baixa,  
3 moderada e alta diferenciação genética, respectivamente.

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

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

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

18 Na região estudada, a fragmentação florestal da Mata Atlântica é um  
19 processo recente, com cerca de 80 anos de história (Torezan, 2002). Tal fato  
20 explicaria esta ausência de diferenciação genética, a partir da análise do genoma  
21 mitocondrial, entre as amostras de *E. pleosticta* dos sete fragmentos de mata. De  
22 modo diverso, a análise por meio de marcadores microssatélites, indicou  
23 estruturação significativa e alteração da variação genética possivelmente como  
24 consequência de um ou mais dos seguintes processos genéticos envolvendo as  
25 amostras de *E. pleosticta* dos sete fragmentos florestais estudados: deriva genética,

1 efeito de gargalo de garrafa, aumento da endogamia e restrição no fluxo gênico.  
2 Embora alguns estudos tenham demonstrado que algumas espécies de Euglossini  
3 sejam capazes de transpor áreas desmatadas (Raw, 1989; Tonhasca *et al.*, 2003),  
4 os resultados revelados com as análises de microssatélites sugerem dentre outros  
5 efeitos, limitação de fluxo gênico como um potencial fator determinando a ocorrência  
6 de diferenciação genética entre os 21 pares de amostras que mostraram diferenças  
7 significativas na quantidade de variação genética.

8 De acordo com Ferguson *et al.* (1995), os modelos de genética de  
9 população mostram que diferenças substanciais nas frequências de alelos não  
10 ocorrem em um curto período de tempo, exceto por meio de seleção ou do tamanho  
11 efetivo reduzido da população, ou ainda como resultado do efeito de “bottleneck”  
12 que pode conduzir à deriva genética. No presente trabalho, o maior esforço de  
13 coleta empregado nos dois fragmentos menores de mata (E e G) para se obter  
14 tamanhos de amostras similares aos dos outros cinco fragmentos florestais  
15 estudados (Tabela 1), sugere que estes fragmentos menores apresentam um  
16 número menor de indivíduos quando comparados aos demais grupos; embora, não  
17 se possa descartar a possibilidade de os machos destes locais estarem explorando  
18 outras fontes de recursos nestas áreas (Ambruster, 1993); embora esta última  
19 hipótese pareça pouco provável nestes dois casos. Considerando-se que os machos  
20 de abelhas que visitam as iscas-odores em busca de fragrâncias químicas, são  
21 indivíduos adultos em idade reprodutiva (Zimmerman e Madrinan, 1988), se de fato,  
22 tais fragmentos menores tiverem sofrendo declínio no número de machos, isto seria  
23 também indicativo de uma redução no tamanho efetivo das populações de *E.*  
24 *pleosticta* estudadas. Segundo Primack e Rodrigues (2001) espécies podem se  
25 torna extintas nos fragmentos, por flutuação populacional e sucessão, e novas

1 espécies poderão deixar de chegar a estes habitats por problemas de dispersão.  
2 Como consequência, o número de espécies no habitat diminuirá com o passar do  
3 tempo, pois, é possível que fragmentos pequenos não possam sustentar  
4 subpopulações grande o suficiente para que esta sobreviva por um longo período. A  
5 redução no tamanho efetivo das populações tem sido atribuída como uma das  
6 causas determinantes no aumento de machos diplóides de algumas espécies de  
7 Euglossini (Roubik *et al.*, 1996; Zayed *et al.*, 2004). A produção destes machos, que  
8 são indivíduos inviáveis ou estéreis dentro das populações de abelhas e outros  
9 himenópteros, é consequência do sistema de determinação complementar de sexo  
10 apresentado pela maioria dos Hymenoptera, e impõe elevada carga genética às  
11 populações destes insetos haplodiplóides, com um aumento acentuado nos riscos  
12 de extinção destas (Zayed e Packer, 2005).

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

22

### 23 **Agradecimentos**

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

26

#### 1 4. Referências

- 2
- 3 Aguiar WM e Gaglianone MC (2008) Comunidade de abelhas Euglossina  
4 (Hymenoptera: Apidae) em remanescentes de Mata Estacional Semidecidual sobre  
5 Tabuleiro no Estado do Rio de Janeiro. *Neotrop Entomol* 37:118-125.
- 6 Arias MC e Infante-Malachias ME (2001) RFLP: O emprego de enzimas de restrição  
7 para detecção de polimorfismos no DNA, in: Mاتيoli F.M.C.F. (Ed.), *Biologia*  
8 *Molecular e Evolução*, Holos Editora, Ribeirão Preto, 143-152.
- 9 Armbruster WS (1993) Within-habitat heterogeneity in baiting samples of male  
10 euglossine Bees: possible causes and implications. *Biotropica* 25:122-128.
- 11 Becker P, Moure JS e Peralta FJA (1991) More about euglossine bees in Amazonian  
12 forest fragments. *Biotropica* 23:586-591.
- 13 Brosi BJ (2009) The effects of forest fragmentation on euglossine bee communities  
14 (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Biol Conserv* 142:414-423.
- 15 Cameron SA, Derr JN, Austin AD, Woolley JB e Wharton RA (1992) The application  
16 of nucleotide sequence data to phylogeny of the Hymenoptera: a review. *J Hym Res*  
17 1:63-79.
- 18 Cha SY, Yoon HJ, Lee EM, Yoon MJ Hwang JS, Jin BR, Han YS e Kim I (2007) the  
19 complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of  
20 the bumblebee, *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae). *Gene* 392:206-220.
- 21 Chenuil A (2006) Choosing the right molecular genetic markers for studying  
22 biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetics* 127:101-120.
- 23 Collet T, Ferreira KM, Arias MC, Soares AEE e Del Lama MA (2006) Genetic  
24 structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and  
25 Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI-COII Patterns. *Heredity* 97:329-335.
- 26 Crozier RH e Crozier YC (1993) The mitochondrial genome of the honeybee *Apis*  
27 *mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics* 133:97-117.

- 1 Dick CW, Roubik DW, Gruber KF e Bermingham E (2004) Long-distance gene flow  
2 and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed  
3 by comparative mitochondrial DNA phylogeography. *Mol Ecol* 13:3775-3785.
- 4 Downton M and Austin AD (1994) Molecular phylogeny of the insect order  
5 Hymenoptera: Apocritan relationships. *Evolution* 91:9911-9915.
- 6 Dressler RL (1982) Biology of orchid bees (Euglossini). *Annu Rev Ecol Syst* 13:373-  
7 394.
- 8 Excoffier L, Laval G e Schneider S (2005) Arlequin ver 3.0: An integrated software  
9 package for population genetics data analysis. *Evol Bioinf Online* 1:47-50.
- 10 Ferguson AJBT, Prodöhl PA, Mcmeel O, Thompson C, Stone C, McGinnity P e  
11 Hynes RA (1995) The application of molecular markers to the study and conservation  
12 of fish population, with special reference *Salmo*. *J Fish Biol* 47:103-126.
- 13 Foster CB, Aswath K, Chanock SJ, McKay HF e Peters U (2006) Polymorphism  
14 analysis of six selenoprotein genes: support for a selective sweep at the glutathione  
15 peroxidase 1 locus (3p21) in Asian populations. *BMC Genet* 7:56.
- 16 Francisco FO (2002) Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão  
17 *Plebeia remota*: análise do DNA mitocondrial e microssatélites. Dissertação de  
18 mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, pp 147.
- 19 Giangarelli DC, Freiria GA, Colatreli OP, Suzuki KM e Sofia SH (2009) *Eufriesea*  
20 *Violacea* (Blanchard): A euglossine species potentially sensitive to forest patch  
21 deterioration in Brazil. *Neotrop Entomol no prelo*.
- 22 Hall HG e Smith D.R. (1991) Distinguishing African and European honeybee  
23 matrines using amplified mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci* 88:4548-4552.
- 24 Hillis DM, Moritz C e Mable BK (1996) *Molecular Systematics*, Sinauer Associates,  
25 Massachusetts pp.655.
- 26 Insuan S, Deowanish S, Klinbunga S, Sittipraneed S, Sylvester HA e Wongsiri S  
27 (2007) Genetic differentiation of the giant honey bee (*Apis Dorsata*) In Thailand  
28 analyzed by mitochondrial genes and microssatellites. *Biochem Gen* 45:345-361.

- 1 Kevan PG e Phillips TP (2001) The economic impacts of pollinator declines: an  
2 approach to assessing the consequences. *Conserv Ecol* 5:  
3 <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art8>.
- 4 López-Urbe MM e Del Lama MA (2007) Molecular identification of the species of the  
5 genus *Euglossa* Latreille (Hymenoptera: Apidae, Euglossini). *Neotrop Entomol*  
6 36:712-720.
- 7 López-Urbe MM, Almanza MT e Ordonez M (2007) Diploid male frequencies in  
8 Colombian populations of euglossine bees *Biotropica* 39:660-662.
- 9 Matioli R e Passos-Bueno M R S (2001) Métodos baseados em PCR para análise de  
10 polimorfismos de ácidos nucléicos, in: Matioli, S. R. (Ed), *Biologia Molecular e*  
11 *Evolução*, Holos, Ribeirão Preto, pp. 153-161.
- 12 Mcelroy D, Moran P, Bermingham E e Kornfield I (1992) REAP: An integrated  
13 environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. *J*  
14 *Hered* 83:157-158.
- 15 McLean JE, Hay DE e Taylor EB (1999) Marine population structure in an  
16 anadromous fish: lifehistory influences patterns of mitochondrial DNA variation in the  
17 eulachon, *Thaleichthys pacificus*. *Mol Ecol* 8:143-158.
- 18 Meusel MS e Moritz RFA (1993) Transfer of paternal mitochondrial DNA during  
19 fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. *Curr Genet* 24:539-543.
- 20 Miller MP (1997) Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows  
21 program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.  
22 Computer software distributed by author, Northern Arizona University, Flagstaff.
- 23 Morato EF (1998) Estudos sobre comunidades de abelhas Euglossini. In: *Anais do III*  
24 *Encontro Sobre Abelhas*, Ribeirão Preto, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras  
25 de Ribeirão Preto 3:135-143.
- 26 Morato EF (1994) Abundância e riqueza de machos de Euglossini (Hymenoptera:  
27 Apidae) em mata de terra firme e áreas de derrubada, nas vizinhanças de Manaus  
28 (Brasil). *Boletim Museu Para. Emílio Goeldi, sér. Zool.* 10:95-105.

- 1 Morellato LPC e Haddad CFB (2000) Introduction: the Brazilian Atlantic Forest.  
2 *Biotropica* 32:786-792.
- 3 Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB e Kent J (2000) Biodiversity  
4 hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.
- 5 Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small  
6 number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- 7 Palumbi SR (1996) Nucleid Acids II: the polymerase chain reaction. In: Hills DM,  
8 Moritz C and Mable BK. *Molecular systematics*, Sinauer Associates, Massachusetts,  
9 pp 205-247.
- 10 Peruquetti RC, Campos LAO, Coelho CDP, Abrantes CVM e Lisboa LCO (1999)  
11 Abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância, riqueza e  
12 aspectos biológicos. *Rev Bras Zool* 16:101-118.
- 13 Powell AH e Powell GNN (1987) Population dynamics of male euglossine bees in  
14 Amazonian forest fragments. *Biotropica* 19:176-179.
- 15 Pruett CL e Winker K (2008) The effects of sample size on population genetic  
16 diversity estimates in song sparrows *Melospiza melodia*. *J Avian Biol* 39:252-256.
- 17 Raw A (1989) The dispersal of euglossine bees between isolated patches of eastern  
18 Brazilian wet forest (Hymenoptera, Apidae). *Rev Bras Entomol* 33:103-107.
- 19 Ray JD (2000) Fragment Length Calculator: a Windows 95 program for calculating  
20 DNA fragment length. *J Hered* 91:177-178.
- 21
- 22 Roubik DW e Hanson PE (2004) *Orchid bees of Tropical America: Biology and field  
23 guide*, INBio Press, Heredita, Costa Rica.
- 24 Roubik DW, Weigt LA e Bonilla MA (1996) Population genetics, diploid males, and  
25 limits to social evolution of euglossine bees. *Evolution* 50:931-935.
- 26 Schlindwein C (2000) A importância de abelhas especializadas na polinização de  
27 plantas nativas e conservação do meio ambiente. In: *Anais do Encontro Sobre  
28 Abelhas*, Edusp, Ribeirão Preto, SP, pp 131-141.

- 1 Silvestre D, Dowton M e Arias MC (2008) The mitochondrial genome of the stingless  
2 bee *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): sequence, gene  
3 organization and a unique tRNA translocation event conserved across the tribe  
4 Meliponini. *Genet Mol Biol* 31:451-460.
- 5 Sofia SH, Paula FM, Santos AM, Almeida FS e Sodr e LMK (2005) Genetic structure  
6 analyses of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae) populations from southern  
7 Brazilian Atlantic rainforest remnants. *Gen Mol Biol* 28:479-484.
- 8 Sofia SH, Santos AM e Silva CRM (2004) Euglossine bees (Hymenoptera, Apidae) in  
9 a remnant of Atlantic Forest in Paran a State, Brazil. *Iheringia* 94:217-222.
- 10 Sofia SH e Suzuki KM (2004) Comunidades de machos de abelhas Euglossina  
11 (Hymenoptera: Apidae) e fragmentos florestais no sul do Brasil. *Neotrop Entomol*  
12 33:693-702.
- 13 Sol -Cava AJ (2001) Biodiversidade molecular e genética da conserva o. In:  
14 Matioli S R (ed.), *Biologia Molecular e Evolu o*. Holos, Ribeirão Preto, pp 171-190.
- 15 Sork VL, Campbell D, Dyer R, Fernandez J, Nason J, Petit R, Smouse P e Steinberg  
16 E (2003) Current approaches: gene flow on ecological time scales (Summary of  
17 workshop discussions). In: *Proceedings from a workshop on gene flow in*  
18 *fragmented, managed, and continuous populations*. Univ. California, Santa Barbara,  
19 pp 5-9.
- 20 Souza RO, Cervini M, Del Lama MA e Paxton RJ (2007) Microsatellite loci for  
21 euglossine bees (Hymenoptera, Apidae). *Mol Ecol Notes* 7:1353-1356.
- 22 Tonhasca AJr, Blackmer JL e Albuquerque GS (2003) Dispersal of euglossine bees  
23 between fragments of the Brazilian Atlantic Forest. *J Trop Ecol* 19:99-102.
- 24 Torezan JM (2002) Nota sobre a vegeta o da bacia do rio Tibagi. In: Medri ME,  
25 Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JA (ed) *A Bacia do Rio Tibagi*. Editora dos  
26 Editores, Londrina, pp 103-107.

- 1 Waldschmidt AM, Lopes LA, Marco PJr e Campos LAO (2005) Genetic of Euglossini  
2 bees (Hymenoptera) in fragments of the Atlantic forest in the region of Viçosa, MG. J  
3 Biol 65:541-549.
- 4 Widmer A and Schmid-Hempel P. (1999) the population genetic structure of a large  
5 temperate pollinator species, *Bombus pascuorum* (Scopoli) (Hymenoptera: Apidae).  
6 Mol Ecol 8:387-398.
- 7 Williams NH e Dodson CH (1972) Selective attraction of male euglossine bees to  
8 orchid floral fragrances and its importance in long-distance pollen flow. Evolution  
9 26:84-95.
- 10 Wright S (1978) Variability within and among natural populations. Evolution and the  
11 genetics of populations. Univ.Chicago Press, USA.
- 12 Zayed A e Packer L (2005) Complementary sex determination substantially  
13 increases extinction proneness of haplodiploid populations. Proc Natl Acad Sci  
14 102:10742-10746.
- 15 Zayed A, Roubik DW e Packer L (2004). Use of diploid male frequency data as an  
16 indicator of pollinator decline. Proc R Soc Lond B 271:S9-S12.
- 17 Zimmerman JK e Madrinan SR Age Structure Of Male *Euglossa Imperialis*  
18 (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) At nectar and chemical sources in Panama. J  
19 Trop Ecol 4:303-306.

#### 1 **IV. Conclusões**

2

3 Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- 4 • Os marcadores microssatélites mostraram-se eficientes para o estudo de  
5 estrutura genética da espécie em estudo, indicando a ocorrência de variação  
6 genética para o genoma nuclear haplóide analisado.
- 7 • As duas regiões mitocondriais analisadas não mostraram diferenciação genética  
8 entre as amostras.
- 9 • Os marcadores moleculares utilizados revelaram resultados divergentes nas  
10 análises da estrutura genética de populações de *E. pleosticta*.
- 11 • O efeito da fragmentação da Mata Atlântica no norte do Paraná, por meio dos  
12 marcadores microssatélites, indica restrição de fluxo gênico entre as amostras  
13 estudadas, com a formação de uma meta-população, por possíveis efeitos de deriva  
14 genética e/ou endogamia.
- 15 • Faz-se necessário ressaltar a importância na conservação de remanescentes de  
16 Mata Atlântica estudados para a manutenção da diversidade genética da espécie  
17 estudada.

## 1 V. Referências Bibliográficas

2

3 ACKERMAN, J.D. Specificity and mutual dependency of the orchid-euglossine bee  
4 interaction. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 20, p. 301-314. 1983.

5 AGUIAR, W.M.; GAGLIANONE, M.C. Comunidade de Abelhas Euglossina  
6 (Hymenoptera: Apidae) em remanescentes de Mata Estacional Semidecidual sobre  
7 Tabuleiro no Estado do Rio de Janeiro. **Neotropical Entomology**, v.37, p.118-125.  
8 2008.

9 AIZEN, M.A.; FEISENGER, P. Habitat fragmentation, native insect pollinators, and  
10 feral honey bees in Argentine "Chaco Serrano". **Ecological Applications**, v.4, p.378-  
11 392. 1994.

12 ARIAS, M.C.; BRITO, R. M.; FRANCISCO, F.O.; MORETTO G.; DE OLIVEIRA, F. F.;  
13 SILVESTRE, D; SHEPPARD, W. S. Molecular markers as a tool for population and  
14 evolutionary studies of stingless bees. **Apidologie**, v.37 p. 259–274. 2006.

15 ARIAS, M.C.; FRANCISCO, F.O.; SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos  
16 populacionais e evolutivos de meliponíneos. In: MELO, A.R.; ALVES-DOS-SANTOS,  
17 I. **Apoidea Neotropica: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**.  
18 Editora UNESC, Criciúma, p.305-309. 2003.

19 ARIAS, M.C.; INFANTE-MALACHIAS, M.E. RFLP: O emprego de enzimas de  
20 restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In MATIOLI, S.R. (ed)., **Biologia**  
21 **Molecular e Evolução**, Ribeirão Preto: Holos, p. 143-152. 2001.

22 ARMBRUSTER, W.S. Within-habitat heterogeneity in baiting samples of male  
23 euglossine bees: possible causes and implications. **Biotropica**, v.25, p.122-128.  
24 1993.

25 ATTARDI, G. Animal mitochondrial DNA: na extreme example genetic economy.  
26 **International Review Cytology**, v.93, p.93-145. 1985.

27 AUGUSTO, S.C.; GARÓFALO, C.A. Nesting biology and social structure of *Euglossa*  
28 (*Euglossa*) *townsendi* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossini), **Insects**  
29 **Sociaux**, v.51, p.400-409. 2004.

- 1 AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. 2a. ed. Sinauer  
2 Associates, Inc., Sunderland, MA. 2004.
- 3 BECKER, P.; MOURE, J.S.; PERALTA, F.J.A. More about Euglossine bees in  
4 Amazonian forest fragments. **Biotropica**, v.23, p.586-591. 1991.
- 5 BOUGA, M.; HARIZANIS, P.C.; KILIAS, G.; ALAHOTIS, S. Genetic divergence and  
6 phylogenetic relationships of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)  
7 populations from Greece and Cyprus using PCR-RFLP analysis of three DNAm  
8 segments, **Apidologie**, v.36, p.335-344. 2005.
- 9 BROSI, B.J. The effects of forest fragmentation on euglossine bee communities  
10 (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Biological Conservation**, v.142, p.414-423.  
11 2009.
- 12 BROSI, B.J.; DAILY, G.C.; SHIH, T.M.; OVIEDO, F.; DURÁN, G. The effects of forest  
13 fragmentation on bee communities in tropical countryside. **Journal of Applied**  
14 **Ecology**, v.45, p.773-783. 2008.
- 15 CALCAGNOTTO, D. Taxas de evolução e o relógio molecular. In: MATIOLI, F.M.C.F.  
16 (ed.) **Biologia Molecular e Evolução**, 2001. p.52-63.
- 17 CAMERON, S.A; DERR, J.N.; AUSTIN, A.D.; WOOLLEY, J.B.; WHARTON R.A. The  
18 application of nucleotide sequence data to phylogeny of the Hymenoptera: a review,  
19 **Journal Hymenoptera Research**, v.1, p.63-79. 1992.
- 20 CAMERON, S.A. Phylogeny and biology of Neotropical Orchid bees (Euglossini).  
21 **Annual Review Entomology**, v.49, p. 377-404. September, 2004.
- 22 CHA, S.Y.; YOON, H.J.; LEE, E.M.; YOON, M.J.; HWANG, J.S.; JIN, B.R.; HAN,  
23 Y.S.; KIM, I. The complete nucleotide sequence and gene organization of the  
24 mitochondrial genome of the bumblebee, *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae).  
25 **Gene**, v.392, p.206-220. 2007.
- 26 CHENUIL, A. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity:  
27 from molecular evolution to practical aspects, **Genetica**, v.127, 101-120. 2006.

- 1 COLLET, T.; ARIAS, M.C.; DEL LAMA, M.A. 16S DNAm<sup>t</sup> variation in *Apis mellifera*  
2 detected by PCR-RFLP, **Apidologie**, v.38, p.1-8. 2007.
- 3 COLLET, T.; FERREIRA, K.M.; ARIAS, M.C.; SOARES, A.E.E.; DEL LAMA, M.A.  
4 Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil  
5 and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI-COII patterns. **Heredity**, v.97,  
6 p.329-335. 2006.
- 7 COOK, J.M. Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and  
8 evidence. **Heredity**, v.71, p.421-435. 1993.
- 9 COOK, J.M.; CROZIER, R.H. Sex determination and population biology of the  
10 Hymenoptera. **Trends in Ecology and Evolution**, v.10, p.281–286. 1995.
- 11 CROZIER, R.H. Counter-intuitive property of effective population size. **Nature**, v.262,  
12 p. 384. 1976.
- 13 CROZIER, R.H. Evolutionary genetics of the Hymenoptera. **Annual Review of**  
14 **Entomology**, v.22, p.263-268. 1977.
- 15 CROZIER, R. H.; CROZIER Y.C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis*  
16 *mellifera*: complete sequence and genome organization. **Genetics**, v.133, 97-117.  
17 1993.
- 18 DI BITETTI, M.S.; PLACCI, G.; DIETZ, L.A. **Uma visão de biodiversidade da**  
19 **ecorregião Florestas do Alto Paraná – Bioma Mata Atlântica**: planejando a  
20 paisagem de conservação da biodiversidade e estabelecendo prioridades para  
21 ações de conservação. Washington, D. C.; World Wildlife Fund, 2003.
- 22 DICK, C.W.; ROUBIK, D.W.; GRUBER, K.F., BERMINGHAM, E. Long-distance gene  
23 flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini)  
24 revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography, **Molecular Ecology**,  
25 v.13, p.3775-3785. 2004.
- 26 DODSON, C.H.; DRESSLER, R.L.; HILLS, H.G.; ADAMS, R.M.; WILLIAMS, N.H.  
27 Biologically active compounds in orchid fragrances. **Science**, v.164, p.1243-1249.  
28 1969.

- 1 DODSON, C.H.; HILLS, H.G. Gas chromatography of orchid fragrances. **American**  
2 **Orchid Society Bulletin**, v.35, p.720-25. 1966.
- 3 DOWTON, M.; AUSTIN, A.D. Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera:  
4 Apocritan relationships, **Evolution**, v.91, p.9911-9915. 1994.
- 5 DRESSLER, R.L. Biology of orchid bees (Euglossini). **Annual Review of Ecology**  
6 **and Systematics**, v.13, p.373-394. 1982.
- 7 EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver 3.0: An integrated  
8 software package for population genetics data analysis. **Evolutionary**  
9 **Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50. 2005.
- 10 FERGUNSON, A.; TAGGART, J.B.; PRODOHL, P.A., MCMEEL, O.; THOMPSON,  
11 C.; STONE, C.; MCGINNITY, P.; HYNES, R.A. The application of molecular markers  
12 to the study and conservation of fish populations, with especial reference to *Salmo*.  
13 **Journal of Fish Biology**, v.47, p.103-126. 1995.
- 14 FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores**  
15 **moleculares em análise genética**, 3. ed. Brasília: Ed. EMBRAPA-CENARGEN,  
16 p.220. 1998.
- 17 FOSTER, C.B.; ASWATH, K.; CHANOCK, S.J.; MCKAY, H.F.; PETERS, U.  
18 Polymorphism analysis of six selenoprotein genes: support for a selective sweep at  
19 the glutathione peroxidase 1 locus (3p21) in Asian populations. **BMC Genetic**, v.7,  
20 p.56. 2006.
- 21 FRANCK P., CAMERON E., GOOD G., RASPLUS J.-Y., OLDROYD B.P. Nest  
22 architecture and genetic differentiation in a species complex of Australian stingless  
23 bees. **Molecular Ecology**, v.13, p.2317–2331. 2004.
- 24 FRANCISCO, F.O. **Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão**  
25 ***Plebeia remota*: análise do DNA mitocondrial e microssatélites**. Dissertação de  
26 mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. P. 147. 2002.
- 27 FREEMAN, S.; HERRON, J.C. **Ánalyse evolutiva**, 4. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed.  
28 p. 270, 2009.

- 1 GARÓFALO, C.A. Comportamento de nidificação e estrutura de ninhos de *Euglossa*  
2 *cordata* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini), **Revista Brasileira de Biologia**, v.52,  
3 p.187-198. 1992.
- 4 GIANGARELLI, D.C.; FREIRIA, G.A.; COLATRELI, O.P.; SUZUKI, K.M.; SOFIA,  
5 S.H. *Eufriesea violacea* (Blanchard): a euglossine species potentially sensitive to  
6 forest patch deterioration in Brazil. **Neotropical Entomology**, no prelo. 2009.
- 7 HALL, H.G.; SMITH, D.R. Distinguishing African and European honeybee matriline  
8 using amplified mitochondrial DNA, **Proceedings Natural Academic Society**, v.88,  
9 p.4548-4552. 1991.
- 10 HANATAKA, T.; GALETTI Jr, P.M. RAPD Markers indicate the occurrence of  
11 structured population in a migratory freshwater fish species **Genetics and**  
12 **Molecular Biology**, v. 26, p.19-25. 2003.
- 13 HARTL, D.L. **Princípios de Genética de populações**, 3. ed. Ribeirão Preto, SP: Ed.  
14 FUNPEC. p. 41-42, 2008.
- 15 HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. **Molecular systematics**, Sinauer  
16 Associates, Massachusetts. 1996.
- 17 INSUAN, S.; DEOWANISH, S.; KLINBUNGA, S.; SITTIPRANEED, S.; SYLVESTER,  
18 H.A.; WONGSIRI, S. Genetic differentiation of the giant honey bee (*Apis dorsata*) in  
19 Thailand analyzed by mitochondrial genes and microsatellites. **Biochemical**  
20 **Genetics**, v.45, p.345-361. 2007.
- 21 JANZEN, D.H. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants.  
22 *Science*, v.171, p.203-205. 1971.
- 23 KEVAN, P.G.; PHILLIPS, T.P. The economic impacts of pollinator declines: an  
24 approach to assessing the consequences. **Conservation Ecology** 5,  
25 <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art8>. 2001.
- 26 LÓPEZ-URIBE, M.M.; DEL LAMA, M.A. Molecular identification of the species of the  
27 genus *Euglossa* Latreille (Hymenoptera: Apidae, Euglossini). **Neotropical**  
28 **Entomology**, v.36, p.712-720. 2007.

- 1 LÓPEZ-URIBE, M.M.; ALMANZA, M.T.; ORDONEZ, M. Diploid male frequencies in  
2 Colombian populations of euglossine bees. *Biotropica*, v.39, p.660-662. 2007.
- 3 LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics: design, analysis, and**  
4 **application**, Blackwell Publishing, Malden, 326p., 2004.
- 5 MATIOLI, S.R.; PASSOS-BUENO, M.R.S. Métodos baseados em PCR para análise  
6 de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S. R. (ed). **Biologia Molecular e**  
7 **Evolução**, Ribeirão Preto: Holos, cap. 15, p.153-161. 2001.
- 8 MCELROY, D.; MORAN, P.; BERMINGHAM, E.; KORNFIELD, I. REAP: An  
9 integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction  
10 data. *Journal of Heredity*, v.83, p.157-158. 1992.
- 11 MCLEAN, J.E.; HAY, D.E.; TAYLOR, E.B. Marine population structure in an  
12 anadromous fish: lifehistory influences patterns of mitochondrial DNA variation in the  
13 eulachon, *Thaleichthys pacificus*. *Molecular Ecology*, v.8, p.143-158. 1999.
- 14 METZGER, J.P. Estrutura da paisagem: o uso adequado de métricas. In: CULLEN  
15 JR, L.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PADUA, C. **Métodos de estudo em biologia**  
16 **da conservação e manejo da vida silvestre**, Curitiba: Editora da UFPR, 2004.  
17 cap.16. p.423-454.
- 18 MEUSEL, M.S., MORITZ, R.F.A. Transfer of paternal mitochondrial DNA during  
19 fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. *Current Genetic*, v.24, p.539-543.  
20 1993.
- 21 MILLER, M.P. **Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows**  
22 **program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data**.  
23 Northern Arizona University, Flagstaff. 1997.
- 24 MORATO E.F. Abundância e riqueza de machos de Euglossini (Hymenoptera:  
25 Apidae) em mata de terra firme e áreas de derrubada, nas vizinhanças de Manaus  
26 (Brasil). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Zoologia*, v.10. p.95-  
27 105. 1994.

- 1 MORATO, E.F. Estudos sobre comunidades de abelhas Euglossini. In: III Encontro  
2 Sobre Abelhas, Ribeirão Preto. **Anais do 3º Encontro Sobre Abelhas**. Ribeirão  
3 Preto : Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 1998. v.3. p.135-  
4 143. 1998.
- 5 MORELLATO, L.P.C.; HADDAD, C.F.B. Introduction: the Brazilian Atlantic Forest.  
6 **Biotropica**, v.32, p.786-792. 2000.
- 7 MURREN, C.J. Effects of habitat fragmentation on pollination: pollinators, pollinia  
8 viability and reproductive success. **Journal of Ecology**, v.90, p.100-107. 2002.
- 9 MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G. Biodiversity hotspots for  
10 conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858. 2000.
- 11 NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small  
12 number of individuals. **Genetics**, v.89, p.583-590. 1978.
- 13 OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R; VIEIRA, M.L.C.  
14 **Origing, evolution and genome distribution of microsatellite**. **Genetics and**  
15 **Molecular Biology**, v. 29, p.294-307. 2006.
- 16 PACKER, L.; OWEN, R. Population genetic aspects of pollinator decline.  
17 **Conservation Ecology**, v.5, article 4. <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art4>. 2001
- 18 PALUMBI, S.R. Nucleid Acids II: the polymerase chain reaction. In: HILLS, D.M.;  
19 MORITZ, C.; MABLE, B.K. **Molecular systematics**. Sinauer Associates,  
20 Massachusetts. p.169-180. 1996.
- 21 PEREZ-SWEENEY, B.M.; RODRIGUES, F.P.; MELNICK, D.J. Metodologias  
22 moleculares utilizadas em genética da conservação. In: CULLEN JR, L.; RUDRAN,  
23 R.; VALLADARES-PADUA, C. **Métodos de estudo em biologia da conservação e**  
24 **manejo da vida silvestre**, Curitiba: Editora da UFPR, cap.13. p.343-366. 2004.
- 25 PERUQUETTI, R.C.; CAMPOS, L.A.O; COELHO, C.D.P.; ABRANTES, C.V.M.;  
26 LISBOA, L.C.O. Abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica:  
27 abundância, riqueza e aspectos biológicos. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16,  
28 p.101-118. 1999.

- 1 PLEASANTS, J.M. Structure of plant and pollinator communities. In: **Handbook of**  
2 **Experimental Pollination Biology**. p.375-395. 1983.
- 3 POWELL, A.H.; POWELL, G.N.N. Population dynamics of male euglossine bees in  
4 Amazonian forest fragments. **Biotropica**, v.19, p.176-179. 1987.
- 5 PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**, Londrina: Ed. Planta.  
6 P. 99-104, 2001.
- 7 PRUETT, C.L.; WINKER, K. The effects of sample size on population genetic  
8 diversity estimates in song sparrows *Melospiza melodia*. **Journal of Avian Biology**,  
9 v. 39, p. 252-256. 2008.
- 10 RAY, J.D. Fragment Length Calculator: a Windows 95 program for calculating DNA  
11 fragment length, **Journal of Heredity**, v.91, p.177-178. 2000.
- 12 RAW, A. The dispersal of euglossine bees between isolated patches of eastern  
13 Brazilian wet forest (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira de Entomologia**,  
14 v.33, p.103-107. 1989.
- 15 REBÊLO, J.M.M. **História natural das euglossíneas – as abelhas das orquídeas**,  
16 São Luís: Lithograf, 2001.
- 17 ROUBIK, D.W.; HANSON, P.E. **Orchid bees of Tropical America: Biology and**  
18 **field guide**, INBio Press, Heredita, Costa Rica. 2004.
- 19 ROUBIK, D.W.; WEIGT, L.A.; BONILLA, M.A. Population genetics, diploid males, and  
20 limits to social evolution of euglossine bees. **Evolution**, v.50, p.931–935. 1996.
- 21 SAIKI, R.K. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction  
22 site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, **Science**, v.230, p. 1350-1354. 1985.
- 23 SCHLINDWEIN, C. A importância de abelhas especializadas na polinização de  
24 plantas nativas e conservação do meio ambiente. In: ENCONTRO SOBRE  
25 ABELHAS, 4., 2000, Ribeirão Preto. **Anais do Encontro Sobre Abelhas**, Ribeirão  
26 Preto: Edusp, 2000. p.131-141.

- 1 SILVESTRE, D.; DOWTON, M.; ARIAS M.C. The mitochondrial genome of the  
2 stingless bee *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): sequence, gene  
3 organization and a unique tRNA translocation event conserved across the tribe  
4 Meliponini. **Genetic Molecular Biology**, v.31, p. 451-460. 2008.
- 5 SOARES, F.S.; MEDRI, M.E., 2002. Alguns aspectos da colonização da bacia do rio  
6 Tibagi In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (eds.) **A**  
7 **Bacia do Rio Tibagi**, Londrina: Editora dos Editores, 2002. p. 69-79.
- 8 SOFIA, S.H.; PAULA, F.M.; SANTOS, A.M.,; ALMEIDA, F.S.; SODRÉ, L.M.K.  
9 Genetic structure analyses of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae) populations  
10 from southern Brazilian Atlantic rainforest remnants. **Genetics and Molecular**  
11 **Biology**, v.28, p. 479-484. 2005.
- 12 SOFIA, S.H.; SANTOS, A.M.; SILVA, C.R.M. Euglossine bees (Hymenoptera,  
13 Apidae) in a remnant of Atlantic Forest in Paraná State, Brazil. **Iheringia**, v.94, p217-  
14 222. 2004.
- 15 SOFIA, S.H.; SUZUKI, K.M. Comunidades de machos de abelhas Euglossina  
16 (Hymenoptera: Apidae) em fragmentos florestais no sul do Brasil. **Neotropical**  
17 **Entomology**, v.33, p.693-702, 2004.
- 18 SOLÉ-CAVA, A.J. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In MATIOLI,  
19 S.R., **Biologia Molecular e Evolução**, Ribeirão Preto: Holos, cap. 17, p.171-190,  
20 2001.
- 21 SORK, V.L.; CAMPBELL, D.; DYER, R.; FERNANDEZ, J.; NASON, J.; PETIT, R.;  
22 SMOUSE, P.; STEINBERG., E. Current approaches: gene flow on ecological time  
23 scales (Summary of workshop discussions). In: **Proccedings from a workshop on**  
24 **gene flow in fragmented, managed, and continuous populations**. University of  
25 California, USA, pp. 5-9. 2003.
- 26 SOUZA, R.O.; CERVINI, M.; DEL LAMA, M.A.; PAXTON, R.J. Microsatellite loci for  
27 euglossine bees (Hymenoptera, Apidae). **Molecular Ecology Notes**, p. 1-5.  
28 disponível *on line* (11/8/2007). 2007.

- 1 STEFFAN-DEWENTER, I.; POTTS, S.G.; PACKER, L. Pollinator diversity and crop  
2 pollination services are at risk. **Trends in Ecology and Evolution**, v.12,  
3 doi:10.1016/j.tree.2005.09.004. 2005.
- 4 SUZUKI, K.M. **Análise genética de duas espécies de abelhas Euglossina**  
5 **(Hymenoptera, Apidae) em áreas urbanas**. 2004. 50p. Monografia (Graduação em  
6 Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.
- 7 TONHASCA, A.JR.; BLACKMER, J.L.; ALBURQUERQUE, G.S. Abundance and  
8 diversity of euglossine bees in the fragmented landscape of the Brazilian Atlantic  
9 Forest. **Biotropica**, v.34, p.416-422. 2002.
- 10 TONHASCA, A.Jr.; BLACKMER, J.L.; ALBUQUERQUE, G.S. Dispersal of euglossine  
11 bees between fragments of the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Tropical**  
12 **Ecology**, v.19, p. 99-102. 2003.
- 13 TOREZAN, J.M. Nota sobre a vegetação da bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E.;  
14 BIANCHINI E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (eds.) **A Bacia do Rio Tibagi**,  
15 Londrina: Edição dos Editores, p.103-107. 2002.
- 16 UNRUH, T.R; MESSING, R.H. Intraspecific biodiversity in Hymenoptera: implications  
17 for conservation and biological control. In: LASALLE J., GAULD I.D. (Eds.)  
18 **Hymenoptera and biodiversity**. Wallingford: C-A-B International. p.27-52. 1993.
- 19 VINSON, S.B.; FRANKIE, G.W.; BARTHELL, J. Threats to the diversity of solitary  
20 bees in a Neotropical dry forest in Central America. in: LASALLE J., GAULD I.D.  
21 (Eds.) **Hymenoptera and biodiversity**. Wallingford: C-A-B International. p.53-81.  
22 1993.
- 23 WALDSCHMIDT, A.M., LOPES, L.A.; MARCO P.JR.; CAMPOS, L.A.O. Genetic of  
24 Euglossini bees (Hymenoptera) in fragments of the Atlantic forest in the region of  
25 Viçosa, MG. **Brazilian Journal of Biology**, v.65, p.541-549. 2005.
- 26 WIDMER, A.; SCHMID-HEMPEL, P. The population genetic structure of a large  
27 temperate pollinator species, *Bombus pascuorum* (Scopoli) (Hymenoptera: Apidae).  
28 **Molecular Ecology**, v.8, p.387-398. 1999.

- 1 WILLIAMS, N.H.; DODSON, C.H. Selective attraction of male euglossine bees to  
2 orchid floral fragrances and its importance in long-distance pollen flow. **Evolution**,  
3 v.26, p.84-95. 1972.
- 4 WILLIAMS, N.H.; WHITTEN, W.M. Orchid floral fragrances and male euglossine  
5 bees: methods and advances in the last sesquidecade. **Biological Bulletin**, v.164,  
6 p.355-395. 1983.
- 7 WILLIAMS, N.M.; MINCKLEY, R.L.; SILVEIRA, F.A. Variation in native bee faunas  
8 and its implications for detecting community changes. **Conservation Ecology**, v.5  
9 (1)[disponível em: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art7/>]. 2001.
- 10 WILSON, E.O. **The insect societies**. Cambridge: Belknap Press. 548p. 1971.
- 11 WRIGHT, S. Variability within and among natural populations. **Evolution and the**  
12 **genetics of populations**. University of Chicago Press, USA, v.4. 1978.
- 13 ZAYED, A.; PACKER, L. High levels of diploid male production in a primitively  
14 eusocial bee (Hymenoptera: Halictidae). **Heredity**, v.87, p.631–636. 2001.
- 15 ZAYED, A.; PACKER, L. Complementary sex determination substantially increases  
16 extinction proneness of haplodiploid populations. **Proceedings of National**  
17 **Academy of Sciences**, v.102, p.10742-10746. 2005.
- 18 ZAYED, A.; ROUBIK, D.W.; PACKER, L. Use of diploid male frequency data as an  
19 indicator of pollinator decline. **Proceedings of the Royal society of London**, v.271,  
20 p.S9-S12. 2004.
- 21 ZIMMERMAN, J.K.; MADRINAN, S.R. Age structure of male *Euglossa imperialis*  
22 (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) at nectar and chemical sources in Panama.  
23 **Journal of Tropical Ecology**, v.4, p.303-306. 1988.
- 24 ZUCCHI, R.; CAMARGO, J.M.F.; SAKAGAMI, S.F. Biological observations on a  
25 Neotropical bee, *Eulaema nigrita*, with a review on the biology of Euglossinae  
26 (Hymenoptera: Apoidea) - A comparative study. **Journal of Faculty Science**  
27 **Hokkaido University, Zoology**, v.17, p.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](#)