

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO  
LABORATÓRIO DE GENÉTICA EVOLUTIVA DE HIMENÓPTEROS

“O padrão de dispersão é sexo-assimétrico nos Euglossíneos  
(Hymenoptera: Apidae: Euglossini)? Um estudo de caso:  
*Euglossa cordata*.”



Foto: Cíntia A. Oi

Natália de Campos Muradas Cerântola

São Carlos – SP  
2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO  
LABORATÓRIO DE GENÉTICA EVOLUTIVA DE HIMENÓPTEROS**

**“O padrão de dispersão é sexo-assimétrico nos Euglossíneos  
(Hymenoptera: Apidae: Euglossini)? Um estudo de caso:  
*Euglossa cordata*.”**

**Natália de Campos Muradas Cerântola**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Genética  
e Evolução do Centro de Ciências  
Biológicas e da Saúde da Universidade  
Federal de São Carlos, como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de  
Mestre em Genética e Evolução, Área de  
Concentração: Genética e Evolução.**

**Orientador: Marco Antonio Del Lama.**

**São Carlos – SP**

**2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C415pd

Cerântola, Natália de Campos Muradas.

O padrão de dispersão é sexo-assimétrico nos Euglossíneos (Hymenoptera: Apidae: Euglossini)? Um estudo de caso: *Euglossa cordata*. / Natália de Campos Muradas Cerântola. -- São Carlos : UFSCar, 2009. 76 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Genética de populações. 2. Dispersão. 3. Euglossini. 4. Microssatélites. 5. DNA mitocondrial. I. Título.

CDD: 575.15 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

O padrão de dispersão é sexo-assimétrico nos Euglossíneos (Hymenoptera:  
Apidae: Euglossini)? Um estudo de caso: *Euglossa cordata*

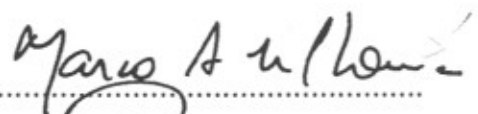
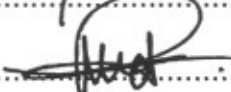
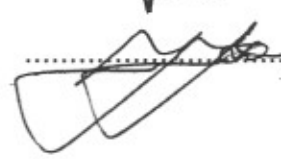
Dissertação de Mestrado de Natália de Campos Muradas Cerântola

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

Prof. Dr. Lúcio Antonio de Oliveira Campos

Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

  
.....  
  
.....  
  
.....

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Saulo e Carmen, pelos 25 anos de apoio, torcida, suporte e amor incondicional.

Aos meus irmãos, Marília, Paula e Pedro por essa relação maravilhosa que temos. Não sei o que seria de mim sem vocês.

À minha avó Rose, pela pessoa iluminada que é, sempre disposta a dar o colo mais gostoso.

À toda minha família, que de alguma forma sempre me apoiou.

Ao professor Marco Antonio Del Lama, por toda a dedicação, participação, ensinamento e por me estimular a descobrir meu potencial. Descobri o verdadeiro sentido da palavra orientador e acredito que ele tenha sido muito mais do que isso.

Ao pessoal do laboratório, Camilla, Cíntia, Isabel, Juliana, Juliano, Kátia, Keize, Luana, Otávio e Thaís. Cada um de vocês merece um obrigado especial, seja por me ajudar no laboratório e coletas ou por proporcionar momentos únicos de conversas, sérias ou não, risadas, cafés, almoços no RU e etc.

À Valéria, por ter sido quase uma irmã para mim todos esses anos. Obrigada por aturar meu stress e compartilhar tantos momentos, bons e ruins, por OITO temporadas.

Às pessoas amadas da Bio 02, que se mantêm presentes seja nas lembranças ou nos momentos maravilhosos, infelizmente raros, que conseguimos nos reunir.

Aos que mais escutam minhas dúvidas e reflexões durante o trajeto graduação/pós: Valéria, Marília, Daniela, Raquel, Fernanda, Maria Amélia, Mariana S., Kelvin, Pedro, Lia, Otávio, Marcelo, Gustavo Cravos, Mariana B., Marcelo Tavin, Leandro, Rafael, Filipe, Bruno e, mais recentemente, Renata, Paula, Cíntia e Fábio Tosh.

À Paula, novamente, por entender a minha monopolização do computador.

Às meninas do futebolzinho semanal, pelas risadas e aumento de serotonina.

Às pessoas do departamento que se fizeram presentes de alguma maneira nesses dois anos, Regina, Samantha, Patrícia, Thaís, Emannuel, Carol, Josi, Luciana, Marina, Carla, Bia, Iderval e quem mais eu possa ter esquecido.

Ao Rogério Oliveira Souza, Margarita María López-Uribe e Marcelo Cervini, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Ao prof. Dr. Celso Feitosa Martins, da Universidade Federal da Paraíba, pelas amostras de João Pessoa.

A todos os meus professores, que de alguma forma me inspiraram e participaram da minha formação durante cerca de 20 anos de estudo. Especialmente, para esse trabalho, agradeço à Sílvia Nassif Del Lama, Reynaldo Alves de Brito e João Alexandrino.

À Greissi, por resolver meus problemas burocráticos eficientemente e com tanta simpatia.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A tribo Euglossini é constituída por abelhas relativamente grandes, que possuem tegumento metálico, de coloração brilhante. Sua língua é extremamente longa, o que possibilita utilizar recursos de néctar inacessíveis a outras abelhas. Dotadas de alta capacidade de dispersão, são capazes de sobreviver em ambientes perturbados, além de constituírem até 25% da diversidade de abelhas em algumas matas. São importantes polinizadores de diversas Angiospermas, especialmente de Orchidaceae, sendo fundamentais para a manutenção da estabilidade das comunidades vegetais onde se encontram. Algumas espécies da tribo são abundantes nas cidades, em particular, *Euglossa cordata*. A variabilidade genética de cinco populações urbanas desta espécie foi estimada por López-Urbe (2006) em adultos coletados em flores de *Thevetia peruviana* durante a coleta de néctar. A ausência de estruturação verificada a partir de locos nucleares alozímicos e a significativa estruturação populacional para a região 16S mitocondrial indicavam que machos e fêmeas apresentavam padrão de dispersão distinto, em que as fêmeas eram filopátricas, enquanto os machos eram os dispersores. Para corroborar esta hipótese, este trabalho teve como objetivo determinar por meio de marcadores genéticos mitocondriais e nucleares a estrutura genética de populações de *E. cordata* coletadas em flores de *T. peruviana* em cidades ao longo de um transecto norte/sul do Estado de São Paulo. A diferenciação genética encontrada para 12 populações analisadas foi significativa para os dados de seqüência da região mitocondrial *cytb* ( $F_{st}=0,15$ ;  $P<0,05$ ), ao contrário do observado para nove locos microssatélites ( $F_{st}=0,008$ ;  $P>0,05$ ). Locos alozímicos também foram analisados, com o intuito principal de verificar a espécie dos indivíduos; a maioria dos polimorfismos demonstraram que as populações são homogêneas, semelhantemente aos dados de microssatélites. Assim, nossos dados de genes nucleares indicam fortemente que não há indícios de estruturação populacional em *E. cordata*, enquanto que os dados mitocondriais parecem indicar estruturação populacional e que a proximidade geográfica influencia os eventos de colonização. Neste sentido, os dados indicam que dispersão e colonização em *E. cordata* são atributos característicos de machos e fêmeas, respectivamente.

## ABSTRACT

The Tribe Euglossini consists of relatively large bees, with metallic skin and bright color. Their extremely long tongue enables them to use nectar resources that are inaccessible to other bees. Equipped with high capacity of dispersal, they are able to survive in disturbed environments, and compose even 25% of bees diversity in some forests. As important pollinators of many Angiosperms, especially Orchidaceae, they are fundamental to maintaining the stability of plant communities. Some species of the tribe are abundant in cities, in particular, *Euglossa cordata*. The genetic variability of five urban populations of this species was estimated by López-Urbe (2006) in adults caught while they were collecting nectar in flowers of *Thevetia peruviana*. The lack of structure found from nuclear loci (allozymes) and significant population structure for the 16S mitochondrial region are evidences that males and females showed different patterns of dispersion, where females are philopatrics while males are dispersers. To corroborate this hypothesis, this study aimed to determine the genetic structure of populations of *E. cordata* collected in flowers of *T. peruviana* in cities along a north/south transect of the State of São Paulo using mitochondrial and nuclear genetic data. The genetic differentiation found in the examined 12 populations was significant for the data sequence of mitochondrial *cytb* region ( $F_{st}=0.15$ ;  $P<0.05$ ), unlike observed for nine microsatellite loci ( $F_{st}=0.008$ ;  $P>0.05$ ). Allozymes loci were analyzed with the primary purpose of checking the individuals species; most polymorphisms showed that the populations are homogeneous, similar to the microsatellite data. Thus, our data from nuclear genes strongly suggest that there is no evidence of population structure in *E. cordata*, whereas mitochondrial data suggest structured population and that geographical proximity influence the events of colonization. Our results indicate that dispersal and colonization in *E. cordata* are characteristic attributes of males and females, respectively.



## ÍNDICE

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1.	As abelhas em áreas urbanas	20
1.2.	Dispersão sexo-assimétrica e a genética das populações	23
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
3.1.	Material	27
3.2.	Extração de DNA	28
3.3.	Amplificação do DNA mitocondrial	29
3.4.	Seqüenciamento do DNA mitocondrial	29
3.5.	RFLP-PCR do DNA mitocondrial	30
3.6.	Análise alozímica	30
3.7.	Microssatélites	31
3.8.	Análise de dados	31
<b>4.</b>	<b>Resultados</b>	<b>33</b>
4.1.	DNA mitocondrial	33
4.1.1.	Sequenciamento da região <i>cytb</i>	33
4.1.2.	RFLP-PCR	37
4.1.2.1.	Região <i>cytb</i>	37
4.1.2.2.	Região 16S	38
4.1.3.	Análise da estruturação populacional	40
4.1.4.	Rede de haplótipos	43
4.2.	DNA nuclear	45
4.2.1.	Análise alozímica	45
4.2.2.	Análise de microssatélites	47
4.2.3.	Análise da estruturação populacional	51
4.2.4.	Análise de macho diplóide	51
<b>5.</b>	<b>Discussão</b>	<b>52</b>
5.1.	DNA mitocondrial	52
5.2.	DNA nuclear	54
5.3.	Dispersão sexo-assimétrica em <i>Euglossa cordata</i>	56
<b>6.</b>	<b>Conclusões e Perspectivas</b>	<b>59</b>

<b>7. Referências Bibliográficas</b>	<b>61</b>
<b>8. Apêndices</b>	<b>72</b>
Apêndice 1	<b>72</b>
Apêndice 2	<b>73</b>
Apêndice 3	<b>74</b>

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 3.1:** Distância par-a-par (em km) entre as cidades de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa; latitude (sul) e longitude (oeste) de cada localidade **pág.28**

**Tabela 3.2:** Número (e proporção) de machos, fêmeas e total de indivíduos de *Euglossa cordata* coletados nas cidades de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa **pág.28**

**Tabela 4.1:** Haplótipos encontrados nas 141 seqüências da região *cytb* de *Euglossa cordata*, com polimorfismo de bases nitrogenadas em oito sítios dos 355 pb recuperados **pág.34**

**Tabela 4.2:** Abaixo da diagonal, valores de Fst par-a-par para 355 pb da região *cytb* de amostras de *Euglossa cordata* de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa. Em vermelho, Fst de valor significativo ( $p \leq 0,05$ ). Acima da diagonal, valores da significância de cada Fst calculado (P) **pág.35**

**Tabela 4.3:** Porcentagem da variação, entre as seqüências de *cytb*, presente nos diferentes níveis hierárquicos (populações e indivíduos), estimada por AMOVA, pelo teste de distância de Kimura (1983). P=significância **pág.36**

**Tabela 4.4:** Porcentagem da variação, entre as seqüências de *cytb*, presente nos diferentes níveis hierárquicos (grupos, populações e indivíduos), estimada por AMOVA, pelo teste de distância de Kimura (1983), para o primeiro agrupamento. P=significância **pág.36**

**Tabela 4.5:** Porcentagem da variação, entre as seqüências de *cytb*, presente nos diferentes níveis hierárquicos (grupos, populações e indivíduos), estimada por AMOVA, pelo teste de distância de Kimura (1983), para o segundo agrupamento. P=significância **pág.36**

**Tabela 4.6:** Valores de Fst para cada grupo de cidades considerados no agrupamento 1 e 2 dos teste de AMOVA. Em vermelho, Fst de valor significativo ( $P < 0,05$ ) **pág.37**

**Tabela 4.7:** Frequência de haplótipos de *cytb* obtidos após digestão pelas enzimas de restrição *Vspl*, *Apol*, *Sspl* e *Tsp* DTI em amostras de *Euglossa cordata* coletadas em Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa **pág.37**

**Tabela 4.8:** Frequência dos padrões "A" e "B" em amostras de *Euglossa cordata* de Araraquara e Leme, resultantes da digestão da região 16S pela enzima *Vspl* **pág.39**

**Tabela 4.9:** Freqüência dos haplótipos A e B obtidos por digestão da região 16S com a enzima *Vspl* em amostras de Rifaina, Pedregulho, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos e Leme **pág.39**

**Tabela 4.10:** Média dos valores de Ln da probabilidade dos dados, para K=1 a 12, para os dados de 14 sítios polimórficos das seqüências da região mitocondrial *cytb*, nas 12 localidades de estudo. Em vermelho, a maior média L(K) **pág.40**

**Tabela 4.11:** Freqüências dos 10 conjuntos de dados (clusters) considerados em cada uma das cidades amostradas, Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa (N=número de indivíduos) **pág.41**

**Tabela 4.12:** Média dos valores de Ln da probabilidade dos dados, para K=1 a 12, para os dados de haplótipos das seqüências da região mitocondrial *cytb*, nas 12 localidades de estudo. Em vermelho, a maior média L(K) **pág.42**

**Tabela 4.13:** Freqüências dos 11 conjuntos de dados (clusters) considerados em cada uma das cidades amostradas, Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa (N=número de indivíduos) **pág.42**

**Tabela 4.14:** Freqüência dos haplótipos 1-14, resultantes da combinação de oito sítios polimórficos da região *cytb* em amostras de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa **pág.43**

**Tabela 4.15:** Parâmetros resultantes do teste de neutralidade de Fu (1997). No=número de alelos observados; Ne=número de alelos esperados; Fs=índice de expansão/retração populacional; P=0,024 (expansão significativa) **pág.44**

**Tabela 4.16:** Alelos “diagnósticos” dos locos esterase-3 (EST-3), malato desidrogenase (MDH) e enzima málica (ME), utilizados para a identificação da espécie *Euglossa cordata* **pág.45**

**Tabela 4.17:** Parâmetros estimados para as populações de fêmeas de *Euglossa cordata* das cidades de Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, Leme, Rio Claro e Piracicaba. A=número de alelos; N=número de indivíduos analisados; Hd=diversidade gênica; Fis=coeficiente de endogamia; Ho=heterozigosidade observada; He=heterozigosidade esperada. Em vermelho, populações que não se encontram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; em verde, populações com coeficiente de endogamia significativo **pág.46**

**Tabela 4.18:** Significância do cálculo de qui-quadrado para o Fst de cada loco alozímico e do valor médio. Em vermelho, Fst de valor significativo (P<0,05) **pág.47**

**Tabela 4.19:** Abaixo da diagonal, valores de Fst par-a-par para os locos alozímicos em Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, Leme, Rio

Claro e Piracicaba. Em vermelho, Fst de valor significativo ( $P < 0,05$ ). Acima da diagonal, valores da significância de cada Fst calculado (P) **pág.47**

**Tabela 4.20:** Proporção do total de alelos dos locos microssatélites de *Euglossa cordata* presente nas amostras de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa **pág.47**

**Tabela 4.21:** Estimativas dos parâmetros Fis (coeficiente de endogamia), Ho (heterozigosidade observada) e He (heterozigosidade esperada) nas populações de fêmeas e dos parâmetros A (número de alelos) e Hd (diversidade gênica) nas populações de machos e fêmeas de *Euglossa cordata* de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa. N=número de indivíduos (fêmeas + machos). Em vermelho, populações que não se encontram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; em verde, populações com coeficiente de endogamia significativo **pág.48**

**Tabela 4.22:** Significância do cálculo de qui-quadrado para o Fst de cada loco microssatélite e do valor médio. Em vermelho, Fst de valor significativo ( $P < 0,05$ ) **pág.49**

**Tabela 4.23:** Abaixo da diagonal, valores de Fst par-a-par para os locos microssatélites em Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa. Em vermelho, Fst de valor significativo ( $P < 0,05$ ). Acima da diagonal, valores da significância de cada Fst calculado (P) **pág.49**

**Tabela 4.24:** Porcentagem da variação dos locos microssatélites presente nos diferentes níveis hierárquicos (populações e indivíduos), estimada por AMOVA, pelo teste de distância de Kimura (1983). P=significância **pág.50**

**Tabela 4.25:** Porcentagem da variação dos locos microssatélites presente nos diferentes níveis hierárquicos (grupos, populações e indivíduos), estimada por AMOVA, pelo teste de distância de Kimura (1983). P=significância **pág.50**

**Tabela 4.26:** Média dos valores de Ln da probabilidade dos dados, para locos alozímicos (A: K=1 a 9) e locos microssatélites (B: K=1 a 12) em, respectivamente, 9 e 12 localidades de estudo. Em vermelho, a maior média L(K) **pág.51**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Fêmea da tribo Bombini. A seta mostra a corbícula, carregada de pólen. (Foto disponível em: <http://www.flickr.com/photos/aasta/2634447558/>; Acesso em 21/05/2009). **pág.15**
- Figura 1.2:** *Melipona quadrifasciata* (Foto: Thiago Mlaker) **pág.16**
- Figura 1.3:** *Bombus terrestris* (Foto: Joaquim Alves Gaspar) **pág.16**
- Figura 1.4:** *Apis cerana* (Foto: Charles Lam) **pág.16**
- Figura 1.5:** *Euglossa cordata* (Foto: Cíntia A. Oi) **pág.16**
- Figura 1.6:** *Euglossa cognata* (Foto: Margarita M. López-Uribe) **pág.17**
- Figura 1.7:** *Eufriesea pulchra* (Foto: Margarita M. López-Uribe) **pág.17**
- Figura 1.8:** *Eulaema meriana* (Foto: Barbara Strnadova) **pág.17**
- Figura 1.9:** *Exaerete frontalis* (Foto: Margarita M. López-Uribe) **pág.17**
- Figura 1.10:** *Aglae* (Foto: Santiago Ramírez) **pág.17**
- Figura 1.11:** *Eulaema cingulata* carregando polinários (indicados pela seta) de uma *Orchidaceae* (Foto: Margarita M. López-Uribe) **pág.19**
- Figura 1.12:** *Thevetia peruviana*. Em destaque, um macho de *Eulaema nigrita* coletando néctar na flor (Fotos: Margarita M. López-Uribe) **pág.22**
- Figura 3.1:** Mapa do Estado de São Paulo mostrando as cidades onde foram coletadas as amostras de *Euglossa cordata* utilizadas no estudo de dispersão sexo-assimétrica. **pág.27**
- Figura 4.1:** Gel de poliacrilamida 8% corado com prata demonstrando a região *cytb* de *Euglossa cordata* amplificada por PCR com o primer descrito por Crozier et al. (1991). A figura mostra o fragmento resultante, de cerca de 485 pb, e a seta indica a direção de migração no gel **pág.33**
- Figura 4.2:** Gel de agarose 1% corado com Gel Red™ e visualizado em luz UV, mostrando os fragmentos de *cytb* antes (A) e depois (B) da purificação. A seta indica a direção de migração no gel **pág.33**
- Figura 4.3:** Regressão entre os valores de *Fst* par-a-par (eixo y) para a região *cytb* e o Ln da distância (em Km\*10<sup>3</sup>) par-a-par (eixo x) entre as cidades analisadas **pág.35**
- Figura 4.4:** Frequência dos haplótipos *cytb-Vspl* (1), *cytb-Apol* (2), *cytb-Sspl* (3) e *cytb-TspDTI* (4) nas cidades de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba,

Bertioga e João Pessoa, obtidos após digestão da região *cytb* de *Euglossa cordata* com as enzimas de restrição *Vspl*, *Apol*, *Sspl* e *TspDTI*, respectivamente **pág.38**

**Figura 4.5:** Gel de poliacrilamida 8% corado com prata demonstrando a região 16S de *Euglossa cordata* amplificada por PCR com os primers descritos por Downton e Austin (1994) e Cameron et al. (1992). A figura mostra o fragmento resultante, de cerca de 580 pb, e a seta indica a direção de sua migração no gel **pág.38**

**Figura 4.6:** Padrões de restrição por *Vsp I* da região 16S de *Euglossa cordata* verificados em gel de poliacrilamida 12% corado com prata. A figura mostra os padrões "A" e "B" e o tamanho aproximado dos fragmentos; a seta indica a direção de migração no gel **pág.39**

**Figura 4.7:** Frequência dos haplótipos 16S-*Vspl* A (azul) e 16S-*Vspl* B (vermelho) nas cidades de Rifaina, Pedregulho, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos e Leme, obtidos com o corte da região 16S de *Euglossa cordata* com a enzima de restrição *Vspl* **pág.40**

**Figura 4.8:** Distribuição dos 10 conjuntos de dados (clusters) nas cidades de Rifaina (1), Pedregulho (2), Franca (3), Ribeirão Preto (4), Jaboticabal (5), Araraquara (6), São Carlos (7), Leme (8), Rio Claro (9), Piracicaba (10), Bertioga (11) e João Pessoa (12), analisadas considerando K=10 **pág.41**

**Figura 4.9:** Distribuição dos 11 conjuntos de dados (clusters) nas cidades de Rifaina (1), Pedregulho (2), Franca (3), Ribeirão Preto (4), Jaboticabal (5), Araraquara (6), São Carlos (7), Leme (8), Rio Claro (9), Piracicaba (10), Bertioga (11) e João Pessoa (12), analisadas considerando K=11 **pág.42**

**Figura 4.10:** Frequência dos haplótipos 1-14, resultantes da combinação de oito sítios polimórficos da região *cytb* em amostras de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa **pág.43**

**Figura 4.11:** Rede de haplótipos gerada com dados de 142 seqüências da região *cytb* em amostras de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa. Em vermelho, o número do haplótipo que representa cada circunferência. As linhas pontilhadas indicam regiões onde mais de um passo mutacional pode ter originado o mesmo haplótipo **pág.44**

**Figura 4.12:** Gel de amido 14% mostrando polimorfismo em *Euglossa cordata* para os sistemas de glicose fosfato desidrogenase (GPI) (92/100; 100/100; 100/100; 100/100; 96/100), malato desidrogenase (MDH) (92/100; 100/100; 92/100; 100/100; 92/92),  $\alpha$ -glicerofosfato desidrogenase ( $\alpha$ Gpdh) (100/100; 100/100; 100/100; 96/100; 100/100) e fosfoglicomutase (Pgm) (96/100; 100/100; 100/100; 100/100; 100/100) **pág.45**

**Figura 4.13:** Regressão entre os valores de Fst par-a-par (eixo y) para os locos microssatélites e o Ln da distância (em Km\*10<sup>3</sup>) par-a-par (eixo x) entre as cidades analisadas

**pág.50**



## 1. Introdução

Os insetos surgiram há cerca de 400 milhões de anos atrás e fazem parte da linhagem mais diversa da terra, ultrapassando a soma de todos os outros animais e dominando os ecossistemas terrestres (ENGEL; GRIMALDI, 2004). Sua diversidade, em número de espécies, excede a dos vertebrados tetrápodes na maior parte da história evolutiva (91%) (LABANDEIRA; SEPKOSKI JUNIOR, 1993) e uma grande variedade de traços estruturais e fisiológicos e de adaptações a diferentes condições de vida ocorre nos indivíduos do grupo, tornando-os aptos a viver em diversos habitats.

A Ordem Hymenoptera (do grego *hymen* = membrana e *pteron* = asa), comumente associada a abelhas, vespas e formigas, constitui um dos grupos mais diversificados de insetos. A origem destes insetos tem sido apontada a partir da segunda metade do Triássico (RASNITSYN, 2006).

No Brasil, de acordo com Silveira *et al.* (2002), ocorrem cerca de 1600 espécies de abelhas, agrupadas nas famílias *Colletidae*, *Halictidae*, *Andrenidae*, *Megachilidae* e *Apidae*. Como parte desta diversidade, encontra-se a tribo Euglossini (*Apidae*: *Apinae*), com distribuição desde o México ao centro da Argentina, entre os paralelos 29N e 32S, sendo a maioria das espécies restrita à região Neotropical (BÚRQUEZ, 1997).

Na tíbia do último par de pernas das fêmeas de alguns *Apinae*, há uma modificação utilizada para estocar material coletado, a corbícula (Figura 1.1), fato que caracteriza o grupo dos corbiculados.



**Figura 1.1:** Fêmea da tribo Bombini. A seta mostra a corbícula, carregada de pólen. (Foto disponível em: <http://www.flickr.com/photos/aasta/2634447558/>; Acesso em 21/05/2009).

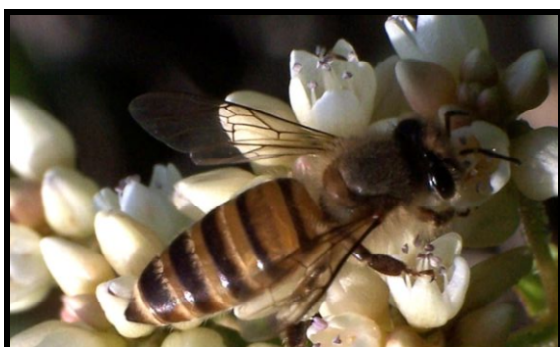
O grupo dos corbiculados inclui as tribos Meliponini (Figura 1.2), Bombini (Figura 1.3), Apini (Figura 1.4) e Euglossini (Figura 1.5), além das tribos extintas Electrapini, Electrobombini e Melikertini (ENGEL, 2005). Análises comparadas da morfologia dos corbiculados classificaram-nos como um grupo monofilético (ENGEL, 1999; KIMSEY, 1987; MICHENER, 1990). Possivelmente Euglossini represente a tribo mais basal do grupo (SCHULTZ *et al.*, 1999), mas a precisa relação entre as tribos é incerta (CAMERON, 2004).



**Figura 1.2:** *Melipona quadrifasciata* (Foto: Thiago Mlaker).



**Figura 1.3:** *Bombus terrestris* (Foto: Joaquim Alves Gaspar).



**Figura 1.4:** *Apis cerana* (Foto: Charles Lam).



**Figura 1.5:** *Euglossa cordata* (Foto: Cíntia A. Oi).

As mais de 200 espécies conhecidas de Euglossini estão distribuídas em cinco gêneros – *Euglossa* Latreille 1802 (Figuras 1.5 e 1.6), *Eufriesea* Cockerell 1909 (Figura 1.7), *Eulaema* Lepelletier 1841 (Figura 1.8), *Exaerete* Hoffmannsegg 1817 (Figura 1.9) e *Aglae* Lepelletier & Serville 1825 (Figura 1.10), sendo os dois últimos gêneros cleptoparasitas de espécies de *Eulaema* e *Eufriesea* e de *Eulaema*, respectivamente (BENNETT, 1972; GARÓFALO; ROZEN, 2001; MYERS, 1935).



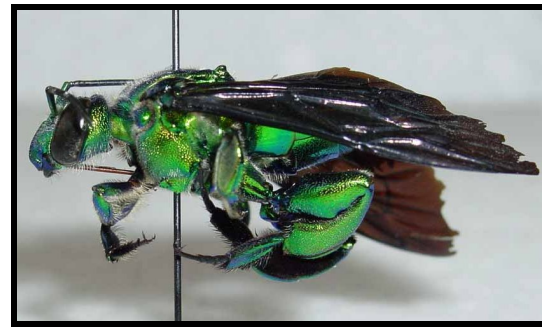
**Figura 1.6:** *Euglossa cognata* (Foto: Margarita M. López-Urbe).



**Figura 1.7:** *Eufriesea pulchra* (Foto: Margarita M. López-Urbe).



**Figura 1.8:** *Eulaema meriana* (Foto: Barbara Strnadova).



**Figura 1.9:** *Exaerete frontalis* (Foto: Margarita M. López-Urbe).



**Figura 1.10:** *Aglae* (Foto: Santiago Ramírez).

A tribo Euglossini é constituída por abelhas relativamente grandes, que possuem tegumento de coloração metálica e língua longa, excedendo em algumas espécies o dobro do tamanho do corpo, o que possibilita recursos de néctar inacessíveis a outras abelhas (BEMBÉ, 2004), tornando-as potencialmente generalistas (BORRELL, 2005). Estas características, juntamente com o fato de terem alta capacidade de dispersão, fazem delas espécies com possibilidade de sobrevivência em ambientes perturbados (AGUIAR; GAGLIANONE, 2008), além de constituírem até 25% da diversidade de abelhas em algumas matas (ROUBIK; HANSON, 2004).

Os machos de Euglossini possuem uma adaptação morfológica usada na coleta de fragrâncias para, aparentemente, atrair as fêmeas (ELTZ *et al.*, 2003). Os métodos de amostragem para o estudo de Euglossini consistem principalmente no uso de iscas-armadilha utilizando fragrâncias artificiais. Portanto, o conhecimento sobre a sistemática, ecologia e genética dessas abelhas está baseado em informações obtidas a partir da coleta dos machos atraídos por tais compostos. Devido a esse fato e à dificuldade de se localizar os ninhos na natureza, as fêmeas e a biologia de nidificação são desconhecidas, respectivamente, para cerca de 30% (RAMÍREZ *et al.*, 2002) e 80% (CAMERON, 2004) das espécies identificadas.

Na tribo Euglossini, de acordo com a classificação tradicional de Michener (1974) e Wilson (1971), é possível encontrar, além de espécies solitárias, espécies comunais (GARÓFALO *et al.*, 1998) e primitivamente eusociais (AUGUSTO; GARÓFALO, 2004). Devido à diversidade de comportamentos, este grupo pode fornecer informações relevantes para a compreensão dos mecanismos que favorecem o surgimento e a manutenção de sistemas sociais. Além disso, essas peculiares abelhas atraíram a atenção de naturalistas por serem importantes para o entendimento do comportamento eusocial também entre os corbiculados, já que possivelmente constituem o grupo mais basal dos Corbiculados (SCHULTZ *et al.*, 1999).

As abelhas Euglossini têm sido consideradas de grande importância em muitos ecossistemas devido ao seu papel como polinizadoras (Figura 1.11) de espécies de *Orchidaceae* (SINGER; SAZIMA, 1999), *Lecythidaceae* (KNUDSEN; MORI, 1996), *Euphorbiaceae* (ARMBRUSTER *et al.*, 1989), *Araceae* (MONTALVO; ACKERMAN, 1986) e *Solanaceae* (SOARES *et al.*, 1989), entre outras famílias de Angiospermas, sendo que algumas espécies de orquídeas são polinizadas exclusivamente por abelhas desta tribo (PANSARIN; AMARAL, 2008).



**Figura 1.11:** *Eulaema cingulata* carregando polinários (indicados pela seta) de uma *Orchidaceae* (Foto: Margarita M. López-Uribe).

A importância ecológica e econômica da polinização torna necessária a conservação dos polinizadores. Muitos grupos de insetos são conhecidos por polinizarem plantas, mas as abelhas provavelmente fazem parte do grupo polinizador mais importante em número e diversidade de espécies de plantas polinizadas (BAWA *et al.*, 1985), uma vez que todas as suas 20.000 espécies, exceto as cleptoparasitas e as necrófagas, são visitantes obrigatórias das flores, utilizando pólen como principal fonte de proteínas para adultos e larvas (ROUBIK, 1989). Por esta razão, são consideradas “espécies-chave” de ecossistemas tropicais e agroecossistemas (KLEIN *et al.*, 2003).

Para que um ambiente seja propício às abelhas, deve conter um conjunto de características capazes de suprir suas necessidades de sobrevivência (STEFFAN-DEWENTER, 2003). No entanto, alterações como degradação, fragmentação, agricultura, pesticidas e herbicidas (KEARNS *et al.*, 1998) podem modificar drasticamente o habitat e fazer com que estas necessidades não sejam satisfeitas, levando à extinção de populações locais.

Apesar disso, as abelhas estão se refugiando nas cidades, onde os recursos necessários para sua sobrevivência estão presentes em qualquer época do ano e os sítios de nidificação podem até ser mais abundantes do que em áreas naturais (CANE; TEPEDINO, 2001). Assim, torna-se necessário conhecer a nova dinâmica que essas populações urbanas enfrentam para melhor delinear estratégias para sua conservação.

### **1.1. As abelhas em áreas urbanas**

Segundo Cane (2005), para que as abelhas sobrevivam em ambientes urbanizados é necessário considerar três necessidades: recursos florais apropriados (e algumas vezes específicos), substratos para nidificação e condições favoráveis da matriz urbana.

Nas últimas décadas, foi descrita uma diminuição das populações de abelhas como resultado da ruptura das condições necessárias a sua sobrevivência, devido a atividades humanas, tais como degradação, fragmentação e uso de pesticidas e herbicidas (KEARNS *et al.*, 1998). A urbanização pode causar um efeito negativo sobre a biodiversidade (MORATO, 1994), embora haja relatos da importância dos ambientes urbanos como corredores e/ou “albergues” de muitas espécies de insetos (ZANETTE *et al.*, 2005). Alguns estudos realizados em áreas com forte ação antrópica ainda indicam que existem espécies que são mais abundantes nesses ambientes (OTERO; SANDINO, 2003).

Apesar dessas evidências, a possível ocorrência de redução tem levado a iniciativas regionais e mundiais para a conservação dos polinizadores (e.g. São Paulo Declaration of Pollinators: <http://www.biodiv.org/doc/case-studies/agr/cs-agr-pollinator-rpt.pdf>). Programas de conservação foram desenvolvidos, embora a maioria deles enfoque principalmente as áreas naturais onde, a teoria prediz, existe um maior número de espécies (NIEMELÄ, 1999). Ainda assim, somente uma pequena proporção de áreas naturais é protegida e o crescimento das cidades é cada vez mais significativo. Dessa forma, é importante conhecer a ecologia dessas espécies nas cidades no esforço urgente para manter esta biodiversidade.

O crescimento da população humana e a conseqüente diminuição de áreas naturais têm levado algumas espécies de abelhas a habitar as cidades, o que impõe pressões de seleção diferentes. A fragmentação irá quase sempre preceder a redução do tamanho populacional, com a conseqüente redução de variação alélica e heterozigotidade em razão da deriva genética e endogamia, respectivamente (AMOS; HARWOOD, 1998). A endogamia favorecerá a geração de machos diplóides, os quais representam um alto custo para as espécies, em razão de sua baixa capacidade reprodutiva (GARÓFALO; KERR, 1975; ZAYED, 2004; ZAYED; PACKER, 2005). Foi sugerido que a elevada

freqüência de machos diplóides em populações de euglossíneos poderia justificar a ausência de estágios avançados de eussocialidade nesta tribo, diferentemente dos demais corbiculados (ROUBIK *et al.*, 1996). Diante disso, torna-se de grande relevância o conhecimento das condições favoráveis que resultaram no estágio eusocial alcançado por poucos grupos de himenópteros.

O estudo da genética da conservação já ocorre há algumas décadas (FRANKEL; SOULÉ, 1981), mas maior atenção precisa ser dada à influência do potencial genético sobre o declínio dos polinizadores, sendo que uma das dificuldades para a manutenção e conservação das abelhas é o desconhecimento da biologia da maioria das espécies. Este cenário é ainda mais grave para as abelhas não eusociais, pouco conhecidas devido a seus ninhos cobertos, hábitos usualmente solitários e abundância restrita. Dessa forma, estudar a interação destes insetos com o meio ambiente é importante para se conhecer os meios de conservá-los (ELLIS *et al.*, 2006).

Segundo Aguiar e Gaglianone (2008), a fragmentação pode afetar de forma negativa a estrutura e os processos ecológicos do ecossistema, incluindo a polinização. Neste sentido, as abelhas euglossíneas podem ser boas indicadoras de qualidade ambiental de áreas naturais ou antrópicas, devido ao fato de que sua abundância, riqueza e composição podem ser significativamente afetadas pelo tamanho do fragmento e pela cobertura vegetal (SOFIA; SUZUKI, 2004; SOUZA *et al.*, 2005). Por serem importantes visitantes florais, a diminuição da freqüência destas abelhas em pequenos fragmentos florestais pode reduzir, conseqüentemente, a riqueza de espécies vegetais; portanto, a sua conservação é fundamental para a manutenção da estabilidade das comunidades vegetais onde elas se encontram (POWELL; POWELL, 1987).

Algumas espécies da tribo, entre elas *Eulaema nigrita* e *Euglossa cordata*, são abundantes nas cidades, onde os jardins e parques provêm recursos alimentícios durante o ano inteiro (LÓPEZ-URIBE *et al.*, 2008), e têm sido sugeridas como indicadoras de ambientes secos e alterados, encontradas até em maior número em fragmentos de área queimada, quando comparados aos preservados (AGUIAR; GAGLIANONE, 2008). Devido à característica em mosaico dos sítios naturais nas áreas urbanas, é importante avaliar o papel das

áreas verdes nas cidades como corredores para o movimento destas espécies, ou mesmo como fonte de alimento (NIEMELÄ, 1999).

A interação de algumas espécies de euglossíneos com as flores de *Thevetia peruviana* (Figura 1.12) foi descrita primeiramente por Dodson (1966). Essa *Apocynaceae* originária do Peru é comumente encontrada em cidades do Estado de São Paulo e suas flores constituem rica fonte de néctar, o que as torna atrativas às abelhas. Recentemente, dados consistentes a respeito de tal interação foram obtidos em estudo conduzido no Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros (LGEH), o qual demonstrou um padrão de baixa dispersão para forrageamento de néctar em área urbana (LÓPEZ-URIBE *et al.*, 2008). Embora evidências de dispersão a longas distâncias tenham sido relatadas para os euglossíneos (JANZEN, 1971), os indivíduos da espécie *E. cordata* marcados na cidade de São Carlos foram recapturados freqüentemente no mesmo local de captura ou muito próximos a ele (LÓPEZ-URIBE *et al.*, 2008).



**Figura 1.12:** *Thevetia peruviana*. Em destaque, um macho de *Eulaema nigrita* coletando néctar na flor (Fotos: Margarita M. López-Uribe).

Em relação à variabilidade genética de cinco populações de *E. cordata*, foi verificado por López-Uribe (2006) ausência de estruturação, considerando locos nucleares alozímicos, já que os dados demonstraram coeficiente de diferenciação interpopulacional ( $F_{st}$ ) não significativo. O gene mitocondrial 16S, ao contrário, mostrou, no mesmo trabalho, forte estruturação populacional, sugerindo que machos e fêmeas têm padrão de dispersão distinto, em que as



fêmeas apresentam comportamento filopátrico, enquanto os machos são dispersores.

Nesse contexto, a estrutura genética das populações deve diferir conforme os marcadores usados para acessá-la, sendo que os uniparentais trarão informações sobre eventos de colonização, enquanto os biparentais sobre as características da dispersão da espécie. Além disso, se há dispersão sexo-assimétrica, os dados nucleares devem apresentar aumento da variabilidade genética total e diminuição da diferenciação interpopulacional, enquanto o contrário ocorrerá com os dados mitocondriais.

## **1.2. Dispersão sexo-assimétrica e a genética das populações**

A formação de uma população na escala regional é alcançada pelo balanço entre extinções locais e a subsequente recolonização de sítios vazios do habitat (HARRISON; HASTINGS, 1996). Uma vez fixada em um local, a variabilidade da população será dependente de flutuações do ambiente (ANDREWARTHA; BIRCH, 1954), as quais influenciam grandemente sua mudança evolutiva.

A dinâmica extinção-recolonização tem conseqüências no modo com que a variação genética é estruturada dentro e entre populações (SLATKIN, 1987). Uma vez que populações fundadoras usualmente são relativamente pequenas, os eventos de colonização são influenciados principalmente pelas forças evolutivas da migração e deriva genética.

Uma importante característica dos modelos genéticos de metapopulações (LEVINS, 1970) é que eles distinguem colonização e dispersão. Números relativos distintos de colonizadores (indivíduos que colonizam um sítio vazio) e dispersores (indivíduos que emigram de seu sítio natal para outro sítio ocupado) têm importantes conseqüências sobre a partição da diversidade genética dentro e entre populações (WADE; MCCAULEY, 1988).

Em espécies animais sexuadas, a colonização necessariamente requer fêmeas, enquanto a dispersão pode envolver fêmeas e/ou machos. As fêmeas colonizadoras podem chegar fertilizadas ou não ao novo local. Caso estejam fertilizadas, colonizam o novo sítio por conta própria. Se não, podem acasalar-se com machos que vivem no entorno ou no próprio local onde ela iniciará o

processo de colonização. Fertilizadas ou não, a colonização torna-se efetiva somente quando elas produzem a nova cria.

A maioria dos estudos indiretos de dispersão sexo-assimétrica tem se baseado em análises de dados de DNA mitocondrial (indicativo de história matrilineal), interpretados conjuntamente com informação genética da população a partir de marcadores nucleares, tais como alozimas ou microssatélites, indicativos de histórias biparentais (AVISE, 2004).

A distribuição espacial de genes autossômicos neste tipo de espécie dependerá principalmente das distâncias percorridas por fêmeas e machos para os sítios de acasalamento. Se estas distâncias forem curtas, somente haverá fluxo gênico entre populações vizinhas, o que resultará em um padrão de isolamento por distância (WRIGHT, 1943). Assumindo equilíbrio entre deriva genética e fluxo gênico, o valor de  $F_{st}$  deve aumentar linearmente com o logaritmo das distâncias geográficas entre populações (ROUSSET, 1997). Considerando filopatria estrita das fêmeas, o DNA mitocondrial, ao contrário dos genes autossômicos, se espalhará somente através de novas colonizações e, assim, haverá uma correlação entre a distância geográfica e a diferenciação genética mitocondrial.

Caso dispersão e colonização sigam regras comportamentais diferentes, torna-se necessário saber se há barreiras sexo-específicas ao fluxo gênico em diferentes escalas geográficas. Assim, os dados nucleares responderão se a dispersão é limitada pela distância, enquanto a partir dos dados mitocondriais será testado o efeito da proximidade geográfica e/ou barreiras ecológicas sobre eventos de colonização.

Resultados teóricos mostram que a verificação da diferenciação genética entre as populações poderá ser realizada somente quando a escala geográfica considerada for maior do que a capacidade média de dispersão da população (ROUSSET, 1997).

Para testar a validade da hipótese de dispersão sexo-assimétrica em *E. cordata*, proposta inicialmente por López-Urbe (2006), será necessário, portanto, aumentar o número de marcadores genéticos nucleares e mitocondriais utilizados na determinação da estrutura genética de populações localizadas em uma área geográfica mais abrangente, já que há relatos de Euglossini dispersando até 50Km (DRESSLER, 1982). O aumento dos pontos

do transecto, do número de indivíduos analisados e a utilização de marcadores mais polimórficos, os microssatélites, em substituição aos marcadores alozímicos, assim como a análise de seqüências de genes mitocondriais em substituição a padrões de RFLP-PCR, gerarão informações mais consistentes que os dados prévios de López-Urbe (2006) permitindo extrair e, assim, concluir pela ocorrência ou não de dispersão sexo-assimétrica em *E. cordata*.

## 2. Objetivos

Esse trabalho teve como objetivo principal determinar, indiretamente, se ocorre dispersão sexo-assimétrica na espécie *E. cordata*, analisando a estrutura genética de populações coletadas em flores de *T. peruviana* em cidades ao longo de um transecto norte/sul do Estado de São Paulo, por meio de marcadores genéticos mitocondriais e nucleares.

Mais especificamente, foram utilizados dados nucleares para testar se a dispersão é limitada pela distância, e dados mitocondriais para testar se a proximidade geográfica e/ou barreiras ecológicas têm algum efeito sobre eventos de colonização e, com a comparação desses dados, responder se a dispersão é sexo-assimétrica e macho-enviesada na espécie estudada.

Esse projeto contribui ainda para a discussão de uma relevante e atual questão da Ecologia Teórica: “colonização e dispersão são processos biológicos distintos?”

Além disso, como se conhece muito pouco da biologia dos Euglossini (CAMERON, 2004), estudos a respeito da dinâmica de dispersão e colonização de novas áreas trarão informações complementares às descritas em relação à capacidade de vôo e tamanho populacional.

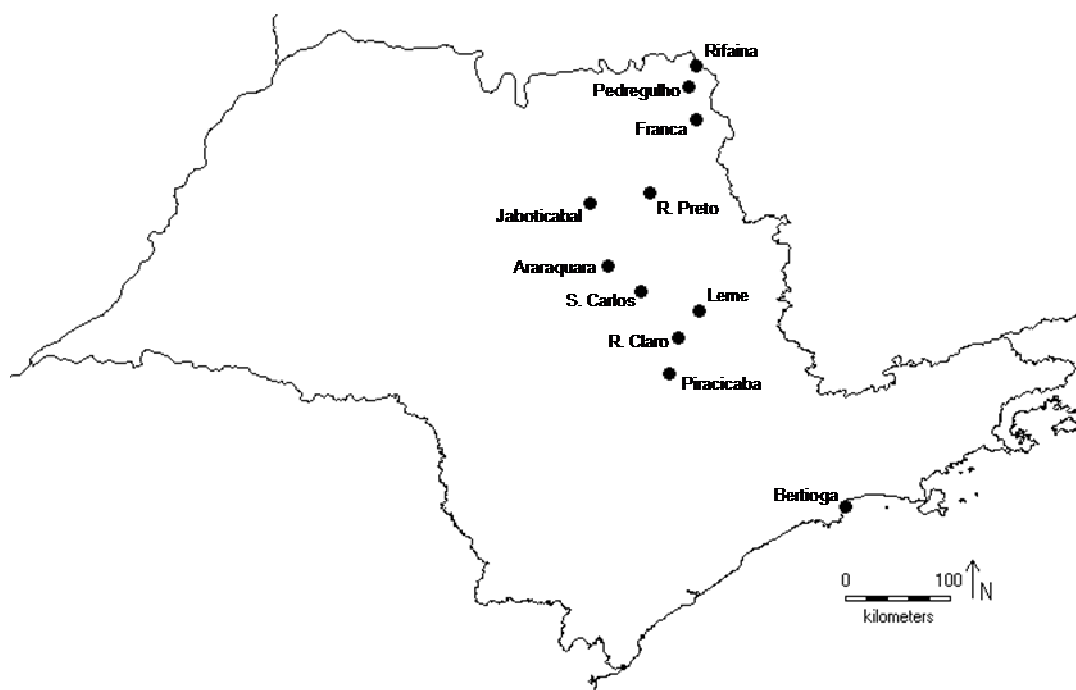
A discrepância dos dados da literatura relativos à ocorrência de machos diplóides nas populações naturais de euglossíneos é outra questão que recebeu alguma atenção neste trabalho, uma vez que a determinação da real estrutura populacional exige estudos que associem dados ecológicos aos genéticos. Essa associação poderá contribuir para o delineamento de programas de conservação não somente de Euglossini, mas de outros grupos de abelhas, como *Xylocopini* e *Centridini*, que habitam hoje as áreas urbanas.

Considerando a relevância destas abelhas para a polinização e diante de cenário ambiental tão adverso para a manutenção, preservação e conservação destas espécies, estudos a respeito da biologia reprodutiva e da dinâmica de dispersão e colonização de novas áreas por tais espécies adquirem especial significado para o futuro dos polinizadores no Brasil.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Material

Foram utilizados nesse trabalho fêmeas e machos de *E. cordata* das cidades do estado de São Paulo (Figura 3.1): Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba e Bertioga. Como controle, ainda foram analisados indivíduos provenientes de João Pessoa (Paraíba).



**Figura 3.1:** Mapa do Estado de São Paulo, mostrando as cidades onde foram realizadas coletas as amostras de *Euglossa cordata* utilizadas no estudo de dispersão sexo-assimétrica.

A localização exata de todas as cidades analisadas e as distâncias par-a-par podem ser vistas na Tabela 3.1.

Nas cidades de Bertioga e João Pessoa, os machos foram coletados utilizando iscas artificiais de cineol para atraí-los. Nas outras localidades, machos e fêmeas foram capturados ao coletar néctar em flores de *T. peruviana* (Apocynaceae). Todos os indivíduos foram pegos em saco plástico, sendo identificados, dispostos em tubo plástico no gelo e, posteriormente, mantidos à  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem analisados.

**Tabela 3.1:** Distância par-a-par (em km) entre as cidades de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa; latitude (sul) e longitude (oeste) de cada localidade.

Lat (S) / Long (O)		Ped	Fra	RP	Jab	Ara	SC	Lem	RC	Pir	Ber	JP
20°05'96" / 47°25'11"	Rif	19,6	49,6	124,6	159,4	203,8	218,1	231,6	258,2	292,6	444,5	1967,7
20°16'55" / 47°27'34"	Ped	----	30,9	106,3	141,7	183,7	198,6	211,8	237,4	273,9	421,8	1988,6
20°32'19" / 47°24'03"	Fra		----	75,1	121,1	157,9	168,1	184,2	209,2	242,1	388,6	2002,1
21°10'28" / 47°48'99"	RP			----	55,3	77,1	95,1	120,7	140,2	174	345,1	2082,3
21°01'64" / 48°04'62"	Jab				----	61,6	93,3	139	148,9	175,5	366,6	2132,2
21°47'61" / 48°10'73"	Ara					----	36,1	90,7	91,1	114,8	310,8	2165
22°00'27" / 47°53'00"	SC						----	53,7	55,8	83,6	272,1	2149,5
22°11'43" / 47°23'44"	Lem							----	28,4	66	227,3	2138,6
22°24'55" / 47°33'86"	RC								----	36	219	2161
22°43'91" / 47°38'36"	Pir									----	201,3	2193,1
23°51'16" / 46°08'19"	Ber										----	2188,9
7°06'54" / 34°51'47"	JP											----

Foram coletados 65 indivíduos em Araraquara, 43 em Bertioga, 35 em Jaboticabal, 64 em Leme, 68 em Piracicaba, 67 em Rio Claro, 64 em Ribeirão Preto e 33 em Franca. Indivíduos de Rifaina (94), Pedregulho (28), Jaboticabal (18), São Carlos (126) e João Pessoa (50), já coletados anteriormente, foram utilizados nas análises genéticas. O número de machos e fêmeas analisados e suas proporções nas 12 cidades amostradas estão apresentados na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2:** Número (e proporção) de machos, fêmeas e total de indivíduos de *Euglossa cordata* coletados nas cidades de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa.

Cidade	Machos	Fêmeas	Total
Rifaina	0 (0)	94 (1)	94
Pedregulho	0 (0)	28 (1)	28
Franca	1 (0,03)	32 (0,97)	33
Ribeirão Preto	9 (0,14)	55 (0,86)	64
Jaboticabal	11 (0,21)	42 (0,79)	53
Araraquara	5 (0,08)	60 (0,92)	65
São Carlos	3 (0,02)	123 (0,98)	126
Leme	18 (0,28)	46 (0,72)	64
Rio Claro	7 (0,1)	61 (0,9)	68
Piracicaba	31 (0,46)	37 (0,54)	68
Bertioga	43 (1)	0 (0)	43
João Pessoa	50 (1)	0 (0)	50

### 3.2. Extração de DNA

Uma perna de cada indivíduo foi retirada com pinça e macerada em nitrogênio líquido. 400 µL de Chelex 10% (WALSH *et al.*, 1991) foi adicionado e a mistura incubada por 30 min a 56° C foi, em seguida, vortexada por 10 s, fervida por 5 min e vortexada novamente. Por fim, realizou-se a centrifugação

por 10 min a 14000 rpm e o sobrenadante resultante foi utilizado para a reação de PCR.

O DNA de indivíduos já coletados anteriormente já havia sido extraído com o protocolo de fenol-clorofórmio (SHEPPARD; MCPHERON, 1991).

### 3.3. Amplificação do DNA mitocondrial

Fragmentos de genes mitocondriais foram amplificados usando os oligos iniciadores 16SWb (DOWTON; AUSTIN, 1994) e 874-16S (CAMERON *et al.*, 1992) para a região 16S e o par descrito para *Apis mellifera* para a região *cytb* (CROZIER *et al.*, 1991).

As reações para amplificação da região 16S foram preparadas com 2,5 µL de dNTPs 100 mM, 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2,5 µL de tampão Biotools 10x, 1 µL de cada oligo (R e F) a 12,5 µM, 1 µL de Taq DNA polimerase (Biotools, 1 U/µL), 1 µL de DNA extraído e água para completar 25 µL. As condições de PCR utilizadas foram: 1 ciclo de 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 20 s a 94°C, 20 s a 48°C e 1 min a 70°C.

Já para a região *cytb*, as reações foram realizadas com 2,5 µL de dNTPs 100 mM, 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2,5 µL de tampão Fermentas 10x, 1 µL de cada oligo (R e F) a 12,5 µM, 1 µL de Taq DNA polimerase (Biotools, 1 U/µL), 1 µL de DNA extraído e água para completar 25 µL. A mistura foi então submetida a 36 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 20 s e 70 °C por 1 min.

Para a confirmação do sucesso da etapa de PCR, os fragmentos foram visualizados em géis de poliacrilamida 8% corados com prata ou de agarose 1% corado com Gel Red™ e visualizado em luz UV.

### 3.4. Seqüenciamento do DNA mitocondrial

Produtos amplificados para a região *cytb* foram purificados utilizando 1 U de SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, GE Healthcare) e 10 U de *ExoI* (Exonuclease I, GE Healthcare) para cada 8 µL de produto de PCR. A mistura foi incubada a 37°C por 1 h e a 80°C por 15 min. A verificação do sucesso da etapa de purificação foi realizada em gel de agarose 1% corado com Gel Red™ e visualizado em luz UV.

A reação de seqüenciamento foi feita com 4 µL de DyEnamic ET Dye premix (GE Healthcare), 10 pmoles de cada oligo, aproximadamente 50 ng de

DNA purificado e água para completar 10 µL de volume final. As seqüências forward e reverse foram obtidas em seqüenciador automático MegaBace 750-GE e os eletroferogramas analisados no programa Codon Code 1.6.3 (disponível em Codon Code Corporation: <http://www.codoncode.com/>). Após correção, as seqüências foram alinhadas no programa MultAlin© (disponível em: <http://bioinfo.genopole-touhouse.prd.fr/multalin.html>) para verificar possíveis alterações nucleotídicas.

### **3.5. RFLP-PCR do DNA mitocondrial**

Os fragmentos amplificados para a região 16S foram digeridos com a enzima de restrição *VspI* em 10 µL de reação contendo 1 µL de produto de PCR, 1 µL de tampão 10X e 1 U da enzima (GE Healthcare). Os padrões de digestão foram visualizados em géis de poli-acrilamida 12% corados com prata.

Para obtenção dos padrões de restrição esperados para a região *cytb* a partir das seqüências obtidas, estas foram submetidas à restrição com *VspI*, *ApoI*, *SspI* e *TspDTI* utilizando o software BioEdit 7.0.5.3 (HALL, 1999).

### **3.6. Análise alozímica**

Extratos de cabeça de cada indivíduo analisado foram obtidos em solução de 2-mercaptoetanol 0.2% v/v e submetidos à eletroforese horizontal em gel de amido de milho 14% (Penetrose 30™, Corn Brazil S/A). As amostras foram fenotipadas para os polimorfismos de fosfatase ácida (ACP), esterase-1 e esterase-4 (Est-1 e Est-4, respectivamente), isocitrato desidrogenase (ICD), superóxido dismutase (SOD), fumarase (FUM), glucose fosfato isomerase (GPI) e 6-fosfogliconato desidrogenase (6PGD) em tampão tris-citrato, pH 7,5 e para malato desidrogenase citosólica e mitocondrial (MDHcit e MDHmit), fosfoglicomutase (PGM), α-glicerofosfato desidrogenase (αGpdh), β-hidroxi-butarato desidrogenase (βHbdh), hexoquinase (HK) e enzima málica (EM) em tampão tris-citrato, pH 8,0.

Estas enzimas apresentam variantes geneticamente determinadas, constituindo assim marcadores genéticos requeridos para análise de diferenciação inter e intrapopulacional (LÓPEZ-URIBE; DEL LAMA, 2007; SILVA, 2002; TAKAHASHI *et al.*, 2001).



### 3.7. Microssatélites

Foram utilizados os oligos delineados por Souza *et al.* (2007) para nove locos microssatélites de *E. cordata* (locos 17, 18, 30b, 35, 51, 24, 26, 30a e 37).

O protocolo para a reação de amplificação do DNA extraído e as condições de PCR utilizadas foram as descritas por Souza *et al.* (2007), sendo que, para cada um dos indivíduos analisados, foram realizadas reações conjuntas utilizando o MIX 1 (locos 17, 18, 30b, 15 e 51) e o MIX 2 (locos 24, 26, 30a e 37). Após as amplificações ocorridas em termociclador Eppendorf modelo Mastercycler, os produtos de PCR foram diluídos 25 vezes. Em seguida, 2 µL da diluição foram adicionados à mistura de 7,75 µL de Tween 0,1% e 0,25 µL da solução de padrão de tamanho ET 550-R MegaBace. O seqüenciador automático MegaBace 750-GE foi utilizado para as análises de tamanho dos alelos e a leitura dos resultados foi realizada no programa MegaBace Fragment Profiler versão 1.2.

### 3.8. Análise de dados

A partir dos resultados obtidos com os marcadores, foram estimados os seguintes parâmetros genéticos:

- grau de diferenciação interpopulacional ( $F_{st}$ ), utilizando o software Arlequin 3.1 (EXCOFFIER *et al.*, 2005).
- correlação entre as distâncias genética ( $F_{st}$ ) e geográfica (em Km), por meio do teste de Mantel, sugerido por Hutchinson e Templeton (1999), com 100000 permutações, utilizando o software Genepop versão 3.4 (RAYMOND; ROUSSET, 1995).
- distribuição da variação genética por análise molecular de variância (AMOVA), utilizando o software Arlequin 3.1 (EXCOFFIER *et al.*, 2005).
- variabilidade genética de cada população (Número de alelos (A), Diversidade gênica ( $H_d$ ), Coeficiente de Endogamia (Fis), Heterozigozidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) e Equilíbrio de Hardy-Weinberg), utilizando o software Fstat 2.9.3.2. (GOUDET, 1995).
- estruturação populacional, utilizando o software Structure 2.2. (PRITCHARD *et al.*, 2000).
- distribuição dos haplótipos mitocondriais (em rede) pelas áreas amostradas, utilizando o software TCS 1.21 (CLEMENT *et al.*, 2000).

- expansão populacional, por meio do teste de neutralidade segundo Fu (1997), utilizando o software Arlequin 3.1 (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

Os locos foram considerados polimórficos quando a frequência do alelo mais comum foi menor que 95%. Para todos os testes estatísticos, foi considerada uma significância de 5%.

A rede de haplótipos mitocondriais mais parcimoniosa foi obtida considerando: que o haplótipo mais freqüente e de maior distribuição tem maior chance de ter originado outro do que um menos representado; é mais provável gerar outro haplótipo por um evento de transição do que por evento de transversão e o caminho evolutivo que apresenta menor número de passos mutacionais é o mais provável de ter ocorrido.

A estimativa dos parâmetros  $F_{st}$ ,  $A$ ,  $H_d$  e AMOVA, para os locos microsatélites, foi realizada em populações só de fêmeas, só de machos e com ambos os sexos. Para misturar indivíduos haplóides com diplóides, foi considerado que cada dois machos representam um indivíduo diplóide e assim a estrutura genética foi acessada a partir do “pool” de alelos existentes nas populações.

A significância do  $F_{st}$  calculado para cada loco alozímico e microsatélite foi obtida de acordo com Workman e Niswander (1970). A aditividade dos valores de qui-quadrado e grau de liberdade para cada loco foi utilizada para estimar a significância do  $F_{st}$  total.

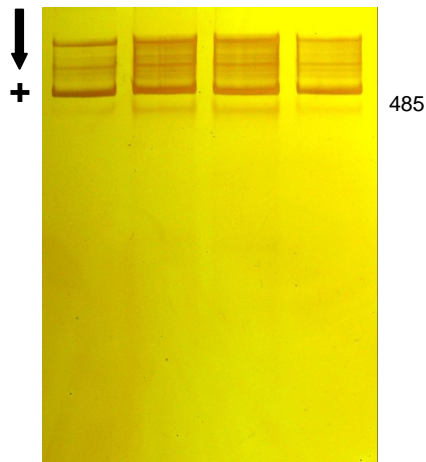
Para utilização do valor de  $K$  que melhor explica a distribuição dos clusters em cada população, no estudo de estruturação pelo software Structure 2.2 (PRITCHARD *et al.*, 2000), foram realizadas 20 repetições para cada  $K$  inferido, com período de burnin de 30000 e 60000 repetições MCMC. A média dessas 20 repetições foi calculada e o  $K$  que apresentou maior valor foi o utilizado, como recomendam os autores do software.

## 4. Resultados

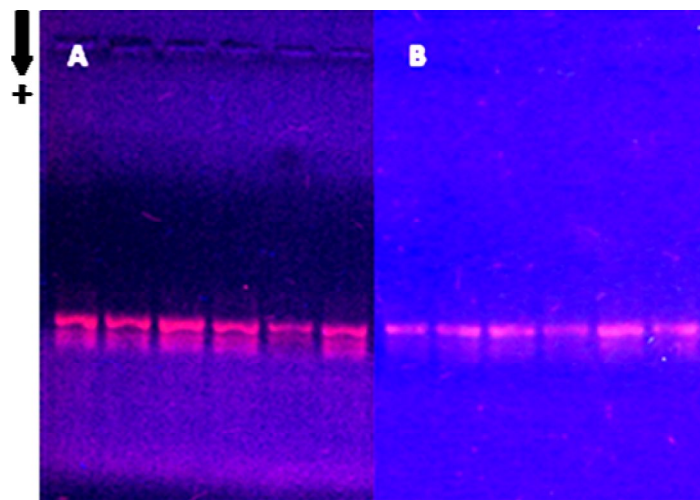
### 4.1. DNA mitocondrial

#### 4.1.1. Seqüenciamento da região *cytb*

A amplificação por PCR da região *cytb*, de 485 pb, foi bem sucedida (Figura 4.1 e Figura 4.2A), assim como o processo de purificação dos fragmentos amplificados (figura 4.2B).



**Figura 4.1:** Gel de poliacrilamida 8% corado com prata demonstrando a região *cytb* de *Euglossa cordata* amplificada por PCR com o primer descrito por Crozier et al. (1991). A figura mostra o fragmento resultante, de cerca de 485 pb, e a seta indica a direção de migração no gel.



**Figura 4.2:** Gel de agarose 1% corado com Gel Red™ e visualizado em luz UV, mostrando os fragmentos de *cytb* antes (A) e depois (B) da purificação. A seta indica a direção de migração no gel.

Foram realizadas, no total, 161 reações de seqüenciamento para este fragmento, sendo que, para a maior parte dos testes, foram utilizados 355 pb recuperados de 141 seqüências obtidas em amostras de Rifaina (n = 13), Pedregulho (12), Franca (11), Ribeirão Preto (14), Jaboticabal (10), Araraquara (13), São Carlos (9), Leme (10), Rio Claro (15), Piracicaba (10), Bertioga (12) e João Pessoa (12).

Um exemplo de seqüência obtida pode ser visto no Apêndice 1 e, em média, as amostras apresentaram uma composição de bases de 37,9% de A, 43,4% de T, 11% de C e 7,7% de G. Oito sítios polimórficos geraram 14 haplótipos diferentes (Tabela 4.1), com média de 3,5 substituições entre eles (2,9 transições e 0,6 transversões).

**Tabela 4.1:** Haplótipos encontrados nas 141 seqüências da região *cytb* de *Euglossa cordata*, com polimorfismo de bases nitrogenadas em oito sítios dos 355 pb recuperados.

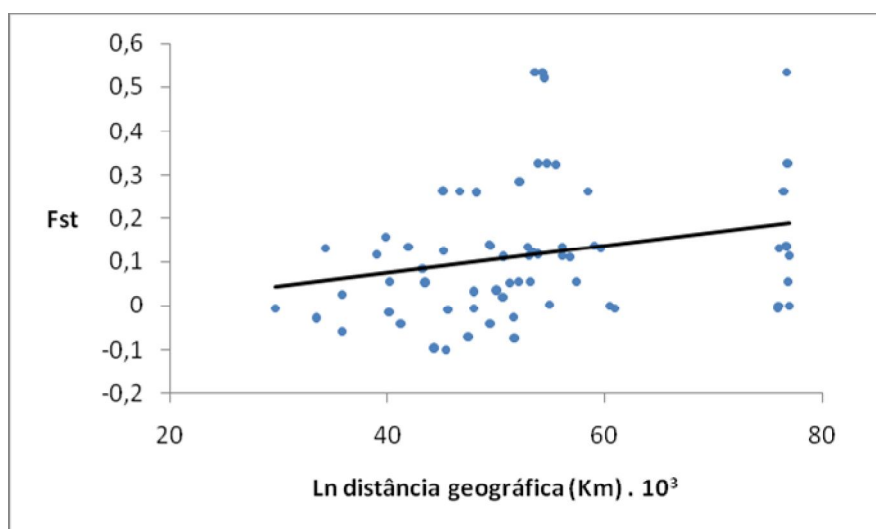
Sítios polimórficos								
Haplótipos	70	101	115	169	295	317	328	416
1	C	A	C	A	T	C	T	A
2	C	G	C	A	T	C	T	A
3	C	G	C	T	T	C	T	A
4	C	G	C	T	T	T	T	A
5	C	G	T	T	T	T	C	A
6	C	G	T	T	T	T	T	A
7	T	A	C	A	T	C	T	A
8	T	A	C	A	T	C	T	G
9	T	A	C	T	T	C	T	A
10	T	G	C	A	C	C	T	A
11	T	G	C	A	T	C	T	A
12	T	G	C	T	T	C	T	A
13	T	G	C	T	T	T	T	A
14	T	G	T	T	T	T	T	A

A diferenciação genética total entre as populações foi estimada pelo parâmetro  $F_{st}$ , sendo de 0,15 ( $P < 0,05$ ). Para examinar como esta variação se distribuía entre populações pareadas, foi estimado o  $F_{st}$  par-a-par (Tabela 4.2).

Para verificar uma possível correlação entre as distâncias genética e geográfica, foi realizado o teste de Mantel plotando os valores de  $F_{st}$  par-a-par e o logaritmo da distância par-a-par, em Km, entre as cidades analisadas (Figura 4.3).

**Tabela 4.2:** Abaixo da diagonal, valores de Fst par-a-par para 355 pb da região *cytb* de amostras de *Euglossa cordata* de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa. Em vermelho, Fst de valor significativo ( $p \leq 0,05$ ). Acima da diagonal, valores da significância de cada Fst calculado (P).

Pop	Rif	Ped	Fra	RP	Jab	Ara	SC	Lem	RC	Pir	Ber	Pb
Rif	*	0,991	0,027	0	0,090	0,522	0,054	0	0	0,036	0,991	0,991
Ped	-0,006	*	0,027	0	0	0,477	0,045	0	0	0,171	0,991	0,991
Fra	0,117	0,131	*	0,108	0,432	0,360	0,279	0,009	0,036	0,486	0,054	0,036
RP	0,261	0,262	0,083	*	0,351	0,198	0,369	0,396	0,640	0,513	0,018	0
Jab	0,112	0,137	0,033	-0,015	*	0,486	0,955	0,090	0,198	0,865	0,027	0,018
Ara	0,056	0,054	0,020	0,053	-0,041	*	0,577	0,018	0,063	0,739	0,504	0,477
SC	0,118	0,133	0,053	-0,009	-0,100	-0,059	*	0,045	0,153	0,838	0,072	0,063
Lem	0,521	0,534	0,285	-0,006	0,140	0,264	0,157	*	0,576	0,081	0	0
RC	0,325	0,328	0,122	-0,041	0,036	0,125	0,056	-0,028	*	0,279	0	0
Pir	0,111	0,113	0,002	-0,027	-0,075	-0,071	-0,096	0,133	0,027	*	0,072	0,108
Ber	-0,006	0	0,132	0,262	0,137	0,054	0,133	0,533	0,328	0,113	*	0,991
Pb	-0,006	0	0,132	0,262	0,137	0,054	0,133	0,533	0,328	0,113	0	*



**Figura 4.3:** Regressão entre os valores de Fst par-a-par (eixo y) para a região *cytb* e o Ln da distância (em  $\text{Km} \cdot 10^3$ ) par-a-par (eixo x) entre as cidades analisadas.

Os valores obtidos no teste demonstraram ausência de correlação entre as variáveis ( $y=3\text{E}-06x-0,0476$ ;  $R^2=0,062$  e  $P=0,022$ ). Retirando da análise a população de João Pessoa ( $y=6\text{E}-06x-0,2086$ ;  $R^2=0,103$  e  $P=0,02$ ), ou as populações de João Pessoa e Bertioga ( $y=8\text{E}-06x-0,2697$ ;  $R^2=0,132$  e  $P=0,024$ ), não houve alteração significativa dos resultados.

A distribuição da variação detectada foi verificada pelo teste de AMOVA, primeiramente considerando apenas dois níveis hierárquicos: inter e intra-populacional (Tabela 4.3).

Ao realizar agrupamentos das populações de acordo com a proximidade geográfica, as amostras seqüenciadas demonstraram variação significativa entre os grupos (Tabela 4.4): Grupo 1 (Rifaina, Pedregulho e Franca), Grupo 2

(Ribeirão Preto e Jaboticabal), Grupo 3 (Araraquara e São Carlos), Grupo 4 (Leme, Rio Claro e Piracicaba), Grupo 5 (Bertioga) e Grupo 6 (João Pessoa).

**Tabela 4.3:** Porcentagem da variação, entre as seqüências de *cytb*, presente nos diferentes níveis hierárquicos (populações e indivíduos), estimada por AMOVA, pelo teste de distância de Kimura (1983). P=significância.

Fonte de Variação	Porcentagem da Variação	P
Entre populações	13,68	0
Dentro de populações	86,32	0

**Tabela 4.4:** Porcentagem da variação, entre as seqüências de *cytb*, presente nos diferentes níveis hierárquicos (grupos, populações e indivíduos), estimada por AMOVA, pelo teste de distância de Kimura (1983), para o primeiro agrupamento. P=significância.

Fonte de Variação	Porcentagem da Variação	P
Entre grupos	12,39	0,042
Entre populações dentro de grupos	2,57	0,325
Dentro de populações	85,05	0

O mesmo teste foi realizado ainda para um segundo agrupamento: Grupo 1 (Rifaina e Pedregulho), Grupo 2 (Franca e Ribeirão Preto), Grupo 3 (Jaboticabal, Araraquara e São Carlos), Grupo 4 (Leme, Rio Claro e Piracicaba), Grupo 5 (Bertioga) e Grupo 6 (João Pessoa). Como se observa na Tabela 4.5, a variação entre grupos passou a ser não significativa ( $P > 0,05$ ), embora não tenha ocorrido uma profunda alteração na forma como a variação se distribuiu nos três níveis hierárquicos.

**Tabela 4.5:** Porcentagem da variação, entre as seqüências de *cytb*, presente nos diferentes níveis hierárquicos (grupos, populações e indivíduos), estimada por AMOVA, pelo teste de distância de Kimura (1983), para o segundo agrupamento. P=significância.

Fonte de Variação	Porcentagem da Variação	P
Entre grupos	11,55	0,063
Entre populações dentro de grupos	3,27	0,317
Dentro de populações	85,18	0

Para verificar se cada um dos grupos constituídos, com base na proximidade das cidades, poderia ser considerado uma população, foi calculado o *Fst*, tanto do primeiro como do segundo tipo de agrupamento, verificando assim a diferenciação genética dentro dos grupos (Tabela 4.6). Esta estimativa não foi efetuada para os Grupos 5 e 6 dos dois agrupamentos, já que ambos são constituídos por apenas 1 cidade.

**Tabela 4.6:** Valores de Fst para cada grupo de cidades considerados no agrupamento 1 e 2 dos teste de AMOVA. Em vermelho, Fst de valor significativo (P<0,05).

Agrupamentos		
Grupos	1	2
1	0.11082	-0.00645
2	-0.01471	0.08342
3	-0.05869	-0.06542
4	0.03581	0.03581

#### 4.1.2. RFLP-PCR

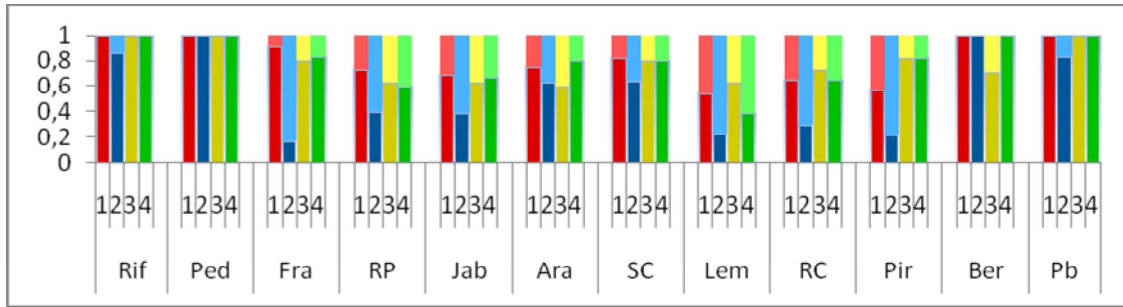
##### 4.1.2.1. Região *cytb*

Por meio da busca por sítios de restrição nas seqüências obtidas, foram analisados padrões para as enzimas *Vspl*, *Apol*, *Sspl* e *Tsp* DTI e suas freqüências podem ser vistas na Tabela 4.7:

**Tabela 4.7:** Freqüência dos haplótipos de *cytb* obtidos após digestão pelas enzimas de restrição *Vspl*, *Apol*, *Sspl* e *Tsp* DTI na região *cytb* em amostras de *Euglossa cordata* coletadas em Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa.

Cidades\haplótipos	<i>Cytb-Vspl</i>		<i>Cytb-Apol</i>		<i>Cytb-Sspl</i>		<i>Cytb-Tsp</i>	
	A	B	C	D	E	F	G	H
Rifaina	1	0	0,857	0,143	1	0	1	0
Pedregulho	1	0	1	0	1	0	1	0
Franca	0,917	0,083	0,167	0,833	0,800	0,200	0,833	0,167
Ribeirão Preto	0,733	0,267	0,400	0,600	0,625	0,375	0,600	0,400
Jaboticabal	0,692	0,308	0,385	0,615	0,625	0,375	0,667	0,333
Araraquara	0,750	0,250	0,625	0,375	0,600	0,400	0,800	0,200
São Carlos	0,818	0,182	0,636	0,364	0,800	0,200	0,800	0,200
Leme	0,538	0,462	0,231	0,769	0,625	0,375	0,385	0,615
Rio Claro	0,647	0,353	0,294	0,706	0,727	0,273	0,647	0,353
Piracicaba	0,571	0,429	0,214	0,786	0,818	0,182	0,818	0,182
Bertioga	1	0	1	0	0,714	0,286	1	0
João Pessoa	1	0	0,833	0,167	1	0	1	0

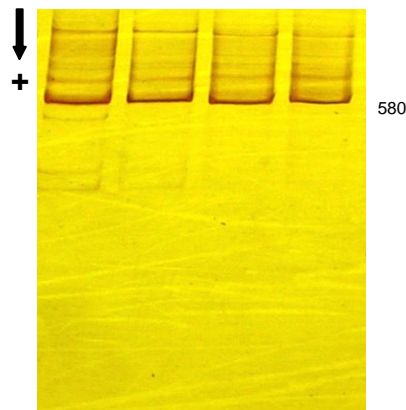
Os gráficos das freqüências dos haplótipos obtidos com o corte de cada enzima (Figura 4.4) demonstram um padrão repetitivo de aumento da variação ao longo do transecto, com a diminuição deste número nas localidades de Bertioga e João Pessoa.



**Figura 4.4:** Frequência dos haplótipos *cytb*-*VspI* (1), *cytb*-*ApoI* (2), *cytb*-*SspI* (3) e *cytb*-*TspDTI* (4) nas cidades de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertiooga e João Pessoa, obtidos após digestão da região *cytb* de *Euglossa cordata* com as enzimas de restrição *VspI*, *ApoI*, *SspI* e *TspDTI*, respectivamente.

#### 4.1.2.2. Região 16S

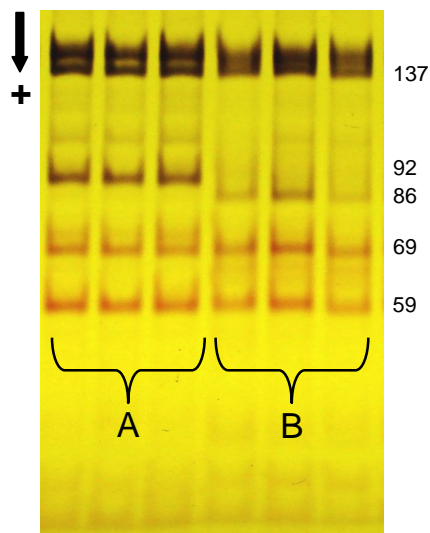
A amplificação por PCR da região 16S, com aproximadamente 580 pb foi bem sucedida e pode ser vista na Figura 4.5.



**Figura 4.5:** Gel de poliacrilamida 8% corado com prata demonstrando a região 16S de *Euglossa cordata* amplificada por PCR com os primers descritos por Downton e Austin (1994) e Cameron et al. (1992). A figura mostra o fragmento resultante, de cerca de 580 pb, e a seta indica a direção de sua migração no gel.

Para amostras de 16 indivíduos de Araraquara (5 machos e 11 fêmeas) e 19 de Leme (13 machos e 6 fêmeas), amplificadas para a região 16S e submetidas à digestão com a enzima *VspI*, foram encontrados os padrões “A” e “B” descritos por López-Uribe e Del Lama (2007) (Figura 4.6), os quais se repetiram também nos indivíduos “controle”, anteriormente fenotipados pelos autores. A frequência destes padrões nas duas cidades analisadas pode ser vista na Tabela 4.8.





**Figura 4.6:** Padrões de restrição por *Vsp I* da região *16S* de *Euglossa cordata* verificados em gel de poliacrilamida 12% corado com prata. A figura mostra os padrões “A” e “B” e o tamanho aproximado dos fragmentos; a seta indica a direção de migração no gel.

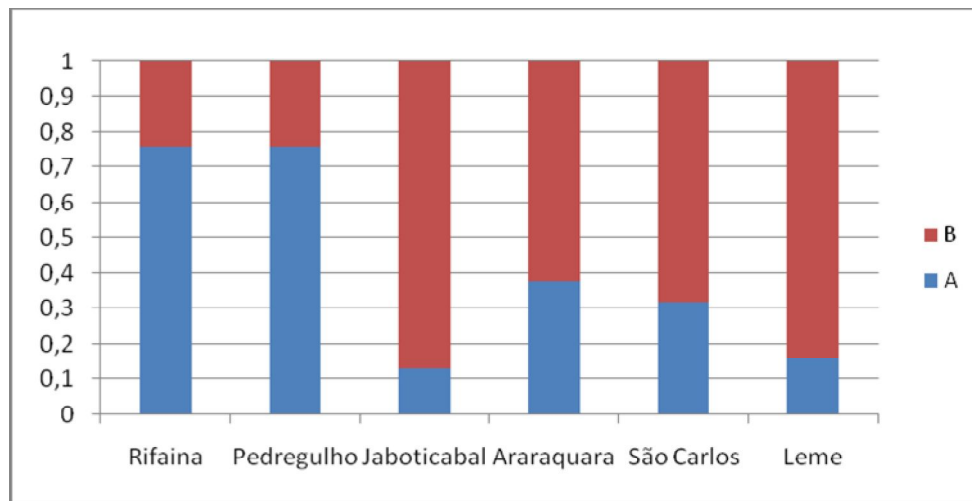
**Tabela 4.8:** Freqüência dos padrões “A” e “B” em amostras de *Euglossa cordata* de Araraquara e Leme, resultantes da digestão da região *16S* pela enzima *Vsp I*.

Haplótipos/Populações	Araraquara	Leme
A	0,071	0,211
B	0,929	0,789

A homogeneidade das freqüências nas populações de Araraquara e Leme para os padrões de digestão da região *16S* com a enzima *Vsp I* foi verificada por meio do parâmetro *Fst*. O valor encontrado, 0,0112 ( $P > 0,05$ ), indica ausência de diferenciação genética. Porém, quando comparamos essas freqüências com os padrões *Vsp I* verificados em outras cidades (Tabela 4.9) por López-Urbe (2006), podemos perceber que há uma tendência no aumento do haplótipo B e diminuição do A ao longo do transecto (Figura 4.7).

**Tabela 4.9:** Freqüência dos haplótipos A e B obtidos por digestão da região *16S* com a enzima *Vsp I* em amostras de Rifaina, Pedregulho, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos e Leme.

Cidades\haplótipos	16S-VspI	
	A	B
Rifaina	0,76	0,24
Pedregulho	0,76	0,24
Jaboticabal	0,13	0,87
Araraquara	0,38	0,62
São Carlos	0,32	0,68
Leme	0,16	0,84



**Figura 4.7:** Frequência dos haplótipos 16S-Vspl A (azul) e 16S-Vspl B (vermelho) nas cidades de Rifaina, Pedregulho, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos e Leme, obtidos com o corte da região 16S de *Euglossa cordata* com a enzima de restrição Vspl.

#### 4.1.3. Análise da estruturação populacional

A primeira análise de estruturação ocorreu com os dados de 14 sítios polimórficos de 161 indivíduos das 12 localidades, sendo que cada sítio foi considerado um “loco”. A Tabela 4.10 mostra as médias de 20 repetições para cada K, dos valores de Ln da probabilidade dos dados (L(K)):

**Tabela 4.10:** Média dos valores de Ln da probabilidade dos dados, para K=1 a 12, para os dados de 14 sítios polimórficos das seqüências da região mitocondrial *cytb*, nas 12 localidades de estudo. Em vermelho, a maior média L(K).

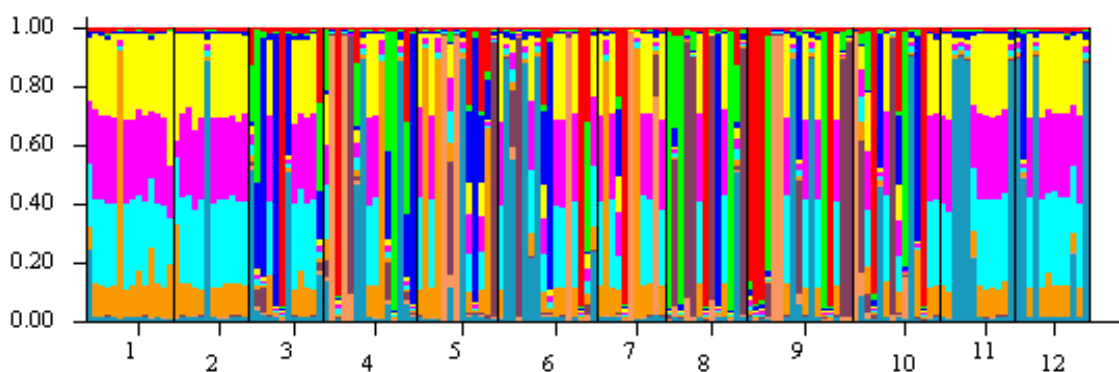
K	Média L(K)
1	-1285,04
2	-734,885
3	-564,84
4	-456,93
5	-446,645
6	-384,06
7	-379,195
8	-349,77
9	-346,62
10	-339,83
11	-406,045
12	-445,825

As frequências de cada cluster nas localidades, para o maior K encontrado (K=10) (Tabela 4.11; Figura 4.8) demonstram padrão semelhante de distribuição nas cidades de Rifaina, Pedregulho, Bertiooga e João Pessoa,

enquanto as localidades situadas na porção mediana do transecto demonstram maior diversidade de padrões.

**Tabela 4.11:** Freqüências dos 10 conjuntos de dados (clusters) considerados em cada uma das cidades amostradas, Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa (N=número de indivíduos).

Pop (N)	Clusters									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Rif (14)	0,009	0,004	0,009	0,262	0,256	0,246	0,178	0,003	0,002	0,031
Ped (12)	0,008	0,004	0,009	0,267	0,242	0,262	0,114	0,003	0,002	0,089
Fra (12)	0,119	0,091	0,225	0,120	0,126	0,127	0,055	0,018	0,005	0,113
Rib (15)	0,095	0,144	0,105	0,060	0,061	0,062	0,084	0,077	0,140	0,172
Jab (13)	0,058	0,012	0,122	0,073	0,083	0,082	0,220	0,106	0,156	0,089
Ara (16)	0,102	0,034	0,080	0,117	0,122	0,117	0,046	0,077	0,068	0,238
SC (11)	0,112	0,008	0,029	0,142	0,154	0,148	0,217	0,017	0,158	0,014
Lem (13)	0,091	0,267	0,085	0,048	0,053	0,052	0,022	0,317	0,018	0,049
RC (17)	0,223	0,114	0,035	0,074	0,071	0,076	0,029	0,140	0,120	0,117
Pir (14)	0,159	0,081	0,108	0,089	0,097	0,096	0,058	0,108	0,091	0,112
Ber (12)	0,007	0,005	0,014	0,185	0,196	0,194	0,069	0,003	0,002	0,325
JP (12)	0,008	0,005	0,048	0,183	0,187	0,199	0,072	0,003	0,002	0,293



**Figura 4.8:** Distribuição dos 10 conjuntos de dados (clusters) nas cidades de Rifaina (1), Pedregulho (2), Franca (3), Ribeirão Preto (4), Jaboticabal (5), Araraquara (6), São Carlos (7), Leme (8), Rio Claro (9), Piracicaba (10), Bertioga (11) e João Pessoa (12), analisadas considerando K=10.

Numa segunda análise, foram considerados 8 sítios polimórficos, sem “missing data” (bases tipadas como “N”), para 142 indivíduos das 12 localidades. A partir destes sítios, foi gerado o haplótipo de cada indivíduo e a média de L(K) foi calculada (Tabela 4.12), sendo K=11 o que melhor explica a distribuição dos dados.

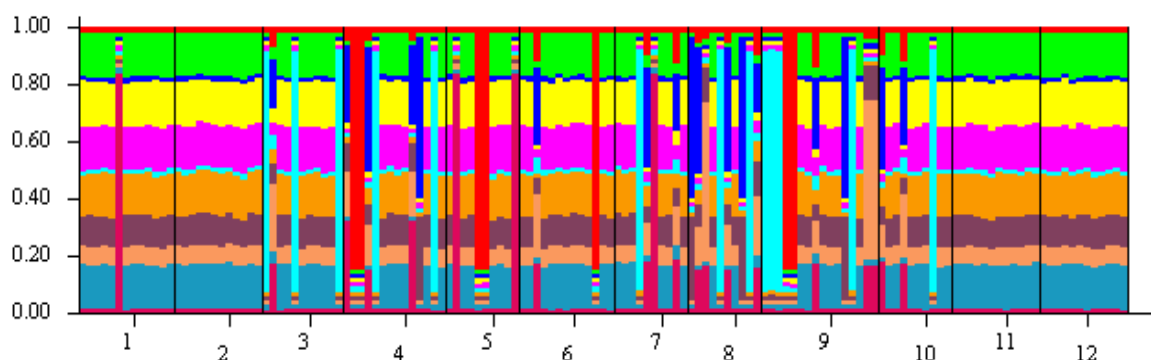
Apesar do padrão mais “limpo” do que aquele obtido na análise anterior, novamente ficou evidente o padrão similar das localidades “1”, “2”, “11” e “12” e a maior variação na porção mediana do transecto, o que pode ser constatado pela freqüência dos clusters em cada localidade (Tabela 4.13; Figura 4.9), para K=11.

**Tabela 4.12:** Média dos valores de Ln da probabilidade dos dados, para K=1 a 12, para os dados de haplótipos das seqüências da região mitocondrial *cytb*, nas 12 localidades de estudo. Em vermelho, a maior média L(K).

K	Média L(K)
1	-381,31
2	-244,1
3	-288,64
4	-201,665
5	-224,475
6	-175,295
7	-184,375
8	-163,855
9	-161,61
10	-166,65
11	-153,585
12	-162,27

**Tabela 4.13:** Freqüências dos 11 conjuntos de dados (clusters) considerados em cada uma das cidades amostradas, Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa (N=número de indivíduos).

Pop (N)	Clusters										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Rif (13)	0,064	0,144	0,145	0,120	0,015	0,032	0,130	0,143	0,047	0,015	0,144
Ped (12)	0,017	0,154	0,154	0,131	0,015	0,016	0,142	0,153	0,048	0,016	0,155
Fra (11)	0,034	0,109	0,107	0,091	0,244	0,030	0,098	0,107	0,052	0,023	0,107
Rib (14)	0,080	0,074	0,076	0,084	0,136	0,118	0,071	0,076	0,066	0,145	0,077
Jab (10)	0,139	0,099	0,098	0,085	0,016	0,059	0,090	0,100	0,035	0,181	0,098
Ara (13)	0,048	0,131	0,137	0,113	0,018	0,021	0,125	0,135	0,060	0,080	0,133
SC (10)	0,115	0,101	0,102	0,094	0,103	0,064	0,101	0,105	0,080	0,034	0,102
Lem (10)	0,103	0,047	0,046	0,081	0,186	0,210	0,050	0,045	0,143	0,045	0,043
RC (15)	0,045	0,070	0,069	0,078	0,223	0,090	0,069	0,069	0,086	0,130	0,070
Pir (10)	0,084	0,115	0,114	0,097	0,101	0,036	0,118	0,116	0,084	0,023	0,113
Ber (12)	0,017	0,156	0,155	0,128	0,015	0,016	0,140	0,154	0,049	0,016	0,156
JP (12)	0,016	0,155	0,154	0,126	0,015	0,016	0,141	0,154	0,048	0,016	0,158

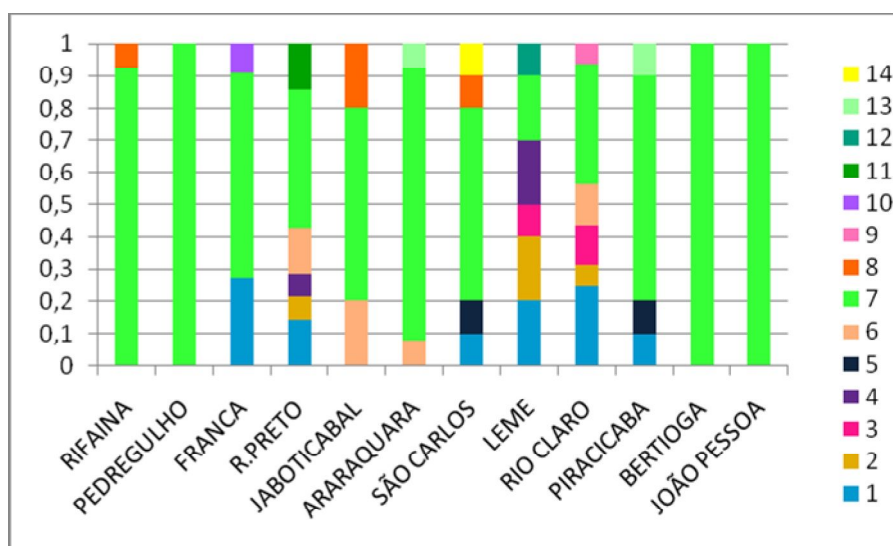


**Figura 4.9:** Distribuição dos 11 conjuntos de dados (clusters) nas cidades de Rifaina (1), Pedregulho (2), Franca (3), Ribeirão Preto (4), Jaboticabal (5), Araraquara (6), São Carlos (7), Leme (8), Rio Claro (9), Piracicaba (10), Bertioga (11) e João Pessoa (12), analisadas considerando K=11.

Os dados de freqüência dos diferentes haplótipos em cada população (Tabela 4.14) revelam uma distribuição similar destes à obtida anteriormente com os padrões de restrição (Figura 4.10).

**Tabela 4.14:** Frequência dos haplótipos 1-14, resultantes da combinação de oito sítios polimórficos da região *cytb* em amostras de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertiooga e João Pessoa.

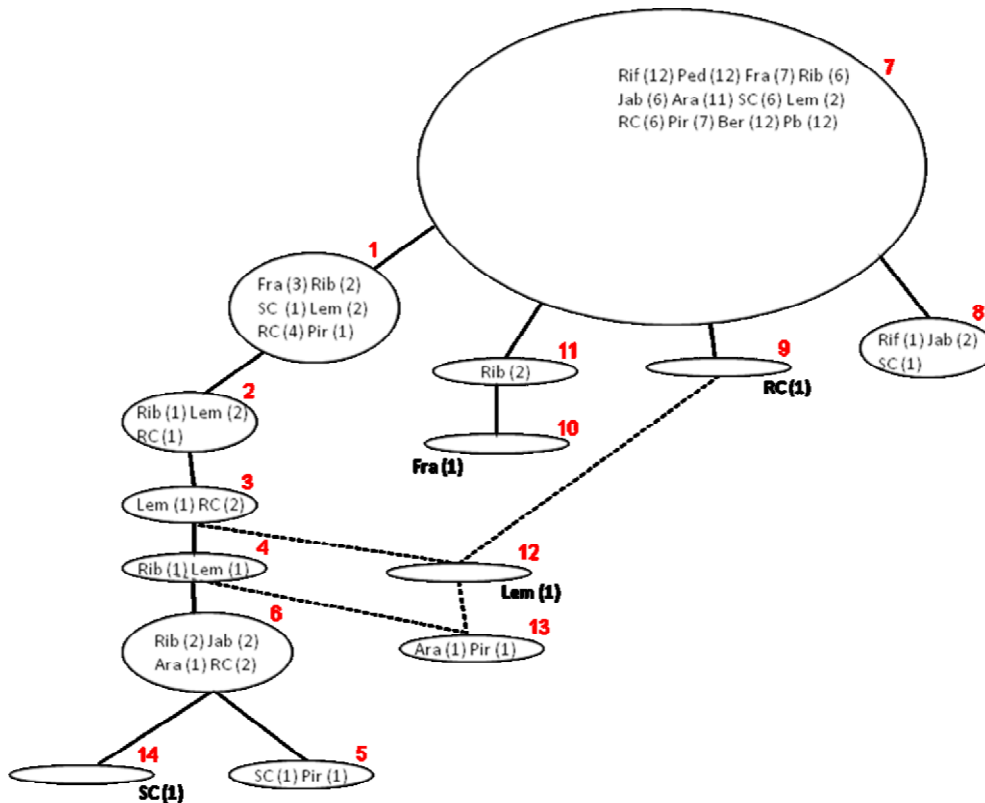
Haplótipos	Cidades											
	Rif	Ped	Fra	RP	Jab	Ara	SC	Lem	RC	Pir	Ber	JP
1	0	0	0,273	0,143	0	0	0,1	0,2	0,25	0,1	0	0
2	0	0	0	0,071	0	0	0	0,2	0,063	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,125	0	0	0
4	0	0	0	0,071	0	0	0	0,2	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0,1	0	0
6	0	0	0	0,143	0,2	0,077	0	0	0,125	0	0	0
7	0,923	1	0,636	0,429	0,6	0,846	0,6	0,2	0,375	0,7	1	1
8	0,077	0	0	0	0,2	0	0,1	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0,063	0	0	0
10	0	0	0,091	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0,143	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0,077	0	0	0	0,1	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0



**Figura 4.10:** Frequência dos haplótipos 1-14, resultantes da combinação de oito sítios polimórficos da região *cytb* em amostras de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertiooga e João Pessoa.

#### 4.1.4. Rede de haplótipos

Com os dados de 8 sítios polimórficos de 142 seqüências das 12 localidades, foi investigada a distribuição em rede dos 14 haplótipos identificados, a fim de verificar as relações entre eles e uma possível da associação com sua origem (procedência da amostra) (Figura 4.11).



**Figura 4.11:** Rede de haplótipos gerada com dados de 142 seqüências da região *cytb* das cidades de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa. Em vermelho, o número do haplótipo que representa cada circunferência. As linhas pontilhadas indicam regiões onde mais de um passo mutacional pode ter originado o mesmo haplótipo.

Para verificar ocorrência de expansão populacional, foi realizado um teste de neutralidade calculando-se o valor do parâmetro  $F_s$  segundo Fu (1997) (Tabela 4.15).

**Tabela 4.15:** Parâmetros resultantes do teste de neutralidade de Fu (1997).  $N_o$ =número de alelos observados;  $N_e$ =número de alelos esperados;  $F_s$ =índice de expansão/retração populacional;  $P=0,024$  (expansão significativa).

<b><math>N_o</math></b>	14
<b><math>N_e</math></b>	6,92
<b><math>F_s</math></b>	-5,57

O teste de neutralidade resultou em um  $F_s$  negativo, o que demonstra a ocorrência de excesso de alelos, já que houve expansão populacional significativa ( $P<0,05$ ).

## 4.2. DNA nuclear

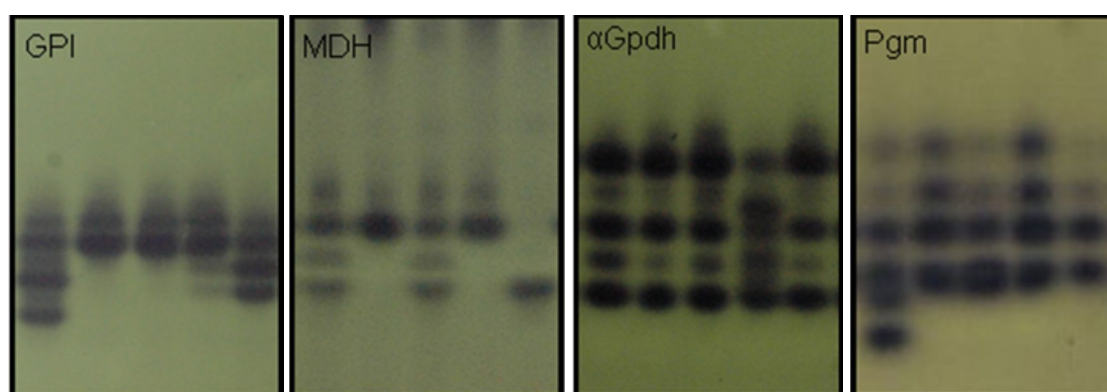
### 4.2.1. Análise alozímica

Para verificação da espécie dos indivíduos estudados, foi analisado o padrão de cada um deles para os locos diagnósticos (Tabela 4.16) descritos por López-Uribe e Del Lama (2007), que permitem a distinção entre *E. cordata*, *Euglossa securigera* e *Euglossa townsendi*, espécies encontradas em flores de *T. peruviana* nas áreas urbanas.

**Tabela 4.16:** Alelos “diagnósticos”, dos locos esterase-3 (EST-3), malato desidrogenase (MDH) e enzima málica (ME), utilizados para a identificação da espécie *Euglossa cordata*.

Loco	Alelos
EST-3	100
MDH	92/100
ME	100

Foram analisados 33 indivíduos de Franca, 64 de Ribeirão Preto, 35 de Jaboticabal, 64 de Araraquara, 39 de Leme, 67 de Rio Claro, 67 de Piracicaba, 43 de Bertiooga e 15 de João Pessoa. Dos 15 locos, *Est-1*, *Est-4*, *GPI* (Figura 4.12), *MDH* (Figura 4.12), *ACP*,  $\alpha$ *Gpdh* (Figura 4.12),  $\beta$ *Hbdh*, *PGM* (Figura 4.12), *ICD* e *SOD* apresentaram variação e as frequências alélicas obtidas podem ser vistas no Apêndice 1.



**Figura 4.12:** Gel de amido 14% mostrando polimorfismo em *Euglossa cordata* para os sistemas de glicose fosfato desidrogenase (GPI) (92/100; 100/100; 100/100; 100/100; 96/100), malato desidrogenase (MDH) (92/100; 100/100; 92/100; 100/100; 92/92),  $\alpha$ -glicerofosfato desidrogenase ( $\alpha$ Gpdh) (100/100; 100/100; 100/100; 96/100; 100/100) e fosfoglicomutase (Pgm) (96/100; 100/100; 100/100; 100/100; 100/100).

Dos 10 locos que apresentaram alguma variação, somente *Est-1* e *MDH* podem ser considerados polimórficos, o que representa 13,3% do total de locos sob análise. Vale ressaltar que o loco SOD apresentou-se polimórfico em João Pessoa, apesar de monomórfico nas cidades do estado de São Paulo.

Para as populações de fêmeas foram estimados diversos parâmetros (Tabela 4.17): Diversidade gênica, Coeficiente de Endogamia, Heterozigozidade (observada e esperada) e Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

**Tabela 4.17:** Parâmetros estimados para as populações de fêmeas de *Euglossa cordata* das cidades de Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, Leme, Rio Claro e Piracicaba. A=número de alelos; N=número de indivíduos analisados; Hd=diversidade gênica; Fis=coeficiente de endogamia; Ho=heterozigozidade observada; He=heterozigozidade esperada. Em vermelho, populações que não se encontram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; em verde, populações com coeficiente de endogamia significativo.

Populações								
loco		Fra	RP	Jab	Ara	Lem	RC	Pir
<b>Est-1</b>	<b>A</b>	1	2	1	3	3	3	2
	<b>N</b>	32	55	24	59	37	60	37
	<b>Hd</b>	0	0,036	0	0,143	0,13	0,255	0,079
	<b>Fis</b>	----	-0,009	----	-0,065	0,376	0,673	-0,029
	<b>Ho</b>	0	0,036	0	0,153	0,081	0,083	0,081
	<b>He</b>	0	0,036	0	0,143	0,129	0,254	0,078
<b>Est-4</b>	<b>A</b>	1	1	1	----	----	1	2
	<b>N</b>	31	55	24	0	0	8	37
	<b>Hd</b>	0	0	0	----	----	0	0,054
	<b>Fis</b>	----	----	----	----	----	----	1,000
	<b>Ho</b>	0	0	0	----	----	0	0
	<b>He</b>	0	0	0	----	----	0	0,053
<b>GPI</b>	<b>A</b>	2	3	3	2	3	2	3
	<b>N</b>	32	55	24	28	37	60	37
	<b>Hd</b>	0,091	0,139	0,160	0,070	0,080	0,065	0,080
	<b>Fis</b>	-0,033	0,215	0,480	-0,019	-0,019	-0,026	-0,019
	<b>Ho</b>	0,094	0,11	0,083	0,071	0,081	0,067	0,081
	<b>He</b>	0,09	0,139	0,159	0,07	0,08	0,064	0,079
<b>MDH</b>	<b>A</b>	2	2	2	2	2	2	2
	<b>N</b>	32	55	24	59	37	60	37
	<b>Hd</b>	0,347	0,263	0,283	0,211	0,294	0,245	0,414
	<b>Fis</b>	-0,081	-0,174	-0,179	0,198	-0,013	-0,157	0,281
	<b>Ho</b>	0,375	0,31	0,333	0,169	0,297	0,283	0,297
	<b>He</b>	0,347	0,264	0,284	0,211	0,293	0,245	0,412
<b>ACP</b>	<b>A</b>	1	1	1	2	1	2	2
	<b>N</b>		55	24	59	37	60	36
	<b>Hd</b>	0	0	0	0,017	0	0,017	0,028
	<b>Fis</b>	----	----	----	0	----	0	0
	<b>Ho</b>	0	0	0	0,017	0	0,016	0,028
	<b>He</b>	0	0	0	0,017	0	0,016	0,028

A estimativa da diversidade genética entre todas as populações, calculada pelo  $F_{st}$ , foi de 0,01 e o teste de qui-quadrado mostrou-se significativo apenas para o loco Est-1 (Tabela 4.18). O  $F_{st}$  par-a-par pode ser visto na Tabela 4.19.



**Tabela 4.18:** Significância do cálculo de qui-quadrado para o Fst de cada loco alozímico e do valor média. Em vermelho, Fst de valor significativo (P<0,05).

Loco	Fst	X <sup>2</sup>	GL
Est-1	0,031	37,696	12
Est-4	0,007	2,17	6
GPI	0,007	7,644	12
MDH	0,01	6,08	6
ACP	0,222	2,416	6
Média	0,038	56,006	42

**Tabela 4.19:** Abaixo da diagonal, valores de Fst par-a-par para os locos alozímicos em Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, Leme, Rio Claro e Piracicaba. Em vermelho, Fst de valor significativo (P<0,05). Acima da diagonal, valores da significância de cada Fst calculado (P).

Pop	Fra	RP	Jab	Ara	Lem	RC	Pir
Fra	*	0,18	0,613	0,036	0,34234	0,018	0,41
RP	0,002	*	0,865	0,243	0,523	0,018	0,06
Jab	-0,01	-0,014	*	0,234	0,658	0,099	0,14
Ara	0,028	0,004	0,007	*	0,459	0,216	0,01
Lem	0	-0,004	-0,007	-0,002	*	0,342	0,225
RC	0,034	0,023	0,022	0,008	0,005	*	0,009
Pir	-0,004	0,03	0,016	0,05	0,01	0,043	*

#### 4.2.2. Análise de microssatélites

Foram analisados 9 locos microssatélites (17, 18, 30b, 35, 51, 24, 26, 30a e 37) de 754 indivíduos coletados em Rifaina (94), Pedregulho (28), Franca (33), Ribeirão Preto (64), Jaboticabal (53), Araraquara (65), São Carlos (126), Leme (64), Rio Claro (67), Piracicaba (68), Bertiooga (43) e João Pessoa (49). As amostras foram fenotipadas e as frequências alélicas estimadas são apresentadas no Apêndice 2.

Em relação à variabilidade genética das populações analisadas, todos os locos apresentaram-se polimórficos, com um número médio de alelos por loco de 16,56. A proporção do total de alelos que está presente em cada população pode ser vista na Tabela 4.20.

**Tabela 4.20:** Proporção do total de alelos dos locos microssatélites de *Euglossa cordata* presente nas amostras de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertiooga e João Pessoa.

Pop	Rif	Ped	Fra	RP	Jab	Ara	SC	Lem	RC	Pir	Ber	Pb
p. alélica	0,77	0,54	0,55	0,63	0,62	0,68	0,67	0,65	0,68	0,63	0,62	0,65

Para as populações de fêmeas foram estimados o Coeficiente de Endogamia e as Heterozigosidades observada e esperada, assim como o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para as populações completas, incluindo os

machos, foram calculadas o Número de Alelos e a Diversidade gênica (Tabela 4.21).

**Tabela 4.21:** Estimativas dos parâmetros Fis (coeficiente de endogamia), Ho (heterozigidade observada) e He (heterozigidade esperada) nas populações de fêmeas e dos parâmetros A (número de alelos) e Hd (diversidade gênica) nas populações de machos e fêmeas de *Euglossa cordata* de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertiooga e João Pessoa. N=número de indivíduos (fêmeas + machos). Em vermelho, populações que não se encontram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; em verde, populações com coeficiente de endogamia significativo.

		Populações											
Locos		Rif	Ped	Fra	RP	Jab	Ara	SC	Lem	RC	Pir	Ber	Pb
17	A	12	11	11	12	11	14	11	14	13	12	10	9
	N	92+0	28+0	32+1	53+7	38+10	60+4	116+3	44+18	60+7	36+26	0+42	0+46
	Hd	0,876	0,870	0,873	0,873	0,884	0,862	0,857	0,865	0,842	0,865	0,885	0,871
	Fis	-0,030	0,138	-0,001	-0,001	0,013	0,033	0,003	0,031	0,009	0,110	----	----
	Ho	0,902	0,75	0,875	0,868	0,868	0,833	0,853	0,841	0,833	0,778	----	----
	He	0,876	0,868	0,875	0,867	0,879	0,862	0,856	0,868	0,841	0,873	----	----
18	A	13	13	13	13	13	13	13	12	13	12	8	9
	N	93+0	28+0	31+1	51+8	42+11	56+4	122+3	44+18	57+6	34+28	0+42	0+48
	Hd	0,871	0,898	0,922	0,894	0,876	0,876	0,888	0,878	0,880	0,902	0,783	0,841
	Fis	0,013	-0,034	-0,017	-0,034	-0,057	-0,098	-0,017	-0,006	-0,053	-0,110	----	----
	Ho	0,86	0,929	0,935	0,922	0,929	0,964	0,902	0,886	0,93	1	----	----
	He	0,871	0,899	0,92	0,892	0,879	0,879	0,887	0,881	0,883	0,902	----	----
30b	A	18+0	11+0	11	14	17	17	19	20	14	13	13	12
	N	88	27	31+1	51+8	39+10	55+4	108+3	39+18	56+5	36+25	0+34	0+37
	Hd	0,846	0,771	0,803	0,892	0,862	0,851	0,849	0,875	0,855	0,828	0,914	0,911
	Fis	0,073	-0,009	-0,013	-0,002	0,084	0,080	0,075	0,058	0,127	0,054	----	----
	Ho	0,784	0,778	0,806	0,902	0,795	0,782	0,787	0,821	0,75	0,806	----	----
	He	0,846	0,771	0,796	0,9	0,867	0,849	0,85	0,87	0,858	0,851	----	----
35	A	5	4	5	6	4	7	6	6	6	7	5	4
	N	93+0	28+0	31+1	55+9	42+11	60+3	121+3	46+18	60+7	37+29	0+42	0+48
	Hd	0,522	0,565	0,525	0,530	0,517	0,525	0,513	0,535	0,548	0,606	0,554	0,609
	Fis	0,217	0,116	0,216	-0,041	0,220	-0,062	-0,033	-0,064	0,053	-0,030	----	----
	Ho	0,41	0,5	0,419	0,545	0,405	0,533	0,529	0,587	0,5	0,595	----	----
	He	0,521	0,564	0,533	0,524	0,518	0,502	0,512	0,552	0,528	0,578	----	----
51	A	8	6	4	6	5	5	6	5	7	6	3	4
	N	93+0	28+0	32+1	54+7	42+11	60+4	119+3	46+18	60+7	36+26	0+43	0+48
	Hd	0,487	0,523	0,467	0,612	0,471	0,558	0,513	0,415	0,534	0,503	0,450	0,523
	Fis	0,072	0,113	0,081	-0,113	-0,155	0,044	0,043	0,048	0,072	0,113	----	----
	Ho	0,452	0,464	0,438	0,685	0,548	0,533	0,496	0,391	0,583	0,389	----	----
	He	0,487	0,522	0,476	0,616	0,475	0,558	0,518	0,411	0,518	0,513	----	----
24	A	17	11	9	13	11	13	13	12	10	15	6	7
	N	92+0	28+0	32+1	52+8	41+11	59+5	114+1	45+18	60+7	34+26	0+43	0+48
	Hd	0,806	0,806	0,765	0,796	0,786	0,778	0,792	0,797	0,848	0,843	0,793	0,650
	Fis	0,151	0,069	0,214	0,070	0,073	0,257	0,103	0,080	0,188	0,105	----	----
	Ho	0,685	0,75	0,594	0,75	0,732	0,576	0,711	0,733	0,683	0,765	----	----
	He	0,81	0,805	0,752	0,81	0,788	0,774	0,792	0,796	0,84	0,853	----	----
26	A	12	8	12	13	11	10	11	12	12	15	7	10
	N	93+0	28+0	32+1	52+9	41+10	59+5	104+1	45+18	59+7	35+29	0+43	0+49
	Hd	0,804	0,795	0,869	0,864	0,826	0,835	0,827	0,849	0,832	0,885	0,803	0,840
	Fis	-0,004	0,057	0,108	0,044	0,117	0,229	0,025	0,001	0,101	0,008	----	----
	Ho	0,81	0,75	0,781	0,827	0,732	0,644	0,808	0,844	0,746	0,886	----	----
	He	0,804	0,794	0,874	0,864	0,827	0,833	0,828	0,845	0,829	0,893	----	----
30a	A	10	6	6	8	8	9	7	8	9	10	7	4
	N	89+0	27+0	31+1	50+9	42+11	60+5	75+1	46+18	60+7	35+28	0+42	0+48
	Hd	0,699	0,617	0,745	0,762	0,762	0,793	0,729	0,744	0,771	0,735	0,682	0,332
	Fis	-0,028	0,039	0,211	0,373	0,289	0,264	0,076	0,169	0,305	0,168	----	----
	Ho	0,719	0,593	0,581	0,48	0,548	0,583	0,667	0,63	0,533	0,629	----	----
	He	0,699	0,616	0,733	0,762	0,767	0,791	0,721	0,757	0,765	0,753	----	----
37	A	20	11	11	11	14	14	14	12	19	9	9	12
	N	92+0	28+0	32+1	52+9	42+11	60+5	110+1	46+18	60+7	35+27	0+41	0+41
	Hd	0,891	0,782	0,830	0,814	0,838	0,821	0,824	0,833	0,819	0,817	0,827	0,876
	Fis	0,183	-0,050	0,277	0,119	0,144	0,166	0,206	0,157	0,191	0,098	----	----
	Ho	0,728	0,821	0,594	0,712	0,714	0,683	0,655	0,696	0,65	0,714	----	----
	He	0,89	0,783	0,818	0,806	0,833	0,818	0,824	0,823	0,802	0,79	----	----

A diferenciação populacional total, calculada pelo parâmetro Fst, foi de 0,008, valor não significativo ( $P > 0,05$ ) de acordo com o teste de qui-quadrado (Tabela 4.22) e o Fst par-a-par pode ser visto na Tabela 4.23.

**Tabela 4.22:** Significância do cálculo de qui-quadrado para o Fst de cada loco microsatélite e do valor médio. Em vermelho, Fst de valor significativo ( $P < 0,05$ ).

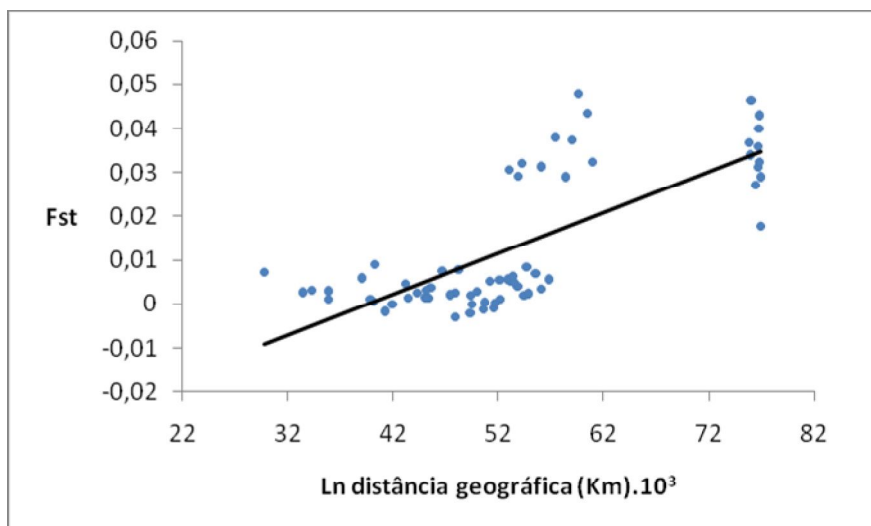
Loco	Fst	X <sup>2</sup>	GL
17	0,003	61,632	176
18	0,008	145,824	154
30b	0,011	318,384	264
35	0,003	35,64	99
51	0,002	18,312	77
24	0,004	97,584	209
26	0,004	76,08	165
30a	0,026	435,344	154
37	0,011	351,45	275
Média	0,008	1540,25	1573

**Tabela 4.23:** Abaixo da diagonal, valores de Fst par-a-par para os locos microsatélites em Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa. Em vermelho, Fst de valor significativo ( $P < 0,05$ ). Acima da diagonal, valores da significância de cada Fst calculado (P).

pop	Rif	Ped	Fra	RP	Jab	Ara	SC	Lem	RC	Pir	Ber	Pb
Rif	*	0,036	0	0,036	0,306	0,063	0,18	0,099	0,009	0	0	0,072
Ped	0,009	*	0,622	0,252	0,748	0,667	0,153	0,054	0,045	0,108	0	0,054
Fra	0,008	0	*	0,514	0,793	0,586	0,315	0,468	0,135	0,432	0	0,09
RP	0,005	0,003	0	*	0,694	0,667	0,432	0,108	0,099	0,82	0	0,018
Jab	0,001	-0,002	-0,002	-0,002	*	0,874	0,622	0,811	0,261	0,288	0	0,045
Ara	0,005	0	0	-0,001	-0,002	*	0,703	0,261	0,189	0,604	0	0,018
SC	0,001	0,003	0,001	0	0	0	*	0,703	0,009	0,36	0	0
Lem	0,003	0,005	0	0,003	-0,002	0,002	-0,001	*	0,036	0,324	0	0,036
RC	0,005	0,007	0,005	0,003	0,002	0,002	0,005	0,005	*	0,297	0	0,009
Pir	0,005	0,005	0	-0,002	0	0	0,001	0,002	0	*	0	0
Ber	0,019	0,031	0,033	0,03	0,03	0,027	0,023	0,03	0,026	0,025	*	0,027
Pb	0,009	0,008	0,008	0,013	0,009	0,009	0,018	0,011	0,011	0,012	0,013	*

Para verificar se há correlação entre as distâncias genética e geográfica, foi realizado o teste de Mantel plotando os valores de Fst par-a-par e o logaritmo da distância par-a-par, em Km, entre as cidades analisadas (Figura 4.13).

Os valores obtidos no teste demonstraram ausência de correlação entre as variáveis ( $y = 9E-07x - 0,0366$ ;  $R^2 = 0,545$ ;  $P = 0,001$ ).



**Figura 4.13:** Regressão entre os valores de Fst par-a-par (eixo y) para os locos microssatélites e o Ln da distância (em Km\*10<sup>3</sup>) par-a-par (eixo x) entre as cidades analisadas.

Apesar da variação mais restrita detectada para esse tipo de marcador, foi realizado o teste de AMOVA, primeiramente considerando apenas dois níveis hierárquicos, entre populações e dentro das populações (Tabela 4.24).

**Tabela 4.24:** Porcentagem da variação dos locos microssatélites presente nos diferentes níveis hierárquicos (populações e indivíduos), estimada por AMOVA, pelo teste de distância de Kimura (1983). P=significância.

Fonte de Variação	Porcentagem da Variação	P
Entre as populações	0,44	0
Dentro das Populações	99,56	0

A variação mínima encontrada entre as populações, para dois níveis hierárquicos, se dividiu entre populações e grupos (Tabela 4.25), quando foi realizado o mesmo agrupamento do primeiro teste com os dados mitocondriais: Grupo 1 (Rifaina, Pedregulho e Franca), Grupo 2 (Ribeirão Preto e Jaboticabal), Grupo 3 (Araraquara e São Carlos), Grupo 4 (Leme, Rio Claro e Piracicaba), Grupo 5 (Bertioga) e Grupo 6 (João Pessoa).

**Tabela 4.25:** Porcentagem da variação dos locos microssatélites presente nos diferentes níveis hierárquicos (grupos, populações e indivíduos), estimada por AMOVA, pelo teste de distância de Kimura (1983). P=significância.

Fonte de Variação	Porcentagem da Variação	P
Entre os Grupos	0,21	0,07
Entre as Populações dentro dos Grupos	0,25	0,038
Dentro das Populações	99,53	0

### 4.2.3. Análise da estruturação populacional

O cálculo da média de  $L(K)$  para os locos alozímicos e microssatélite pode ser visto na Tabela 4.26.

**Tabela 4.26:** Média dos valores de  $\ln$  da probabilidade dos dados, para locos alozímicos (A:  $K=1$  a 9) e locos microssatélites (B:  $K=1$  a 12) em, respectivamente, 9 e 12 localidades de estudo. Em vermelho, a maior média  $L(K)$ .

K	Média L(K) A	Média L(K) B
1	-913,64	-21593,5
2	-1050,595	-21803,1
3	-961,995	-22307,8
4	-1008,045	-22256,7
5	-956,315	-22305,9
6	-971,805	-22432,6
7	-1030,82	-22801,1
8	-1154,69	-22961,4
9	-943,04	-23136,3
10	----	-23599,1
11	----	-23921,1
12	----	-23685,6

O valor de  $K$  que melhor explica a freqüência dos clusters distribuídos nas localidades é um, o que demonstra falta de estruturação das populações para os locos nucleares.

### 4.2.4. Análise de macho diplóide

Foram analisados 123 machos para os locos alozímicos e 54 machos adicionais para microssatélites. Deste total de 177 indivíduos analisados, foi detectado apenas um macho diplóide, proveniente de Rifaina, que apresentou 7 locos microssatélites em heterozigose para um total de 9 locos analisados. Nenhum macho apresentou heterozigose para os locos alozímicos.

## 5. Discussão

### 5.1. DNA mitocondrial

Foram realizadas, no total, 161 reações de seqüenciamento para a região *cytb*, sendo que 20 seqüências foram descartadas da maioria das análises por conter um número grande de bases “incertas”, tipadas como “N”. Além disso, de todas as amostras, parte dos 125 (aproximadamente) nucleotídeos não recuperados são provenientes de sítios polimórficos problemáticos, onde foram encontradas bases diferentes na seqüência “forward” e “reverse” de amostras dos mesmos indivíduos. Estas incertezas se mantiveram nas seqüências obtidas em dois seqüenciadores distintos, observando-se repetibilidade dos dados nos indivíduos reanalisados, o que indica que tais resultados merecem estudos adicionais para que possam ser explicados satisfatoriamente.

A diferenciação genética obtida com os dados de 141 seqüências do gene *cytb* provenientes das 12 populações analisadas foi significativa, o que indica possibilidade de estruturação populacional. Considerando o  $F_{st}$  par-a-par, podemos perceber que essa diferenciação está mais localizada entre os extremos do transecto e sua porção mediana.

O mesmo padrão foi observado na distribuição dos haplótipos, obtidos pelo corte da região *cytb* com enzimas de restrição, já que ocorre aumento da variação ao longo do transecto, sendo que em Bertioga e João Pessoa diminui novamente.

O teste de Mantel com os dados de DNA mitocondrial não resultou em correlação entre as distâncias genética e geográfica. A análise foi repetida excluindo primeiramente a população de João Pessoa e, em seguida, as amostras de João Pessoa e Bertioga, em razão de se encontrarem mais afastadas do restante do transecto, o que poderia enviesar os resultados; porém, este procedimento não resultou em alteração significativa.

Para detectar como a variação encontrada se distribui, foi realizado o teste de AMOVA e os agrupamentos ocorreram de acordo com a proximidade entre as cidades. O segundo teste foi realizado para verificar se outro resultado seria obtido modificando o agrupamento. Quando foram considerados três níveis hierárquicos, nos dois tipos de agrupamento realizados, a variação

encontrada entre as populações no teste com dois níveis é mais representada pela variação entre grupos. Isso demonstra que as populações de um grupo são mais similares entre si do que com as de outro grupo. Uma das razões que pode explicar este achado pode ser a maior filopatria das fêmeas, já que os grupos foram formados por populações mais próximas. Além disso, esses dados demonstram o cuidado necessário para se caracterizar e identificar as diferentes populações já que, para o marcador utilizado, talvez fosse mais plausível considerar os grupos como populações e as amostras das localidades de cada grupo como suas sub-populações.

Essa hipótese foi confirmada pelo cálculo da diferenciação genética entre os grupos, já que o único valor de  $F_{st}$  significativo foi o do grupo formado pelas cidades de Rifaina, Pedregulho e Franca. Porém, essa diferenciação se deve às amostras de Franca, sendo que os indivíduos de Rifaina e Pedregulho podem ser considerados da mesma população, assim como ocorre com todos os outros grupos formados tanto no primeiro como no segundo agrupamento.

Os dados de frequência dos diferentes haplótipos em cada população revelam que sua distribuição é similar à obtida anteriormente com os padrões de restrição. A configuração da rede de haplótipos formada indica que o haplótipo 7 é o provável ancestral, visto que está presente em maior frequência e em todas as localidades estudadas. Podemos perceber ainda que a variabilidade maior, encontrada nas localidades situadas na porção mediana do transecto, ocorre por mutações sucessivas que estão presentes em menor frequência. Esse quadro pode ser indicativo de expansão populacional, o que se confirmou por meio de um teste de neutralidade, que resultou em um  $F_s$  negativo significativo ( $P < 0,05$ ) devido a excesso de alelos.

A ausência de correlação entre as distâncias geográfica e genética, verificada pelo teste de Mantel, não exclui a possibilidade de alguma estruturação populacional, pois algumas destas podem ter se diferenciado sem a ocorrência de isolamento por distância. Para verificar a ocorrência de estruturação não linear, foram realizados testes com os dados de sequência da região *cytb*, utilizando o software Structure 2.2.

Assim como nos testes anteriores, o resultado obtido demonstra padrão semelhante de distribuição nas cidades de Rifaina, Pedregulho, Bertioga e João Pessoa, enquanto as localidades situadas na porção mediana do

transecto possuem maior diversidade de padrões. Isso ocorreu tanto no primeiro teste, realizado a partir de 14 sítios polimórficos, cada um considerado um loco independente, como no segundo, considerando o haplótipo obtido pela variação simultânea nos oito sítios polimórficos.

Para a região 16S, podemos perceber que há uma tendência no aumento do haplótipo B e diminuição do A ao longo do transecto, o que demonstra diferenciação entre as cidades de Rifaina e Pedregulho e as outras utilizadas nesse teste. As amostras provenientes de Franca, Ribeirão Preto, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa não foram utilizadas nesse teste e, portanto, não foi possível observar se Bertioga e João Pessoa possuem padrão semelhante a Rifaina e Pedregulho e nem a maior variação de frequência, presente no centro do transecto. Os testes de RFLP-PCR por meio de digestão com enzima de restrição foram realizados no início de trabalho e substituídos posteriormente por análise de seqüenciamento em razão das vantagens conferidas - maior número de informações e maior rapidez na obtenção dos dados.

## **5.2. DNA nuclear**

A análise alozímica foi realizada com o intuito principal de verificação da espécie dos indivíduos coletados, permitindo, simultaneamente, a identificação de polimorfismos. Estes foram utilizados também para averiguar uma possível estruturação genética das populações mediante este tipo de marcador, mais conservado que os microssatélites. Esta análise simultânea e comparativa permite evitar os inconvenientes do uso de marcador altamente variável para estudos de estruturação genética (problemas de amostragem). Não foi realizada em algumas amostras já coletadas e que já haviam sido analisadas e também em outras armazenadas em álcool, o que inviabiliza a detecção enzimática.

A diferenciação genética, calculada pelo parâmetro  $F_{st}$ , demonstrou-se não significativa para o total de locos alozímicos, assim como para a maioria e o valor médio estimado para os locos microssatélites. Ao contrário do que ocorreu para os dados de DNA mitocondrial, isso demonstra que os dados de origem biparental, de maior variabilidade ou não, são mais homogêneos.



O teste de AMOVA para os locos microssatélites, em comparação com os dados mitocondriais, mostra variação quase inteiramente entre os indivíduos, indicando que todas as populações analisadas, inclusive a de João Pessoa, podem ser consideradas uma só, o que provavelmente é resultante de um processo de intenso fluxo gênico.

Apesar do teste de Mantel não ter resultado em correlação significativa entre as distâncias genética e geográfica, tanto para os dados mitocondriais como para os nucleares, percebe-se maior homogeneidade para os locos microssatélites, já que o coeficiente de correlação é menor e os pontos se ajustam mais à reta do que para a região cyb.

O comportamento dispensor dos machos foi sugerido pela falta de estruturação verificada pelo padrão de distribuição de clusters tanto para os locos alozímicos como para microssatélites. O número de clusters que melhor explica a distribuição dos alelos nucleares é 1 e isso demonstra que as populações são homogêneas, ao contrário do que ocorre com o DNA mitocondrial, cujos dados são explicados por 10, no primeiro teste e 11 clusters, no segundo teste.

Uma conseqüente contribuição dos dados de DNA nuclear é a estimativa de machos diplóides existentes nas populações de *E. cordata* do estado de São Paulo. Com esse trabalho, totalizamos 1 e 3 machos diplóides para, respectivamente, cerca de 300 machos de *E. cordata* e em cerca de 1.500 machos de *Euglossini* analisados em estudos conduzidos no LGEH (TAKAHASHI *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2007). Apesar de alguns estudos alozímicos terem apontado populações com altas freqüências de machos diplóides no Panamá e Colômbia (LÓPEZ-URIBE *et al.*, 2007; ROUBIK *et al.*, 1996; ZAYED *et al.*, 2004), o que foi sugerido como possível causa da não evolução da eussocialidade na tribo, nossos achados indicam que a elevada ocorrência relatada parece não ser um fenômeno generalizado.

Os dados de microssatélites obtidos a partir de machos servem ainda para corroborar a qualidade do método utilizado. Uma vez que todos os indivíduos analisados apresentaram no mínimo um alelo, não encontramos evidências da existência de alelos nulos, garantindo a acurácia da genotipagem desses locos aqui realizada.

### 5.3. Dispersão sexo-assimétrica em *Euglossa cordata*

As previsões sobre qual sexo é o mais indicado a se tornar o dispersor são muito dependentes do sistema de acasalamento da espécie (CANO, 2008), já que sistemas poligâmicos costumam promover dispersão do macho (GOUDET, *et al.* 2002; KEOGH *et al.*, 2007; LETURQUE; ROUSSET, 2004), enquanto dispersão fêmea - enviesada é resultante de sistemas monogâmicos (BEIRINCKX *et al.*, 2006; FAVRE *et al.*, 1997). Apesar das evidências de dispersão macho – enviesada encontrada em *E. cordata* por López-Uribe (2006) e neste trabalho, a espécie já foi descrita com comportamento monogâmico (SOUZA *et al.*, 2007) e, assim, a confirmação da ocorrência de dispersão sexo-assimétrica trará contribuições para o conhecimento da biologia reprodutiva da espécie no que diz respeito ao seu sistema de acasalamento.

Relatos de dispersão sexo-assimétrica em insetos são pouco frequentes na literatura e a maioria deles é baseada em métodos diretos, como marcação-recaptura (ROUQUETTE; THOMPSON, 2007). Estudos indiretos baseados em comparações entre dados de DNA mitocondrial e nuclear foram realizados em Himenópteros da família Formicidae e demonstraram diferenças significativas entre a diferenciação genética das populações analisadas com os diferentes marcadores (DOUMS *et al.*, 2002; GYLLENSTRAND; SEPPA, 2003; RUPPELL *et al.*, 2003; SANETRA; CROZIER, 2003).

Esse estudo utilizou de um método indireto, comparando a análise de nove locos microssatélites, descritos recentemente para a espécie de interesse (SOUZA *et al.*, 2007), com dados resultantes de seqüências da região mitocondrial *cytb*, as quais já possuem padrão definido para *E. cordata* (LÓPEZ-URIBE, 2006).

O poder em detectar dispersão sexo-assimétrica usando métodos indiretos diminui significativamente se a razão de dispersão for menor que 80:20, ou seja, se o sexo que mais dispersa representar menos de 80% do total de dispersores e mais de 20% do total de não dispersores (GOUDET *et al.*, 2002). Segundo o mesmo autor, a confiança dos índices que podem detectar um viés na dispersão diferencial de machos e fêmeas depende da magnitude da assimetria, da taxa de dispersão, do método de amostragem e dos marcadores examinados.

Em *E. cordata*, há relatos de que os machos abandonam imediatamente o ninho após a emergência, enquanto as fêmeas podem deixar o ninho depois de alguns dias, estabelecendo um novo, ou permanecer no ninho materno, reativando-o (GARÓFALO, 1985). Esse fato demonstra que os machos não possuem comportamento filopátrico enquanto as fêmeas, se dispersam, não o fazem com muita frequência e, assim, possivelmente ocorre uma razão de dispersão favorável à sua detecção.

As diferenças significativas entre dados genéticos uni e bi – parentais, encontradas em alguns estudos de Formicidae se devem provavelmente ao fluxo gênico restrito, que ocorre porque a fundação de uma colônia é totalmente dependente de fêmeas (GOROPASHNAYA *et al.*, 2007). Já que a espécie *E. cordata* não é eusocial, provavelmente isso não se aplica ao resultado encontrado nesse trabalho. Dois fatores evolutivos tem sido apontados como potenciais explicações para a evolução da dispersão sexo-assimétrica: evitar endogamia e interação competitiva (GREENWOOD, 1980; LAMBIN *et al.*, 2001; WOLFF, 1994). Isso porque a competição intra-sexual por recursos limitados, como locais ou parceiros para acasalamento, acaba favorecendo a dispersão de um dos sexos (CLARKE, 1978; DOBSON, 1982; GREENWOOD, 1980; HAMILTON, 1967) e, conseqüentemente, reduz a competição entre parentes, prevenindo acasalamentos endogâmicos (GREENWOOD, 1980; PERRIN; MAZALOV, 2000).

Para a espécie em estudo, foram reportados ninhos habitados por até seis fêmeas (CAMERON; RAMÍREZ, 2001; GARÓFALO, 1985), apesar da oviposição ser realizada usualmente pela mais velha, dominante sobre as outras e responsável também pela escolha da cavidade e por recobrir as células de resina (GARÓFALO, 1992). O fato de haver relatos de fêmeas coexistindo no mesmo ninho demonstra uma possibilidade da competição entre elas ser menor do que entre machos, o que favoreceria a dispersão macho-enviesada.

Em relação à taxa de dispersão, apesar de relatos de forrageamento para coleta de néctar e fragrâncias de apenas 400m de distância do ninho (KRODSMAN, 1975; LÓPEZ-URIBE *et al.*, 2008; SCHEMSKE, 1981), os Euglossini apresentam grande capacidade de vôo (JANZEN, 1971), podendo dispersar por até 50 km de distância (DRESSLER, 1982).

Para que este estudo ganhasse alguma representatividade, foram amostradas 11 cidades do estado de São Paulo, com uma distância mínima de 20km e máxima de 445Km entre as cidades, permitindo uma análise da estrutura genética populacional em escalas geográficas próximas e distantes. Além disso, a população da Paraíba foi utilizada como controle, já que se encontra bastante afastada do transecto.

A escolha dos marcadores utilizados também contribuiu sobremaneira para a análise de dispersão sexo-assimétrica, já que foram utilizados 9 locos microsatélites, além dos sistemas alozímicos, permitindo a comparação de dados nucleares mais e menos conservados. O fato de nesse trabalho terem sido utilizados dados de seqüência também apresenta vantagens em relação à técnica de RFLP-PCR, por detectar maior grau de polimorfismo do que apenas os sítios de restrição de enzimas.

Por fim, podemos afirmar que nossos dados de genes nucleares indicam fortemente que não há indícios de estruturação populacional em *E. cordata* e que dispersão e colonização seguem regras comportamentais diferentes, sendo de domínio principal de, respectivamente, machos e fêmeas. Os dados nucleares homogêneos demonstram que a dispersão não é limitada pela distância, o que vai de acordo com dados da literatura que demonstram grande capacidade de vôo para os Euglossini (JANZEN, 1971; ROUBIK; HANSON, 2004). Por outro lado, os dados mitocondriais parecem indicar alguma estruturação populacional, sugerindo que a proximidade geográfica influencia os eventos de colonização, sendo mais favoráveis quanto maior a proximidade física entre o novo local e o de origem.

## 6. Conclusões e Perspectivas

Os dados deste trabalho constituem forte apoio à hipótese inicial de López-Uribe (2006), já que os marcadores microssatélites apresentaram homogeneidade, enquanto as populações parecem ser diferenciadas em relação ao DNA mitocondrial. Porém, enquanto os resultados obtidos com marcadores microssatélites foram muito consistentes, a adição de dados de outra região mitocondrial será de grande valia para a corroboração da ocorrência de dispersão sexo-assimétrica em *E. cordata*.

No estabelecimento desta estruturação populacional, à adição de mais uma região mitocondrial deverá ser incorporada as seqüências completas do gene *cytb*. A recuperação do maior número de pares de bases pode trazer informações de outros sítios polimórficos; além disso, é necessário investigar as regiões onde houve discrepâncias entre as seqüências obtidas. Às dificuldades impostas quando, para um mesmo indivíduo, em um ou mais sítios, uma base para a seqüência “forward” diferente da esperada na seqüência “reverse” foi observada, a análise de padrões de corte com enzimas de restrição, por meio de reações de digestão, ou o seqüenciamento pós clonagem poderão ser o caminho para elucidar as razões de tais discrepâncias.

A resolução dessas bases “ambíguas” trará ainda uma melhor informação sobre a seqüência dos aminoácidos codificados pelo gene *cytb*. De posse destes dados, poderão ser feitos estudos da ocorrência de mutações neutras e não neutras na geração dos haplótipos, permitindo detectar indícios do efeito da seleção natural.

O acréscimo de novos dados mitocondriais poderá contribuir ainda para explicar o padrão semelhante verificado entre as cidades de Rifaina, Pedregulho, Bertioga e João Pessoa. Nestas localidades, observou-se uma menor variação para os haplótipos mitocondriais. Como as amostras destas localidades foram obtidas em áreas mais “naturais” (ou por se tratarem de cidades pequenas onde o entorno ainda conserva maiores vestígios da vegetação nativa ou por terem sido obtidas em áreas de mata), este achado parece indicar que as populações de *E. cordata* em áreas de maior urbanização ou alteração do entorno são mais estruturadas e, conseqüentemente, mais sujeitas aos efeitos da deriva, o que leva ao aumento

da frequência de haplótipos raros. Esta hipótese deverá merecer um estudo subsequente, em que novos genes mitocondriais serão investigados para confirmação deste padrão, ao mesmo tempo que amostras coletadas no interior das cidades e em fragmentos florestais do entorno serão comparadas.

Apesar da maior consistência apresentada pelos dados de microssatélites, os locos 30a e 30b demonstraram grande quantidade de “missing data”, devido à não amplificação ou maior dificuldade de genotipagem. Embora a exclusão destes dados não tenha afetado a conclusão deste trabalho, recomendamos para estudos futuros o delineamento de novos oligos para estudo de outros locos microssatélites, proporcionando informações adicionais que corroborem o padrão de dispersão sexo-assimétrica nas populações de *E. cordata*.

O possível efeito do método de amostragem sobre o padrão de dispersão e, conseqüentemente, sobre a estruturação populacional de *E. cordata* observada em áreas urbanas, merece ser investigado. Experimentos de marcação-recaptura devem ser realizados na área urbana de São Carlos a partir de fêmeas capturadas enquanto coletam pólen em flores. Estes dados poderão revelar um padrão de maior dispersão do que o verificado nas amostragens obtidas quando os adultos coletam néctar das flores de *T. peruviana*.

Finalmente, os dados aqui apresentados constituem ainda o início de um estudo futuro a respeito da filogeografia de *E. cordata*. Este estudo será facilitado pela padronização das técnicas já obtida, pela disponibilidade de uma amostra representativa das populações não só do estado de São Paulo, mas de outras regiões do país, em razão da relativa abundância desta espécie em todas as regiões brasileiras, quer em áreas florestais, quer nos espaços urbanos.

## 7. Referências Bibliográficas

AGUIAR, W. M.; GAGLIANONE, M.C. The communities of Euglossina bees (Hymenoptera: Apidae) in remnants of lowland forest on tertiary Tabuleiro in the Rio de Janeiro state. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 2, p. 118-25, 2008.

AMOS, W.; HARWOOD, J. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. **Philosophical Transactions of the Royal Society of Biology**, v. 353, p. 179-186, 1998.

ANDREWARTHA, H. G.; BIRCH, L.C. **The distribution and abundance of animals**. Chicago: University Chicago Press, 1954.

ARMBRUSTER, W. S. *et al.* Pollination of *Dalechampia magnoliifolia* (Euphorbiaceae) by male euglossine bees. **American Journal of Botany**, v. 76, p. 1279-1285, 1989.

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

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. 2nd ed. Sinauer: Sunderland MA, 2004.

BAWA, K. S. *et al.* Reproductive Biology of Tropical Lowland Rain Forest Trees. II. Pollination Systems. **American Journal of Botany**, v. 72, p. 346-356, 1985.

BEIRINCKX, K. *et al.* Sex biases in dispersal and philopatry: insights from a meta-analysis based on capture-mark-recapture studies of damselflies. **Oikos**, v. 113, p. 539-547, 2006.

BEMBÉ, B. **Revision of the *Euglossa cordata* group and studies on the functional morphology and faunistics of the Euglossini (Hymenoptera, Apidae)**. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. 2004.

BENNETT, F. D. Observations on *Exaerete* spp. and their hosts *Eulaema terminata* and *Euplusia surinamensis* (Hymen., Apidae, Euglossinae) in Trinidad. **Journal of the New York Entomology Society**, v. 80, p.118-124, 1972.

BORRELL, B. J. Long tongues and loose niches: evolution of euglossine bees and their nectar flowers. **Biotropica**, v. 37, p. 664-669, 2005.

BÚRQUEZ, A. Distributional limits of euglossine and meliponine bees (Hymenoptera: Apidae) in northwestern Mexico. **Pan-Pacific Entomologist**, v. 73, p. 137-140, 1997.

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

CAMERON, S. A.; RAMÍREZ, S. Nest architecture and nesting ecology of orchid bee *Eulaema meriana* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 74, n. 3, p. 142-165, 2001.

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

CANE, J. H. **Bees, pollination, and the challenges of sprawl. The legacy of sprawl.** New York: Columbia University Press, p. 109-124, 2005.

CANE, J. H.; TEPEDINO, V. J. Causes and extent of declines among native North America invertebrate pollinators: detection, evidence, and consequences. **Conservation Ecology**, v. 5, p. 1-10, 2001.

CANO, J. M.; MÄKINEN, H. S.; MERILÄ, J. Genetic evidence for male-biased dispersal in the three-spined stickleback. (*Gasterosteus aculeatus*). **Molecular Ecology**, v. 17, p. 3234-3242, 2008.

CLARKE, A. B. Sex ratio and local resource competition in a prosimian primate. **Science**, v. 201, p. 163-165, 1978.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies (version 1.21). **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1657-1659, 2000.

CROZIER, Y. C.; KOULIANOS, S.; CROZIER, R. H. An improved test for Africanized honeybee mitochondrial DNA. **Experientia**, v. 47, p. 968-969, 1991.



DOBSON, F. S. Competition for mates and predominant juvenile male dispersal in mammals. **Animal Behaviour**, v. 30, p. 1183-1192, 1982.

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

DOUMS, C.; CABRERA, H.; PEETERS, C. Population genetic structure and male-biased dispersal in the queen-less ant *Diacamma cyaneiventre*. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2251-2264, 2002.

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

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

ELLIS, J. S. *et al.* Cryptic species identification: a simple diagnostic tool for discriminating between two problematic bumblebee species. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 540-542, 2006.

ELTZ, T.; ROUBIK, D. W.; WHITTEN, M. W. Fragrances, male display and mating behavior of *Euglossa hemichlora* – a flight cage experiment. **Physiological Entomology**, v. 28, p. 251-260, 2003.

ENGEL, M. S. The first fossil *Euglossa* and phylogeny of the orchid bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **American Museum Novitates**, v. 3272, p. 1-14, 1999.

ENGEL, M. S. Family-Group Names for Bees (Hymenoptera: Apoidea). **American Museum Novitates**, v. 3476, 33 pp, 2005.

ENGEL, M. S.; GRIMALDI, D. A. New light shed on the oldest insect. **Nature** v. 427, p. 627-629, 2004.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

FAVRE, L. *et al.* Female-biased dispersal in the monogamous mammal *Crocidura russula*: evidence from field data and microsatellite patterns. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 264, p. 127-132, 1997.

FRANKEL, O. H.; SOULÉ, M. E. **Conservation and Evolution**. Cambridge: Cambridge University Press, 1981.

FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, p. 915-925, 1997.

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

GARÓFALO, C. A. Comportamento de nidificação e estrutura de ninhos de *Euglossa cordata* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 52, n. 1, p. 187-198, 1992.

GARÓFALO, C. A. *et al.* Nest structure and communal nesting in *Euglossa (Glossura) annectans* Dressler (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, p. 589-596, 1998.

GARÓFALO, C. A.; KERR, W. E. Sex determination in bees. I. Balance between femaleness and maleness genes in *Bombus atratus*. **Genetica**, v. 45, p. 203-209, 1975.

GARÓFALO, C. A.; ROZEN, J. G. Parasitic behavior of *Exaerete smaragdina* with descriptions of its mature oocyte and larval instars (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **American Museum Novitates**, v. 3349, p. 1-26, 2001.

GOROPASHNAYA, A. V. *et al.* Phylogeography and population structure in the ant *Formica exsecta* (Hymenoptera, Formicidae) across Eurasia as reflected by mitochondrial DNA variation and microsatellites. **Finnish Zoological and Botanical Publishing Board**, v. 44, p. 462-474, 2007.

GOUDET, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). **Journal of Heredity**, v. 86, p. 485-486, 1995.

GOUDET, J.; PERRIN, N.; WASHER, P. Tests for sex-biased dispersal using bi-parentally inherited genetic markers. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1103-1114, 2002.

GREENWOOD, P. J. Mating systems, philopatry, and dispersal in birds and mammals. **Animal Behaviour**, v. 28, p. 1140-1162, 1980.

GYLLENSTRAND, N.; SEPPA, P. Conservation genetics of the wood ant, *Formica lugubris*, in a fragmented land-scape. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 2931-2940, 2003.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMILTON, W. D. Extraordinary sex ratios. **Science**, v. 156, p. 477-488, 1967.

HARRISON, S.; HASTINGS, A. Genetic and evolutionary consequences of metapopulation structure. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 180-183, 1996.

HUTCHISON, D. W.; TEMPLETON, A. R. Correlation of Pairwise Genetic and Geographic Distance Measures: Inferring the Relative Influences of Gene Flow and Drift on the Distribution of Genetic Variability. **Evolution**, v. 53, p. 1898-1914, 1999.

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

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W.; WASER, N. M. Endangered mutualism: the conservation of plant-pollinator interactions. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 83-112, 1998.

KEOGH, J. S.; WEBB, J. K.; SHINE, R. Spatial genetic analysis and long-term mark-recapture data demonstrate male-biased dispersal in a snake. **Biology Letters**, v. 3, p. 33-35, 2007.

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

KIMURA, M. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press: Cambridge, England, 384 p., 1983.

KLEIN, A. M.; STEFFAN-DEWENTER, I.; TSCHARNTKE, T. Pollination of *Coffea canephora* in relation to local and regional agroforestry management. **Journal of Applied Ecology**, v. 40, p. 837-845, 2003.

KNUDSEN, J. T.; MORI, S. A. Floral scents and pollination in neotropical Lecythidaceae. **Biotropica**, v. 28, p. 42-60, 1996.

LABANDEIRA, C. C.; SEPKOSKI JUNIOR, J. J. Insect Diversity in the Fossil Record. **Science**, v. 261, p. 310-315, 1993.

LAMBIN, X.; AARS, J.; PIERTNEY, S. B. Dispersal, intraspecific competition, kin competition and kin facilitation: a review of the empirical evidence. In: CLOVERT, J. *et al.* (Ed.). **Dispersal**. Oxford: Oxford University Press, 2001. p. 110-122.

LETURQUE, H.; ROUSSET, F. Intersexual competition as an explanation for sex-ratio and dispersal biases in polygynous species. **Evolution**, v. 58, p. 2398-2408, 2004.

LEVINS, R. Extinction. In: GERSTENHABER, M. (Ed.). **Some Mathematical Questions in Biology**. Providence: Lecture Notes on Mathematics in the Life Sciences, The American Mathematical Society, 1970. p. 75-107.

LÓPEZ-URIBE, M. M. **Dinâmica e estrutura genética populacional de abelhas Euglossini (Hymenoptera: Apidae) visitantes florais de *Thevetia peruviana* (Apocynaceae) em áreas urbanas**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2006.

LÓPEZ-URIBE, M. M.; DEL LAMA, M. A. Molecular identification of females of *Euglossa spp.* Latreille (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) floral visitors of *Thevetia peruviana* (Apocynaceae) in urban areas. **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 712-720, 2007.

LÓPEZ-URIBE, M. M.; OI C. A.; DEL LAMA, M. A. Nectar-foraging behavior of Euglossine bees (Hymenoptera: Apidae) in urban areas. **Apidologie**, v. 39, p. 410-418, 2008.

MICHENER, C. D. **The social behavior of the bees. A comparative study**. Cambridge: The Belknap Press, 1974.

MONTALVO, A. M.; ACKERMAN, J. Relative pollinator effectiveness and evolution of floral traits in *Spathiphyllum friedrichsthali* (Araceae). **Journal of American Botany**, v. 73, p. 1665-1676, 1986.

MORATO, E. F. Abundância e riqueza de machos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em mata de terra firme e áreas de derrubada, nas vizinhanças de Manaus (Brasil). **Boletim do Museu do Pará Emílio Goelde, séries de Zoologia**, v. 10, p. 95-105, 1994.

MYERS, J. G. Ethological observations on the citrus bee, *Trigona silvestriana* Vachal, and other neotropical bees (Hym., Apoidea). **Transactions of the Royal Entomological Society of London**, v. 83, p. 131-142, 1935.

NIEMELÄ, J. Ecology and urban planning. **Biodiversity and Conservation**, v. 8, p. 119-131, 1999.

OTERO, J. T.; SANDINO, J. C. Capture rates of male euglossine bees across a human intervention gradient, Choco region, Colombia. **Biotropica**, v. 35, p. 520-529, 2003.

PANSARIN, E. R.; AMARAL, M. C. E. Reproductive biology and pollination of southeastern Brazilian *Stanhopea* Frost ex Hook. (Orchidaceae). **Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 204, p. 238-249, 2008.

PERRIN, N.; MAZALOV, V. Local competition, inbreeding, and the evolution of sex-biased dispersal. **The American Naturalist**, v. 155, p. 116-127, 2000.

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

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. (version 2.2.). **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

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

RASNITSYN, A. P. Ontology of Evolution and Methodology of Taxonomy. **Paleontological Journal**, v. 40, p. 679-737, 2006.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Genepop (version 3.4): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

ROUBIK, D. W. **Ecology and natural history of tropical bees**. New York: Cambridge University Press, 1989.

ROUBIK, D. W.; HANSON, P. E. Orchid bees from tropical America: Biology and field guide. **INBio Press, Santo Domingo de Heredia, Costa Rica**, pp.352, 2004.

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

ROUSSET, F. Genetic differentiation and estimation of gene flow F-statistics under isolation by distance. **Genetics**, v. 145, p. 1219-1228, 1997.

ROUQUETTE, J. R.; THOMPSON, D. J. Patterns of movement and dispersal in endangered damselfly and the consequences for its management. **Journal of Applied Ecology**, v. 44, p. 692-701, 2007.

RÜPPELL, O. *et al.* Mitochondrial markers in the ant *Leptothorax rugatulus* reveal the population genetic consequences of female philopatry at different hierarchical levels. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 795-801, 2003.

SANETRA, M.; CROZIER, R. H. Patterns of population subdivision and gene flow in the ant *Nothomyrmecia macrops* reflected in microsatellite and mitochondrial DNA markers. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2281-2295, 2003.

SCHEMSKE, D. W. Floral convergence and pollinator sharing in two bee-pollinated tropical herbs. **Ecology**, v. 62, p. 946-954, 1981.

SCHULTZ, T. R.; ENGEL, M. S.; PRENTICE, M. Resolving conflict between morphological and molecular evidence for the origin of eusociality in the corbiculate bees (Hymenoptera: Apidae): a hypothesis-testing approach.

University of the Kansas Natural History, Special Publication, v. 24, p. 110-123, 1999.

SHEPPARD, W. S.; MCPHERON, B. A. Ribosomal DNA diversity in *Apidae*. In: SMITH, D. R. (Ed.): **Diversity in the genus *Apis***. Boulder: Westview, 1991, p. 89-102.

SILVA, I. O. **Espécies de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) coletadas em fragmentos da Floresta Amazônica: variação genética e diploidia**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2002.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. **Fundação Araucária, Belo Horizonte, Brasil**, 2002.

SINGER, R. B.; SAZIMA, M. The pollination mechanism in the "*Pelexia alliance*" (Orchidaceae: Spiranthinae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 131, p. 219-262, 1999.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236, p. 787-792, 1987.

SOARES, A. A. *et al.* Relações entre *Euglossa (Euglossella) mandibularis* Friese, 1899 (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) e *Cyphomandra calycina* (Solanaceae). **Ciência e Cultura**, v. 41, p. 903-903, 1989.

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

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

SOUZA, R. O. *et al.* Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 1352-1356, 2007.

SOUZA, R. O. **Estrutura genética e sociogenética das populações e ninhos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) determinadas por meio de**

**microssatélites**. 2007. 78 f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

STEFFAN-DEWENTER, I. Importance of habitat area and landscape context for species richness of bees and wasps in fragmented orchard meadows. **Conservation Biology**, v. 17, p. 1036-1044, 2003.

TAKAHASHI, N. C. *et al.* A reanalysis of diploid male frequencies in euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). **Evolution**, v. 55, p. 1897-1899, 2001.

WADE, M. J.; MCCAULEY, D. E. Extinction and recolonization: their effects on the genetic differentiation of local populations. **Evolution**, v. 42, p. 995-1005, 1988.

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **BioTechniques**, v. 10, p. 506-513, 1991.

WILSON, E. O. **The insect societies**. Cambridge: The Belknap Press of Harvard University Press, 1971.

WOLFF, J. O. More on juvenile dispersal in mammals. **Oikos**, v. 71, p. 349-352, 1994.

WORKMAN, P. L.; NISWANDER, J. D. Population Studies on Southwestern Indian Tribes II. Local Genetic Differentiation in the Papago. **American Journal of Human Genetic**, v. 22, p. 24-29, 1970.

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

ZANETTE, L. R. S.; MARTINS, R. P.; RIBEIRO, S. P. Effects of urbanization on Neotropical wasp and bee assemblages in a Brazilian metropolis. **Landscape and Urban Planning**, v. 71, p. 105-121, 2005.

ZAYED, A. Effective population size in Hymenoptera with complementary sex determination. **Heredity**, v. 93, p. 627-630, 2004.



ZAYED, A.; ROUBIK, D. W.; PACKER, L. Use of diploid male frequency data as an indicator of pollinator decline. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 271 (S), p. S9-S12, 2004.

ZAYED, A.; PACKER, L. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 102, p. 10742-10746, 2005.

## 8. Apêndices

Apêndice 1. Seqüência de pares de bases da região *cytb* para o haplótipo 7, em um indivíduo da cidade de Rifaina. Em vermelho, oligo forward 5'-3' e em azul, oligo reverse 5'-3' (reverso – complemento), ambos descritos por Crozier *et al.* (1991). Em amarelo, sítios polimórficos utilizados para gerar os haplótipos.

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      10      20      30      40      50
TTATGTACTA CCATGAGGAC AAATATCTTTT TTGAGGAGCT ATAGTAATTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      60      70      80      90     100
CAAATTTAAT ATCAGCAATT CCTTATATTG GTCAACTATT AGTAGAATGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     110     120     130     140     150
ATTTGAGGAG GATTCTCAAT TAATAATTCA ACATTAAATC GATTTTTTTTC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     160     170     180     190     200
ATTACATTTT ATTTTACCAAT TAATTATTAT AATAATAGTA ATATTACATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     210     220     230     240     250
TAATTATTTT ACATATTACA GGATCAACAA ATCCTGTAGG AACAAATAGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     260     270     280     290     300
AATATTTATA AAATTCCATT TTATCCTTAT TTTATAATTA AAGATTTTATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     310     320     330     340     350
AGGATTTTATT ATTATTCTAC CTTTATTTTAT ATTTATTAAT TTTCAATATC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     360     370     380     390     400
CTTATTATTT TGGAGATCCT GATAATTTTA AAATAGCTAA TTCAATAAATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     410     420     430     440     450
ACACCAATTC ATATTAAACC AGAATGATAT TTTTTATTTG CTTATTCAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.
     460     470     480
TTTACGATCA ATTCCTAATA AATTAGGAGG TGTAAT
```

Apêndice 2. Freqüências alélicas estimadas para os locos alozímicos nas populações de Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa.

locos	alelos	Fra	RP	Jab	Ara	Lem	RC	Pir	Ber	JP
<b>Est-1</b>	92	0	0,017	0	0,065	0,052	0,047	0,029	0,116	0
	100	1	0,983	1	0,927	0,934	0,858	0,971	0,837	1
	103	0	0	0	0,008	0,013	0,095	0	0,047	0
<b>Est-4</b>	100	1	1	1	0	0	1	0,981	0,907	0,933
	106	0	0	0	0	0	0	0,019	0,093	0,067
<b>GPI</b>	92	0,046	0,034	0,051	0,035	0,026	0,032	0,019	0	0
	96	0	0,034	0,017	0	0,013	0	0,029	0	0
	100	0,954	0,933	0,932	0,965	0,961	0,969	0,942	1	1
<b>MDH</b>	103	0	0	0	0	0	0	0,01	0	0
	92	0,215	0,168	0,169	0,122	0,184	0,157	0,279	0	0
	100	0,785	0,832	0,83	0,878	0,816	0,842	0,721	1	1
<b>ACP</b>	92	0	0	0,017	0,008	0	0,008	0,26	0	0
	100	1	1	0,983	0,992	1	0,992	0,74	1	0
<b><math>\alpha</math>Gpdh</b>	96	0,015	0	0,017	0	0	0	0	0,023	0
	100	0,985	0,983	0,983	0,965	0,987	0,976	1	0,977	1
	106	0	0,017	0	0,035	0,013	0,023	0	0	0
<b><math>\beta</math>Hbdh</b>	92	0	0	0,017	0,018	0	0	0	0	0
	100	1	1	0,983	0,982	1	1	1	1	1
<b>Pgm</b>	96	0	0	0	0,016	0	0	0,038	0,07	0
	100	1	1	1	0,984	1	1	0,961	0,93	1
<b>ICD</b>	94	0,031	0,008	0	0,008	0	0	0,019	0	0
	100	0,969	0,992	1	0,992	1	1	0,981	1	1
<b>SOD</b>	100	0,938	1	1	1	1	1	1	1	0,4
	106	0,061	0	0	0	0	0	0	0	0,6

Apêndice 3. Frequências alélicas estimadas para os locos de microssatélites nas populações de Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba, Bertioga e João Pessoa.

locos	alelos	Rif	Ped	Fra	RP	Jab	Ara	SC	Lem	RC	Pir	Ber	JP
17	204	0,027	0,018	0	0,009	0,013	0,017	0,013	0	0,017	0,014	0	0
	206	0	0	0	0	0	0	0	0,011	0,025	0	0	0
	207	0	0	0,016	0	0	0	0	0,011	0	0,014	0	0
	211	0,098	0,143	0,141	0,198	0,118	0,233	0,112	0,182	0,200	0,167	0,143	0,152
	214	0,049	0,018	0,016	0,038	0,039	0,025	0,009	0,023	0,017	0,069	0,048	0
	217	0,136	0,054	0,078	0,066	0,079	0,067	0,078	0,068	0,025	0,028	0,071	0,087
	220	0,228	0,054	0,156	0,160	0,211	0,192	0,203	0,205	0,258	0,167	0,238	0,174
	223	0,147	0,179	0,188	0,217	0,145	0,175	0,207	0,193	0,208	0,222	0,143	0,196
	226	0,092	0,196	0,156	0,104	0,118	0,067	0,147	0,057	0,075	0,069	0,071	0,043
	229	0,103	0,196	0,156	0,094	0,158	0,100	0,142	0,125	0,067	0,125	0,024	0,196
	231	0	0	0	0	0	0	0	0,011	0	0	0	0
	232	0,060	0,018	0,016	0,038	0,066	0,042	0,043	0,023	0,042	0,083	0,119	0,087
	235	0,027	0,107	0,063	0,038	0,039	0,042	0,039	0,068	0,050	0,014	0,095	0,043
	237	0,027	0,018	0	0,009	0	0,008	0,009	0,011	0,008	0	0,048	0,022
	240	0,005	0	0	0,028	0,013	0,017	0	0,011	0,008	0,028	0	0
	243	0	0	0	0	0	0,008	0	0	0	0	0	0
	245	0	0	0,016	0	0	0,008	0	0	0	0	0	0
18	162	0,086	0,054	0,032	0,059	0,012	0,054	0,033	0,034	0,053	0,118	0,119	0,146
	165	0,204	0,179	0,048	0,167	0,155	0,161	0,152	0,068	0,237	0,147	0,405	0,313
	168	0,231	0,196	0,113	0,186	0,262	0,241	0,213	0,239	0,149	0,176	0,095	0,083
	171	0,048	0,089	0,113	0,059	0,060	0,054	0,066	0,125	0,044	0,074	0,095	0,083
	174	0,065	0,018	0,065	0,039	0,024	0,018	0,049	0,023	0,053	0,044	0,024	0,042
	177	0,102	0,054	0,097	0,088	0,083	0,071	0,123	0,125	0,132	0,132	0	0
	180	0,048	0,036	0,097	0,069	0,071	0,071	0,061	0,057	0,061	0,103	0	0,042
	182	0	0	0	0,020	0	0	0	0	0	0	0	0
	183	0,081	0,089	0,145	0,088	0,095	0,134	0,094	0,136	0,096	0,029	0,024	0,104
	185	0,032	0,071	0,032	0,010	0,071	0,063	0,053	0,034	0,053	0,044	0,190	0,167
	188	0,048	0,125	0,097	0,147	0,048	0,054	0,070	0,080	0,053	0,044	0,048	0,021
	191	0,038	0,036	0,097	0,059	0,024	0,063	0,070	0,068	0,053	0,059	0	0
	194	0,011	0,018	0,032	0	0,024	0,009	0,008	0,011	0,009	0,029	0	0
	197	0	0,036	0,032	0,010	0,071	0,009	0,008	0	0,009	0	0	0
	208	0,005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30b	87	0,011	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	91	0,011	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	103	0	0,019	0	0	0	0,009	0,014	0,013	0	0	0	0
	105	0	0	0	0	0	0	0,005	0	0	0	0	0
	107	0,011	0	0,065	0	0,013	0,009	0	0,013	0,009	0	0	0
	109	0,341	0,444	0,419	0,196	0,321	0,318	0,338	0,308	0,313	0,333	0,029	0
	111	0,119	0,093	0,081	0,078	0,064	0,109	0,060	0,103	0,107	0,097	0	0
	113	0,057	0,019	0,065	0,118	0,038	0,036	0,046	0,013	0,027	0,028	0	0,054
	115	0,063	0,111	0,097	0,118	0,128	0,155	0,125	0,064	0,063	0,097	0	0,054
	117	0,091	0,130	0,048	0,098	0,064	0,082	0,051	0,090	0,116	0,097	0,059	0,081
	119	0,051	0,037	0,097	0,069	0,038	0,091	0,046	0,090	0,080	0,097	0,176	0,216
	121	0,074	0,037	0	0,069	0,038	0,027	0,065	0,013	0,045	0,028	0,059	0,108
	124	0,034	0	0,048	0,108	0,051	0,036	0,037	0,013	0,054	0,069	0,059	0,135
	126	0,034	0,037	0,032	0,059	0,026	0,027	0,046	0,077	0,089	0,042	0,118	0,054

	128	0,034	0,019	0,016	0,039	0,064	0,036	0,042	0,038	0,045	0,014	0,059	0,135
	130	0,023	0	0,032	0,010	0,026	0,018	0,042	0,064	0,018	0,056	0,176	0,054
	132	0,006	0,056	0	0,020	0,013	0	0,037	0,013	0,027	0	0,147	0
	134	0,028	0	0	0	0,026	0,009	0,019	0,013	0,009	0	0,029	0,054
	136	0,006	0	0	0	0,051	0,009	0,009	0,013	0	0	0,029	0
	138	0	0	0	0	0,013	0	0,005	0,051	0	0,014	0,029	0,027
	140	0	0	0	0	0,026	0,009	0,005	0	0	0	0,029	0
	142	0	0	0	0,010	0	0,018	0	0	0	0	0	0
	144	0	0	0	0,010	0	0	0,009	0	0	0,028	0	0
	146	0,006	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	148	0	0	0	0	0	0	0	0,013	0	0	0	0,027
35	130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,024	0
	156	0	0	0	0	0	0,017	0,004	0	0,008	0,014	0	0
	162	0,075	0,054	0,065	0,045	0,024	0,033	0,029	0,054	0,075	0,054	0,071	0,104
	163	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,027	0	0
	165	0,011	0,036	0,016	0	0	0,017	0,012	0,011	0,017	0,014	0,071	0
	168	0,651	0,571	0,629	0,627	0,619	0,658	0,632	0,587	0,642	0,581	0,643	0,542
	171	0,226	0,339	0,274	0,291	0,321	0,258	0,298	0,326	0,242	0,297	0,190	0,313
	174	0,038	0	0,016	0,018	0	0,008	0,025	0,011	0,017	0,014	0	0
	177	0	0	0	0,018	0,036	0,008	0	0	0	0	0	0,042
	188	0	0	0	0	0	0	0	0,011	0	0	0	0
51	215	0,005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	217	0,016	0	0,016	0,028	0	0,025	0,050	0,065	0,025	0	0,023	0,042
	220	0,016	0,018	0	0,028	0,012	0	0,013	0	0,008	0,014	0	0
	223	0,688	0,643	0,672	0,528	0,679	0,608	0,651	0,750	0,667	0,625	0,674	0,646
	226	0,194	0,268	0,281	0,324	0,262	0,267	0,235	0,163	0,183	0,319	0,302	0,250
	229	0,065	0,018	0,031	0,037	0,036	0,058	0,042	0,022	0,083	0,028	0	0,063
	232	0,011	0,036	0	0,056	0,012	0,042	0,008	0	0,025	0,014	0	0
	235	0,005	0,018	0	0	0	0	0	0	0,008	0	0	0
24	190	0,027	0,036	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	192	0,038	0,036	0,063	0,077	0,037	0,068	0,083	0,011	0,058	0,044	0,047	0,021
	193	0,005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	194	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,015	0	0
	195	0,082	0,125	0,016	0,087	0,122	0,076	0,083	0,056	0,083	0,029	0,070	0,063
	198	0	0,018	0,016	0,029	0,012	0	0,018	0,022	0	0	0	0
	199	0,005	0	0	0	0	0	0	0	0	0,015	0	0
	200	0,005	0	0	0	0	0,017	0	0	0	0	0	0
	201	0,071	0,018	0,063	0,048	0,037	0,008	0,048	0,144	0,058	0,059	0,256	0,146
	202	0,212	0,196	0,172	0,192	0,220	0,229	0,237	0,189	0,192	0,206	0,256	0,042
	203	0,027	0,071	0	0	0	0,008	0,004	0,011	0,033	0,044	0	0,021
	204	0,364	0,375	0,453	0,375	0,378	0,398	0,364	0,378	0,308	0,294	0,279	0,563
	205	0,065	0,018	0,078	0,058	0,061	0,085	0,057	0,044	0,108	0,103	0,093	0,146
	206	0,022	0,071	0,063	0,029	0,085	0,034	0,031	0,011	0,042	0,074	0	0
	207	0,011	0,036	0,078	0,029	0,012	0,051	0,035	0,078	0,067	0,059	0	0
	208	0,038	0	0	0,048	0,037	0,008	0,031	0,033	0,050	0,044	0	0
	209	0,005	0	0	0,010	0	0,008	0,004	0	0	0,015	0	0
	210	0,005	0	0	0	0	0	0,004	0	0	0	0	0
	213	0,016	0	0	0,010	0	0,008	0	0,022	0	0	0	0
	218	0	0	0	0,010	0	0	0	0	0	0	0	0
26	107	0,005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	160	0,032	0,054	0,109	0,048	0,024	0,068	0,058	0,033	0,042	0,029	0,023	0,020
	164	0,210	0,161	0,219	0,221	0,256	0,153	0,130	0,178	0,169	0,129	0,140	0,184

	166	0,005	0	0,078	0,019	0	0	0,014	0	0,008	0	0	0
	169	0	0	0	0,019	0	0	0,005	0	0	0,043	0	0
	170	0,317	0,375	0,234	0,231	0,280	0,314	0,245	0,289	0,331	0,214	0,279	0,327
	172	0	0	0	0	0	0	0	0,011	0,017	0,043	0	0,020
	173	0,140	0,161	0,047	0,106	0,122	0,085	0,135	0,122	0,110	0,086	0,116	0,102
	175	0	0	0,063	0,058	0,061	0,051	0	0,033	0,127	0,057	0	0,082
	176	0,177	0,143	0,078	0,135	0,122	0,169	0,264	0,156	0,068	0,171	0,326	0,143
	178	0	0	0,047	0,048	0,037	0,017	0	0,056	0,008	0,057	0	0
	179	0,048	0,054	0,047	0,038	0,049	0,076	0,063	0,044	0,051	0,043	0	0,041
	182	0,038	0,018	0,016	0,029	0,012	0,051	0,048	0,022	0,042	0,086	0,070	0,061
	185	0,005	0,036	0,031	0,010	0,024	0,017	0,019	0,011	0	0,014	0	0,020
	188	0,005	0	0,031	0,038	0,012	0	0,019	0,044	0,025	0,014	0	0
	191	0,016	0	0	0	0	0	0	0	0	0,014	0,047	0
30a	139	0,011	0	0	0	0	0	0,007	0	0	0	0,024	0
	141	0,006	0,019	0	0	0	0,008	0	0,033	0	0	0	0
	144	0,376	0,315	0,403	0,170	0,333	0,300	0,287	0,272	0,183	0,229	0,095	0,104
	145	0,011	0,019	0,048	0,140	0,048	0,083	0,027	0,033	0,092	0,057	0,143	0
	146	0,011	0	0	0,010	0,060	0,025	0,040	0,022	0,008	0,043	0	0
	147	0,382	0,537	0,290	0,400	0,321	0,250	0,393	0,370	0,400	0,429	0,524	0,813
	148	0,056	0,037	0,113	0,130	0,119	0,125	0,040	0,109	0,158	0,086	0,024	0,021
	150	0,112	0,074	0,129	0,140	0,083	0,200	0,207	0,163	0,117	0,086	0,167	0,063
	151	0	0	0	0,010	0	0,008	0	0	0,017	0	0	0
	152	0	0	0	0	0,012	0	0	0	0,008	0,029	0,024	0
	154	0,006	0	0	0	0,024	0	0	0	0	0,014	0	0
	155	0	0	0	0	0	0	0	0	0,017	0,029	0	0
	160	0,028	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	170	0	0	0,016	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	154	0,005	0,018	0,016	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	157	0	0	0,016	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	160	0,027	0,018	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,024
	163	0,016	0	0	0	0	0	0	0	0,008	0	0	0,024
	166	0,011	0,089	0	0,019	0,012	0,025	0,009	0,022	0,008	0,014	0	0,024
	168	0	0	0	0,010	0	0	0	0	0	0	0	0
	169	0	0	0	0	0	0	0	0,011	0,025	0	0	0
	173	0,038	0,054	0,078	0,019	0,060	0,033	0,073	0,076	0,042	0,029	0,341	0,171
	176	0,071	0,036	0,109	0,125	0,083	0,100	0,164	0,120	0,025	0,129	0,073	0,024
	179	0,207	0,411	0,359	0,308	0,321	0,367	0,236	0,304	0,333	0,300	0,146	0,268
	181	0	0	0	0	0	0	0	0	0,017	0	0	0
	182	0,179	0,196	0,172	0,260	0,214	0,167	0,282	0,239	0,283	0,300	0,122	0,098
	185	0,087	0,089	0,047	0,125	0,071	0,075	0,091	0,065	0,033	0,143	0,098	0,146
	188	0,060	0,036	0,109	0,029	0,071	0,058	0,045	0,022	0,042	0,029	0,122	0
	191	0,125	0,018	0,047	0,077	0,071	0,033	0,018	0,098	0,067	0,043	0	0,073
	194	0,016	0	0,016	0	0,024	0,033	0,032	0,022	0,017	0	0,049	0,073
	197	0,054	0	0	0,010	0,012	0,050	0,018	0	0	0	0,024	0,049
	200	0,016	0	0	0,019	0,012	0,008	0,005	0	0,042	0	0,024	0
	203	0	0,036	0	0	0	0,025	0,014	0	0,008	0,014	0	0
	207	0,027	0	0,031	0	0	0,017	0	0,011	0,017	0	0	0,024
	213	0,005	0	0	0	0	0	0	0	0,017	0	0	0
	216	0,011	0	0	0	0,012	0	0,005	0,011	0,017	0	0	0
	220	0,022	0	0	0	0,012	0	0	0	0	0	0	0
	223	0,016	0	0	0	0,024	0,008	0,009	0	0	0	0	0
	232	0,005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0