

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

Estrutura sociogenética de ninhos de Euglossini (Hymenoptera:
Apidae) e estrutura genética das populações urbanas de
Euglossa cordata do estado de São Paulo



Cíntia Akemi Oi

SÃO CARLOS - SP
2010

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

Estrutura sociogenética de ninhos de Euglossini
(Hymenoptera: Apidae) e estrutura genética das populações
urbanas de *Euglossa cordata* do estado de São Paulo

Cíntia Akemi Oi

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Evolução 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: Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

SÃO CARLOS - SP

2010

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

O39es

Oi, Cíntia Akemi.

Estrutura sociogenética de ninhos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) e estrutura genética das populações urbanas de *Euglossa cordata* do estado de São Paulo / Cíntia Akemi Oi. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
81 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Genética de populações. 2. Euglossini. 3. Ferramentas moleculares. 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

**ESTRUTURA SOCIOGENÉTICA DE NINHOS DE
EUGLOSSINI (HYMENOPTERA: APIDAE) E ESTRUTURA
GENÉTICA DAS POPULAÇÕES URBANAS DE *EUGLOSSA
CORDATA* DO ESTADO DE SÃO PAULO.**

Dissertação de Mestrado de Cintia Akemi Oi

Banca Examinadora


Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama



Profa. Dra. Vera Lúcia Imperatriz-Fonseca



Profa. Dra. Sílvia Helena Sofia



“Where your treasure is, there will your heart be also...”

Harry Potter and the Deathly Hallows

Dedico este trabalho aos meus pais Takao e Julia, às minhas irmãs
Simone e Mônica e ao meu sobrinho Renan.

Agradecimentos

Aos meus pais, por me fornecerem condições para que eu realizasse este trabalho e também por me permitirem correr atrás dos meus objetivos. Pelo amor, apoio, educação e convivência familiar.

Às minhas queridas irmãs que me apóiam, pelo amor e amizade. Ao meu sobrinho Renan simplesmente por existir.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama, pela oportunidade, orientação, amizade e confiança que permitiram a realização deste trabalho.

Ao meu amor Fábio Toshiro, simplesmente pelo amor, mas também pela paciência, fidelidade, amizade e disponibilidade em todas as horas. O seu apoio foi fundamental e é fundamental para minha vida ser mais feliz!

Aos meus amigos do laboratório, Margarita, Kátia, Natália, Otávio, Juliano, Camilla, Isabel, Thaís, Keize, Luana, Juliana e Caíto, pelo bom convívio, conversas, cafés, experiências e almoços no RU, e que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, seja intelectual ou mesmo braçal.

Aos colegas do Laboratório de Genética de Aves (LGA) pelo convívio e troca de experiências, principalmente Carol, Thaís, Manu, Andiará e Emeline.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Otávio Alvarenga Alves de Brito por me receber em seu laboratório e pelos comentários a este trabalho, e a todos os colegas do Laboratório de Genética de Populações e Evolução, principalmente a Fer, Iderval, Daniel e André pela colaboração e também por dividir o espaço do seu lab comigo, principalmente nas bancadas.

Um parágrafo especial à minha amiga Fernanda Fernandes pelas partes experimentais durante as clonagens, obrigado pela disponibilidade e pelos géis de brometo. Um pouquinho de “desagradecimento” também por ter jogado minhas amostras no lixo mesmo “sem querer”.

Aos meus amigos “revisores”, Tosh e Keize, pelas leituras, comentários, paciência, disponibilidade e correções. MUITÍSSIMO obrigado!

Ao Cervini, pela disponibilidade na ajuda com os microssatélites.

Ao Rogério pelos tantos e-mails respondidos a longa distância, mesmo sem tempo.

A todos os que contribuíram efetivamente para a realização desse trabalho, que se dispuzeram a fazer as coletas comigo debaixo de sol, coletando as abelhas nas calçadas.

E agora aos meus amigos, mas com igual importância;

A Bio-03, pelos anos de convivência e amizade, que tornaram minha vida em São Carlos muito mais agradável e divertida: Carol, Cíntia Camila, Juliana, Ste, Lú, Camilla, Fê, Lê, Raquel, Paola, Márcia, Pompe, Mazi, Mariet's, Marinão, Juliano, Fabrício, Felipe, Ana Carol, Cortella, Val, Clarissa, Ana Ruela, Hubert, Vinicião, Vivi, Shini, Lindo, Nathan, Tana, Marcelo, Imyra, Frango, Bunda e mais alguém que eu tenha me esquecido.

Aos amigos que fiz nas outras pós que me acompanharam nos bares e almoços que fizeram a minha vida mais feliz, principalmente: Lu, Sadao, Fer e Denise.

Aos amigos do beisebol e softbol UFSCar, destes não citarei nomes com medo de esquecer alguém!

Às minhas roommates queridas, obrigado pelo convívio e apoio: Mari, Cass, Cris, Renata, Karol, Ste, Lu, Marinão, Camilla, Gabi, Fabi e Carol.

Às meninas do fut de quinta.

Aos demais amigos de São Carlos, do DGE, Hidro, Debe e da Bio.

Aos amigos da Bio-02, principalmente ao Tavin, Naná, Val e André.

Aos amigos da Hidro, pela convivência, momentos de alegria e descontração e aos almoços no RU.

Também a todas as amigadas que mantenho à distância; obrigada a todos pela compreensão e apoio - aos meus amigos de Itapê: Thaty, Tika, Wagner, Roger, Jum e Sil e a todos os amigos de São Paulo, que acham que faço mestrado desde que me mudei para São Carlos, especialmente ao grupo eh_plau: Dé, Mi, Flávia, Flávio, Denny, Liane, Ayao, Denis e Jeff!

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Garófalo, ao Prof. Dr. Celso Feitosa Martins e ao M. Sc. Léo Correia da Rocha Filho pelas amostras concedidas.

Ao Dr. André Nemésio de Barros Pereira pela identificação das amostras.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, às secretárias Greissi e Heloísa e aos funcionários do DGE.

Aos membros da banca, Profa Dra Vera Lúcia Imperatriz-Fonseca e Profa Dra Sílvia Helena Sofia.

À Capes, pela bolsa concedida.

A Deus, pelo dom da vida.

A todos os que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e mais alguém que tenha me esquecido, meus sinceros agradecimentos.

Abreviações

mtDNA: DNA mitocondrial

RFLP: polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição

RAPD: polimorfismos amplificados aleatoriamente

cyt b: citocromo b

COI: subunidade I do complexo citocromo oxidase c

COII: subunidade II do complexo citocromo oxidase c

ile-ND2: RNA transportador de isoleucina - subunidade 2 do complexo da NADH desidrogenase

Eg: *Euglossa** (* de acordo com Dressler, 1982)

El: *Eulaema**

Ef: *Eufriesea**

Ex: *Exaerete**

RESUMO

As abelhas da tribo Euglossini (Hymenoptera: Apidae) são polinizadores importantes da região Neotropical. São abelhas muito estudadas graças às facilidades de obtenção de machos mediante o uso de iscas-odores; no entanto, poucos são os estudos com fêmeas. Este trabalho teve o objetivo de estudar as abelhas euglossíneas com o uso de ferramentas moleculares, coletando ninhos e adultos em flores para uma análise ao nível do indivíduo, família e população. No capítulo 1 é descrita uma estratégia não letal para obtenção de DNA a partir da realização de experimentos de marcação e recaptura coletando antenas de adultos de *Euglossa cordata* e *Eulaema nigrita* amostrados em flores de *Thevetia peruviana*. Foi demonstrada igual chance de recaptura nos dois grupos (antenas intactas vs. antenas seccionadas) pelo teste de qui-quadrado, sugerindo não afetar a sobrevivência das abelhas cujas antenas foram seccionadas. As antenas retiradas foram amplificadas com sucesso para microssatélites, confirmando a utilidade deste material como fonte de DNA para análises genéticas. No capítulo 2 é descrita a estrutura sociogenética intranidal com a utilização de locos microssatélites. A análise genética de ninhos de *Eg. cordata*, *Eg. townsendi* e *Eufriesea violacea* revelou que as progênes são explicadas pelo acasalamento monândrico da fêmea, o que vem corroborar dados da literatura. No capítulo 3, utilizando genes mitocondriais, são descritos os esforços para verificação da estrutura genética das populações de *Eg. cordata*. O sequenciamento dos genes mitocondriais *cyt b* e *COI* por produto direto de PCR exibiu elevada variação em vários sítios, apresentando dois picos numa mesma posição ou a não correspondência entre as fitas *forward* e *reverse*, sugerindo a ocorrência de heteroplasma. Foi, então, realizada a clonagem e nos clones foi detectada variação intraindividual nas sequências *cyt b* e *COI*, o que sugere a ocorrência associada de *numts* e de heteroplasma. A presença desta variação, cujo significado ainda está por ser completamente elucidado, não permitiu determinar a estrutura genética das populações urbanas de *Eg. cordata*, embora haja indícios de diferenciação interpopulacional para os haplótipos mitocondriais. Concluindo, este trabalho contribuiu para um maior entendimento da biologia da tribo Euglossini, do ponto de vista intranidal e populacional, com a utilização de ferramentas moleculares.

ABSTRACT

Euglossine bees (Hymenoptera: Apidae) are important pollinators in the Neotropical region. These bees are widely studied by collecting males in attractive baits, but there are few reports from females. In this work, we studied Euglossini bees using molecular tools, collecting bees in nests and adults in flowers at different levels, individual, nest and population. In Chapter 1, we use a non-lethal strategy for obtaining DNA from antenna conducting mark-recapture experiments. We found by a chi-square test the same chance to recapture the two groups of bees (with intact antennae vs removal antennae); this result suggests that the removal did not affect the survivor of bees. The DNA extracted from the antennas was successfully used for microsatellite analysis. In Chapter 2, we determine the sociogenetic structure of nests using microsatellite loci. Genetic analysis of *Euglossa cordata*, *Euglossa townsendi* and *Eufriesea violacea* nests revealed that brood is usually explained by a single mating, which corroborates the literature. In chapter 3, we used mitochondrial genes to verify the genetic structure of populations of *Eg. cordata*. The sequencing of mitochondrial genes *cyt b* and *COI* by direct PCR product showed high variation in several positions, showing two peaks or the mismatch between forward and reverse sequence. This result suggests the occurrence of heteroplasmy, and then, we have cloned these products. The clones showed even greater intra-individual variation, suggesting the occurrence of associated numts and heteroplasmy. Due to this variation, we could not establish the genetic structure of urban populations in *Eg. cordata*, although there is some evidence of interpopulation differentiation for mitochondrial haplotypes. In conclusion, this work has made contributions to a better understanding of the biology of Euglossine bees; employing molecular tools, we bring new information about familial and population genetics of this group of bees.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
3	CAPÍTULO 1: Método não letal de amostragem de DNA validado por experimento de marcação-recaptura.....	10
3.1	Resumo	10
3.2	Introdução.....	11
3.3	Material e Métodos	13
3.3.1	Área de estudo.....	13
3.3.2	Marcação dos indivíduos e coleta da antena.....	14
3.3.3	Análise das recapturas	15
3.3.4	Análise molecular.....	16
3.4	Resultados	16
3.5	Discussão.....	27
3.6	Referências Bibliográficas.....	31
3.7	Apêndice	35
4	CAPÍTULO 2: Genética intranidal de Euglossini determinada pela análise de microssatélites	40
4.1	Resumo	40
4.2	Introdução.....	41
4.3	Material e Métodos	42
4.4	Resultados	44
4.4.1	Ninhos de <i>Euglossa cordata</i>	44
4.4.2	Ninhos de <i>Euglossa townsendi</i>	45
4.4.3	Ninho de <i>Eufriesea violacea</i>	46
4.5	Discussão.....	47
4.6	Referências Bibliográficas.....	49
5	CAPÍTULO 3. A estrutura populacional de <i>Euglossa cordata</i> vista pela variação do DNA mitocondrial	51
5.1	Resumo	51
5.2	Introdução.....	52
5.3	Material e Métodos	53

5.3.1	A) Sequenciamento dos genes mitocondriais por produto direto de PCR.....	54
5.3.2	B) Sequenciamento dos genes mitocondriais por clonagem dos produtos de PCR.....	55
5.3.2.1	Reações de Amplificação	56
5.3.2.2	Purificação do PCR	56
5.3.2.3	Clonagem	57
5.3.2.4	Reações de Amplificação de M13	57
5.3.2.5	Sequenciamento dos insertos.....	58
5.3.2.6	Análise das sequências	58
5.4	Resultados	58
5.4.1	A) Sequenciamento dos genes mitocondriais por produto direto de PCR.....	58
5.4.2	B) Sequenciamento dos genes mitocondriais por clonagem dos produtos de PCR.....	64
5.5	Discussão.....	70
5.6	Referências Bibliográficas.....	74
5.7	Apêndice	77
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

Lista de Figuras

- Figura 1:** (a) Corbícula presente na fêmea de *Euglossa cordata* que serve para coleta de materiais para provisão de pólen. (b) Ausência de corbícula nos machos, que apresentam uma estrutura modificada.1
- Figura 2:** Cinco gêneros de abelhas Euglossini: (a) *Aglae caerulea*; (b) *Eufriesea lucifera*; (c) *Euglossa paisa*; (d) *Eulaema meriana*; (e) *Exaerete smaragdina*. Em (f), tíbia média no segundo par de pernas de *Eg. paisa*, caráter utilizado para identificação morfológica. (Extraído de Ramírez et al. 2010).2
- Figura 3:** Mapa da cidade de São Carlos. Em verde estão representadas praças e áreas verdes da cidade; em amarelo, os sítios de coleta. (BC: Bernardino de Campos; JB: José Benetti; K: Kartódromo; RB: Rui Barbosa e ME: Marginal Educativa).14
- Figura 4:** A) Árvore de *Thevetia peruviana* na calçada. B) Flor de *T. peruviana*. C) Flor de *T. peruviana* com *El. nigrita*.15
- Figura 5:** Retirada intercalada das antenas. As fotos mostram como foi realizada a retirada das antenas de *Eg. cordata*. As setas pretas indicam as antenas que foram seccionadas.15
- Figura 6:** Retirada intercalada das antenas. As fotos mostram como foi realizada a retirada das antenas de *El nigrita*. As setas pretas indicam as antenas que foram seccionadas.15
- Figura 7:** Número de dias decorridos após marcação para as recapturas de *Eg. cordata* nas três classes (antenas intactas, seccionadas e danificadas), considerando o dia em que a abelha foi recapturada pela última vez. O dia 0 representa as recapturas no mesmo dia.18
- Figura 8:** Número de recapturas em que um indivíduo marcado de *Eg. cordata* foi recapturado nas duas classes (antenas intactas e seccionadas). Não foram consideradas as recapturas no mesmo dia, apenas nos dias posteriores à marcação.19
- Figura 9:** Frequências dos alelos dos locos em machos e fêmeas de *Eg. cordata*, locos 17, 30b, 37 e 18.23
- Figura 10:** Frequências dos alelos dos locos em machos e fêmeas de *Eg. cordata*, locos 35, 51, 24, 26 e 30a.24

Figura 11: Frequências dos alelos dos locos em machos e fêmeas de <i>El. nigrita</i> , locos 1, 13, 12a, 12b, 2J e 10J.....	26
Figura 12: Frequências dos alelos dos locos em machos e fêmeas de <i>El. nigrita</i> , locos 5J, 12J, 7J, 18J, 19J.	27
Figura 13: Ninho do gênero <i>Eg. townsendi</i> coletado em ninho armadilhas de bambu na UFSCar	43
Figura 14: Ninhos de <i>Eg. townsendi</i> construídos em cavidades de bandeja de isopor de cultivo de mudas coletados na UFSCar.	43
Figura 15: Dois picos na posição 258 no sequenciamento do gene <i>cyt b</i> . Em vermelho, as fitas <i>reverse</i> ; em preto, as fitas <i>forward</i> , com o número do eletroferograma, número de extração e sigla da cidade correspondente (RIB - Ribeirão Preto, LEM - Leme, BER - Bertioga, RIF - Rifaina, PED - Pedregulho, SC - São Carlos, PIR – Piracicaba, JAB - Jaboticabal).....	59
Figura 16: Variações de bases entre as fitas <i>forward</i> e <i>reverse</i> do gene <i>cyt b</i> na mesma posição. Indicadas em vermelho as posições 168, 186 e 189. (A- Pedregulho, B- Rifaina, C- Ribeirão Preto, 1- fita <i>forward</i> , 2- fita <i>reverse</i>).	60
Figura 17: A) Posição 100 do sequenciamento do gene <i>cyt b</i> . Indicado em azul (1 e 2 clones; 3 produto de PCR do indivíduo 10317 de Piracicaba). B) Posição 262 do sequenciamento do gene <i>COI</i> . Indicado em azul (4 e 5 clones; 6 produto de PCR do indivíduo 9353 de Bertioga). F - <i>forward</i> ; R – <i>reverse</i>	66
Figura 18: Presença de um <i>indel</i> de oito pb em quatro sequências de clones no gene <i>COI</i> entre as posições 158 e 165. Os números são referentes aos clones de cada indivíduo (1 – 7910; 2 – 9490; 3 – 9523; 4 – 10270).	67
Figura 19: Eletroferograma de três clones do indivíduo 7910. Clone A, C e D. Em vermelho estão destacadas as bases que estão faltando na sequência do clone C. (1 – <i>forward</i> ; 2 – <i>reverse</i>).	68
Figura 20: Árvore por Neighbor-Joining dos clones corrigidos do gene <i>cyt b</i> e <i>COI</i> .	69
Figura 21: Árvore filogenética obtida a partir da sequência de aminoácidos dos clones de partes do gene <i>cyt b</i> e do gene <i>COI</i>	70

Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Informação geográfica dos sítios de coleta na cidade de São Carlos. 13
- Tabela 2:** Número de indivíduos marcados e recapturados e suas características quanto às antenas (NR: não recapturados e R: recapturados) das espécies *Eg. cordata* e *El. nigrita*. Entre parênteses, as recapturas ocorridas no mesmo dia e nos dias posteriores. 17
- Tabela 3:** Data entre a marcação e a última recaptura para *Eg. cordata*. (EC – *Euglossa cordata*; F – fêmea; r – recaptura). A coluna Período r. indica os dias após marcação em que as abelhas foram recapturadas. 18
- Tabela 4:** Número de indivíduos de *Eg. cordata* quanto à proporção sexual e suas características quanto às antenas (NR: não recapturados e R: recapturados). Entre parênteses, as recapturas ocorridas no mesmo dia e em dias posteriores. 20
- Tabela 5:** Número de indivíduos de *El. nigrita* quanto à proporção sexual e suas características quanto às antenas (NR: não recapturados; R: recapturados). Entre parênteses, as recapturas ocorridas no mesmo dia e dias posteriores. 20
- Tabela 6:** Estimativas de número de alelos, heterozigosidade esperada e observada para os locos microssatélites (17, 18, 30b, 35, 51, 24, 26, 30a e 37) em fêmeas da população de *Eg. cordata* de São Carlos. (N: número de indivíduos analisados; Na: número de alelos; Nae: número efetivo de alelos; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada). 21
- Tabela 7:** Verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os locos microssatélites (17, 18, 30b, 35, 51, 24, 26, 30a e 37) em fêmeas de *Eg. cordata* da população de São Carlos (ns: não significativo para $\alpha = 0,05$). 22
- Tabela 8:** Estimativa do número de alelos, heterozigosidade esperada e observada para os locos microssatélites (1, 12a, 12b, 13, 2J, 5J, 7J, 10J, 12J, 18J e 19J) na população de fêmeas de *El. nigrita* de São Carlos (N: número de indivíduos analisados; Na: número de alelos diferentes; Nae: número de alelos efetivos; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada). 25

Tabela 9: Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os locos microssatélites (1, 12a, 12b, 13, 2J, 5J, 7J, 10J, 12J, 18J e 19J) na população de São Carlos para fêmeas de <i>El. nigrita</i> (ns: não significativo $\alpha = 0,05$).	25
Tabela 10: Ninhos de Euglossini coletados (*ninhos em que a suposta mãe foi capturada).	43
Tabela 11: Segregação dos alelos no ninho X1 de <i>Eg. cordata</i> para os locos microssatélites (17, 18, 30b, 35, 51, 24, 26, 30a e 37). Destacadas em cinza estão as fêmeas que se encontravam presas na resina e que não são aparentadas aos demais indivíduos do ninho (F – fêmea; M – macho).	45
Tabela 12: Número de pais e mães responsáveis pela progênie e número de filhos e filhas analisados. A coluna intitulada “Extra” indica as fêmeas que estavam presas na resina dentro dos ninhos (*certificada a presença da mãe).	46
Tabela 13: Informação geográfica dos sítios de coleta.....	54
Tabela 14: Número de indivíduos, com a respectiva procedência geográfica, que tiveram seus genes mitocondriais <i>cyt b</i> e <i>COI</i> sequenciados.	58
Tabela 15: Código de bases degeneradas IUB.	60
Tabela 16: Sítios variáveis no fragmento do gene <i>cyt b</i> de dois indivíduos de cada população de <i>Eg. cordata</i> . (RIF: Rifaina; PED: Pedregulho; FRA: Franca; RIB: Ribeirão Preto; JAB: Jaboticabal; ARA: Araraquara; SC: São Carlos; LEM: Leme; PIR: Piracicaba; BER: Bertioga).....	61
Tabela 17: Sítios variáveis no fragmento do gene <i>COI</i> de dois indivíduos de cada população de <i>Eg. cordata</i> . (SC: São Carlos; RIF: Rifaina; PED: Pedregulho; JAB: Jaboticabal; LEM: Leme; ARA: Araraquara; PIR: Piracicaba; RC: Rio Claro; RIB: Ribeirão Preto; FRA: Franca; BER: Bertioga).....	61
Tabela 18: Posição no códon da variação para o gene <i>cyt b</i> nas posições.	62
Tabela 19: Posição no códon da variação para o gene <i>COI</i> nas posições.....	63
Tabela 20: Relação dos indivíduos e número de clones sequenciados para o gene <i>cyt b</i>	64
Tabela 21: Relação dos indivíduos e número de clones sequenciados para o gene <i>COI</i>	65

Tabela 22: Quantidade de clones sequenciados e número de haplótipos gerados..67

Lista de Apêndices

- Apêndice 1:** Frequências alélicas estimadas para os locos microssatélites (17, 18, 30b, 35, 51, 24, 26, 30a e 37) na população de *Eg. cordata* de São Carlos (N: número de indivíduos analisados).....35
- Apêndice 2:** Frequências alélicas estimadas para os locos microssatélites (1, 12a, 12b, 13, 2J, 5J, 7J, 10J, 12J, 18J e 19J) na população de *El. nigrita* de São Carlos (N: número de indivíduos analisados).....37
- Apêndice 3:** Parte do gene *cyt b* sequenciado e traduzido. Está alinhada a sequência de *Apis mellifera* (NC_001566.1) correspondente à porção do gene sequenciado. O gene *cyt b* esta representado com bases degeneradas pelo código IUB. Na sequência traduzida, X representa os códons sem o aminoácido correspondente devido à variação encontrada.77
- Apêndice 4:** Parte do gene *COI* sequenciado e traduzido. Está alinhada a sequência de *Apis mellifera* (NC_001566.1) correspondente à porção do gene sequenciado. O gene *COI* está representado com as bases degeneradas segundo o código IUB. Na sequência traduzida, X representa os códon sem o aminoácido correspondente devido à variação encontrada.....78

1 INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, populações de muitas espécies de polinizadores estão em declínio e há uma preocupação por parte dos pesquisadores em entender as causas e, assim, propor possíveis soluções para este problema, já que os serviços de polinização são essenciais para a conservação da biodiversidade e produtividade das culturas agrícolas (Allen-Wardell *et al.* 1998). Este declínio deve-se em parte à fragmentação de habitats, utilização de defensivos agrícolas e introdução de espécies exóticas (Kearns *et al.* 1998). Por esta razão, o entendimento da ecologia das espécies de polinizadores é necessário para o desenvolvimento de formas apropriadas para seu manejo e conservação (Knight *et al.* 2005).

As abelhas da tribo Euglossini (Hymenoptera: Apidae) são polinizadores importantes da região Neotropical e caracterizam-se por apresentarem cores metálicas e por possuírem línguas compridas que podem exceder o tamanho do corpo (Dressler 1982). Estão distribuídas nas Américas, desde o estado da Flórida nos EUA até o centro da Argentina, sendo mais abundantes em regiões de baixas altitudes e latitudes (Skov & Wiley 2005; Roubik & Hanson 2004). Juntamente com as abelhas de mel, as abelhas sem ferrão e as mamangavas, fazem parte das abelhas corbiculadas (Figura 1), sendo as únicas deste grupo que não apresentam comportamento social avançado, apresentando estágios intermediários (Dressler 1982) com o compartilhamento de ninhos por fêmeas (Augusto & Garófalo 2009; Otero *et al.* 2008).

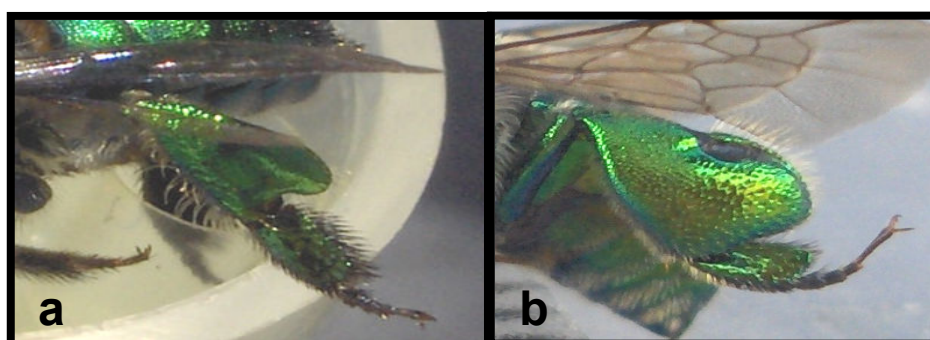


Figura 1: (a) Corbícula presente na fêmea de *Euglossa cordata* que serve para coleta de materiais para provisionamento de pólen. (b) Ausência de corbícula nos machos, que apresentam uma estrutura modificada.

A tribo Euglossini contém cerca de 200 espécies distribuídas em cinco gêneros: *Euglossa*, *Eufriesea*, *Eulaema*, *Exaerete* e *Aglae*, sendo os dois últimos cleptoparasitas de outras Euglossini (Figura 2). O gênero *Euglossa*, com o maior número de espécies, é constituído de abelhas de pequeno porte em relação às outras e de cores metálicas brilhantes. As abelhas do gênero *Eufriesea*, o segundo maior em número de espécies, são maiores que as *Euglossa* e, muitas vezes, apresentam mimetismo com o gênero *Eulaema*. O gênero *Eulaema* é constituído de abelhas de maior tamanho, com coloração preta e faixas amarelas em algumas espécies (Cameron 2004).

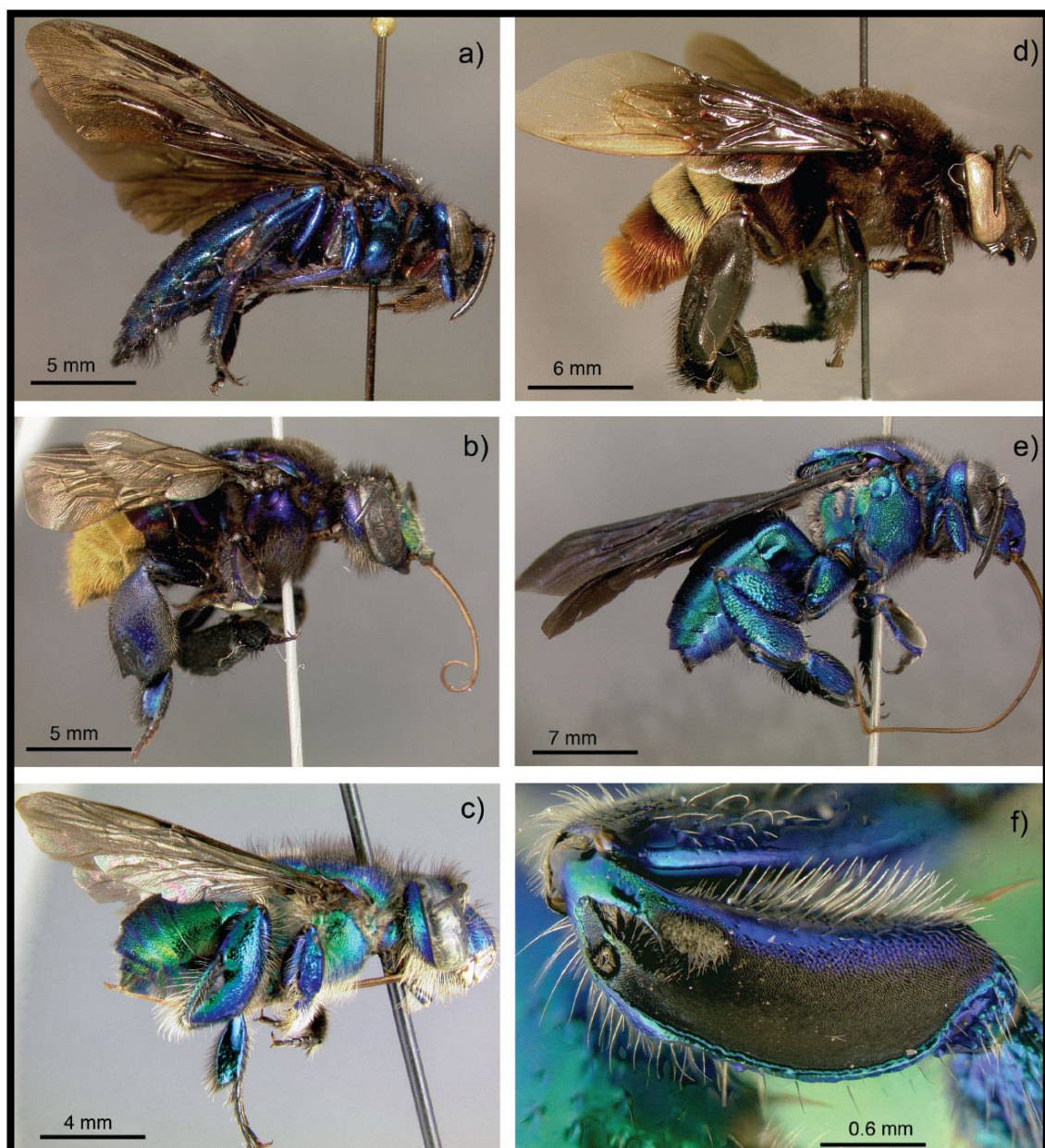


Figura 2: Cinco gêneros de abelhas Euglossini: (a) *Aglae caerulea*; (b) *Eufriesea lucifera*; (c) *Euglossa paisa*; (d) *Eulaema meriana*; (e) *Exaerete smaragdina*. Em (f), tibia média no segundo par

de pernas de *Eg. paisa*, caráter utilizado para identificação morfológica. (Extraído de Ramírez *et al.* 2010).

As abelhas Euglossini são polinizadores específicos de algumas espécies de orquídeas; por isso, são conhecidas popularmente como “abelhas das orquídeas”. Entre as espécies de orquídeas visitadas estão as da subfamília Cymbidieae (Schiestl & Schlüter 2009), como, por exemplo, as espécies de gênero *Catasetum* (Ramírez *et al.* 2002). No entanto, elas visitam também outras espécies de plantas das famílias Apocynaceae, Bignoniaceae, Araceae, Bromeliaceae, Liliaceae, Leguminosae, Zingiberaceae, Marantaceae e Rubiaceae, constituindo importante componente biótico de ecossistemas neotropicais (Dodson 1966). A polinização das orquídeas realizada pelos machos destas abelhas está relacionada a um sistema de recompensa por fragrâncias (“*scent reward*”) ou então, a polinização ocorre quando a abelha é enganada (“*deceptive pollination*”) ao ser atraída quando está em busca de parceiros ou quando está à procura do ninho (Schiestl & Schlüter 2009). Estas fragrâncias que atraem as abelhas Euglossini foram purificadas em laboratório (Dodson *et al.* 1969), o que possibilitou a coleta de machos a partir de iscas odores e, como consequência, um maior conhecimento da biologia da tribo.

Embora haja uma grande praticidade para a coleta de machos, a não atratividade de fêmeas pelos compostos químicos faz com que haja poucos estudos realizados com fêmeas. A identificação morfológica das fêmeas é dificultada por existirem poucas chaves de identificação para elas (Nemésio 2009), o que exige, então, o uso de ferramentas moleculares. Fêmeas de espécies de *Euglossa* foram identificadas a partir de padrões alozímicos e de restrição do DNA mitocondrial (López-Urbe & Del Lama 2007), utilizando machos previamente identificados para tais padrões como controle. Segundo Michener (1974), o comportamento de fêmeas e machos apresenta diferenças, pois fêmeas mantêm relações restritas com grupos particulares de angiospermas para coletar néctar, pólen e resina para nidificação. Elas são forrageadoras do tipo central, pois são obrigadas a voltar para o ninho depois da atividade de forrageio para aprovisionar as células com alimento. Ao contrário, os machos são exclusivamente atraídos por algumas fragrâncias florais e néctar e podem forragear a grandes distâncias, como reporta Janzen (1971), que recapturou uma fêmea que retornou ao ninho no mesmo dia a 23 km do local onde foi marcada e libertada.

Para obter dados mais confiáveis sobre a comunidade de abelhas de uma determinada área é aconselhável a obtenção de informações a partir de flores e ninhos (Rebêlo & Garófalo 1997). Porém, a biologia de nidificação das abelhas Euglossini é outro aspecto da biologia do grupo ainda pouco explorado, considerando o número de espécies descritas (Ramírez *et al.* 2002). Este desconhecimento é, em parte, devido a que os ninhos de Euglossini são dificilmente encontrados na natureza (Cameron 2004), já que essas abelhas utilizam cavidades pré-existentes (Santos & Garófalo 1994). No gênero *Euglossa* já foram encontrados ninhos em partes altas de árvores (Eberhard 1988; Ramírez-Arriaga *et al.* 1996) e também no solo (Dressler 1982). Os materiais utilizados para a construção das células são principalmente barro, fezes e resina (Dressler 1982).

Como algumas destas espécies utilizam cavidades pré-existentes, é possível também obter ninhos de espécies de Euglossini por meio da utilização de ninhos-armadilha. Esses ninhos podem ser obtidos na natureza e mantidos em caixas de madeira ou podem ser disponibilizados gomos de bambus para nidificação. Alguns estudos com ninhos-armadilha revelaram que as fêmeas, após escolherem um local adequado, iniciam a construção com a coleta de materiais que serão utilizados na confecção das células de cria (Garófalo 1992; Garófalo 1994; Santos & Garófalo 1994). Após a construção dessa célula, as fêmeas vão à procura de alimento, pólen e néctar, e só após ovipositam. Pode ocorrer reutilização de local, ou mesmo de material de provisionamento por outras abelhas (Garófalo 1985), ou ainda o compartilhamento do ninho com outras fêmeas, estabelecendo-se interações ou entre irmãs, ou mãe-filha ou entre fêmeas não relacionadas (Augusto & Garófalo 2004). Conhecer o parentesco genético intranidal pode contribuir para esclarecer as relações de compartilhamento de ninhos e definir as diferentes relações sociais que ocorrem na tribo Euglossini. Dados recentes obtidos em nosso laboratório sobre os ninhos de *Eg. cordata*, *El. nigrita* e *Eg. townsendi* coletados nas cidades de Araras, Rifaina e São Carlos revelaram que, no início da construção do ninho de *El. nigrita*, detecta-se inicialmente apenas a postura de uma fêmea, para, na sequência, observar-se a postura de outras fêmeas. Em *Eg. cordata* e *Eg. townsendi*, os ninhos encontrados geralmente foram fundados por uma fêmea, acasalada com apenas um macho (Souza 2007). A análise genética das relações intranidais possibilita

responder questões como o número de fêmeas e machos responsáveis pela cria, assim como as relações de parentesco resultantes destas interações.

É necessário lembrar que a coleta dos ninhos é um dos aspectos que deve ser considerado para o estabelecimento da razão sexual em espécies da tribo. Outro método que pode auxiliar nessa determinação é o de coleta em flores (López-Uribe *et al.* 2008). Confrontando os dados da literatura sobre razão sexual (RS) em ninhos com os dados obtidos em flores de *Thevetia peruviana*, razões sexuais diferentes foram observadas. Em *Eg. cordata*, *Ef. violacens* e *Ex. smaragdina*, observou-se maior proporção de fêmeas capturadas em relação aos machos nas flores. Dentre cinco ninhos completos de *Eg. cordata*, três apresentaram desvio para fêmeas e dois desvio da RS para machos, porém o número total foi de 19 fêmeas para 17 machos (Garófalo 1992). Quanto a *Ex. smaragdina*, foram capturados apenas três indivíduos, sendo duas fêmeas e um macho. Em *Ef. violacea*, em 17 ninhos foi encontrada razão sexual desviada para machos obtidos 131 machos e 59 fêmeas (Peruquetti & Campos 1997). Em oito ninhos de *El. nigrita* coletados, dentre as 248 células totais do ninho, emergiram cinco fêmeas de *Ex. smaragdina* e nenhum macho, lembrando que esta espécie é cleptoparasita (Souza 2007). Em *El. nigrita*, a razão sexual nas flores de *T. peruviana* encontrada foi 1:1 (López-Uribe *et al.* 2008), o que contrasta com o descrito para ninhos de *El. nigrita*, nos quais foi verificado ora maior proporção de fêmeas (Pereira-Martins & Kerr 1991; Santos & Garófalo 1994), ora maior proporção de machos nos ninhos coletados (Souza 2007).

Devido à ausência de informações sobre vários aspectos ecológicos e comportamentais da tribo Euglossini, o presente trabalho teve por objetivo estudar as abelhas euglossíneas com o uso de ferramentas moleculares no nível do indivíduo, família e população. Para isso, foi desenvolvida uma estratégia não letal para a obtenção de DNA e duas ferramentas moleculares foram utilizadas, microssatélites para análise de parentesco intranidal e DNA mitocondrial e microssatélites para verificar a estrutura genética das populações.

A presente dissertação está apresentada em três capítulos distintos para facilitar a apresentação dos resultados, já que estes se referem a questões ecológicas e genéticas diferentes.

O capítulo 1 descreve a partir de experimentos de marcação e recaptura um método não-letal de extração de DNA por meio da retirada de parte de uma antena dos adultos de *Eg. cordata* e *El. nigrita*. Assim, foram realizados experimentos de

marcação e recaptura a fim de verificar se a taxa de recaptura das abelhas que tiveram a antena seccionada era semelhante à de abelhas que tiveram suas antenas mantidas intactas. Após os experimentos de marcação e recaptura, todas as antenas coletadas foram analisadas utilizando microssatélites para verificar se era possível realizar análises populacionais utilizando este procedimento de amostragem de DNA.

O capítulo 2 descreve a análise genética de ninhos coletados de abelhas Euglossini. Conhecer o modo de acasalamento das abelhas da tribo Euglossini pode elucidar questões referentes à origem da eussocialidade em certos grupos de himenópteros, já que esta é a única tribo da família Apidae que não apresenta comportamento social avançado. Dados da literatura indicam que no gênero *Euglossa*, o ninho geralmente é formado a partir de um acasalamento simples entre um macho e uma fêmea (Zimmermann *et al.* 2009).

O capítulo 3 descreve a análise genética por meio de marcadores mitocondriais de populações de *Eg. cordata* provenientes de várias localidades do estado de São Paulo. As observações de ninho indicam que as fêmeas do gênero *Euglossa* apresentam um comportamento filopátrico, uma vez que retornam ao ninho para reativá-lo ou para compartilhá-lo com a mãe ou irmãs (Zimmermann *et al.* 2009). Como marcadores nucleares indicaram ausência de estruturação genética destas populações (Cerântola *et al.* 2010), é possível que marcadores mitocondriais indiquem uma alta estruturação destas populações, devido ao mecanismo de herança do DNA mitocondrial.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen-Wardell, G.; P. Bernhardt; R. Bitner; A. Búrquez; S. Buchmann; J. Cane; P. A. Cox; V. Dalton; P. Feinsinger & M. Ingram (1998). The potential consequences of pollinator decline on the conservation of biodiversity and stability of food crops yields. *Conservation Biology* 12: 8-17.
- Augusto, S. C. & C. A. Garófalo (2004). Nesting biology and social structure of *Euglossa (Euglossa) townsendi* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Insectes Sociaux* 51: 400-409.
- Augusto, S. C. & C. A. Garófalo (2004). Nesting biology and social structure of *Euglossa (Euglossa) townsendi* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Insectes Sociaux* 51: 400-409.
- Cameron, S. A. (2004). Phylogeny and biology of neotropical orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Entomology* 49: 377-404.
- Cerântola, N. C. M.; C. A. Oi; M. Cervini & M. A. Del Lama (2010). Genetic differentiation of urban populations of *Euglossa cordata* Linnaeus 1758 from the state of São Paulo, Brazil. *Apidologie* (no prelo).
- Dodson, C. H. (1966). Ethology of some bees of the tribe Euglossini (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 39: 607-629.
- Dodson, C. H.; R. L. Dressler; H. G. Hills; R. M. Adams & N. H. Williams. (1969) Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science* 164: 1243-1249.
- Dressler, R. L. (1982). Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 373-392.
- Eberhard, W. G. (1988). Group nesting in two species of *Euglossa* bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 61(4): 406-411.
- Garófalo, C. A. (1985). Social structure of *Euglossa cordata* nests (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Entomologia Generalis* 11: 77-83.
- Garófalo, C. A. (1992). Comportamento de nidificação e estrutura de ninhos de *Euglossa cordata* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Revista Brasileira de Biologia* 52 (1): 187-198.
- Garófalo, C. A. (1994). Biologia de nidificação dos Euglossinae (Hymenoptera, Apidae). *Anais I do Encontro sobre Abelhas*, Ribeirão Preto 1:17-26.
- Janzen, D. H. (1971). Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. *Science* 171: 203-205.

- Kearns, C. A.; D. W. Inouye & N. M. Waser (1998). Endangered mutualism: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 83-112.
- Knight, M. E.; A. P. Martin; S. Bishop; J. L. Osbourne; R. J. Hale; R. A. Sanderson & D. Goulson (2005). An interspecific comparison of foraging range and nest density of four bumblebee (*Bombus*) species. *Molecular Ecology* 14: 1811-1820.
- López-Urbe, M. M. & M. A. Del Lama (2007). Molecular identification of females of *Euglossa* spp. Latreille (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) floral visitors of *Thevetia peruviana* (Apocynaceae) in urban areas. *Neotropical Entomology* 36 (5): 712-720.
- López-Urbe, M. M.; C. A. Oi & M. A. Del Lama (2008). Nectar-foraging behaviour of Euglossine bees (Hymenoptera: Apidae) in urban areas. *Apidologie* 39: 410-418.
- Michener, C. D. (1974). *The Social Behaviour of the Bees. A Comparative Study*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass. 404p.
- Nemésio, A. (2009). Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of the Brazilian Atlantic Forest. *Zootaxa* 2041: 1-242.
- Otero, J. T.; P. Ulloa-Chacón; P. Silverstone-Sopkin & T. Giray (2008). Grouping nesting and individual variation in behavior and physiology in the orchid bee *Euglossa nigropilosa* Moure (Hymenoptera, Apidae). *Insectes Sociaux* 55: 320-328.
- Pereira-Martins, S. R. & W. E. Kerr (1991). Biología de *Eulaema nigrita*. 1. Construção de células, oviposição e desenvolvimento. *Papéis Avulsos de Zoologia* 37 (13): 227-235.
- Peruquetti, R. C. & L. A. O. Campos (1997). Aspectos da biología de *Euplusia violacea* (Blanchard) (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Revista Brasileira de Zoologia* 14 (1): 91-97.
- Ramírez, S.; R. L. Dressler & M. Ospina (2002). Abejas euglossinas (Hymenoptera: Apidae) de la Región Neotropical: Listado de especies con notas sobre su biología. *Biota Colombiana* 3 (1): 7-118.
- Ramírez-Arriaga, E.; J. I. Cuadrielo-Aguilar & E. Martínez-Hernández (1996). Nest structure and parasite of *Euglossa atroveneta* Dressler (Apidae: Bombinae: Euglossini) at Union Juárez, Chiapas, Mexico. *Journal of the Kansas Entomological Society* 69: 144-152.
- Ramírez, S.; D. W. Roubik; C. Skov & N. E. Pierce (2010). Phylogeny, diversification patterns and historical biogeography of euglossine orchid bees (Hymenoptera: Apidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 100: 552-572.

- Rebêlo, J. M. M. & C. A. Garófalo (1997). Comunidades de machos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em matas semidecíduas do Nordeste de Estado de São Paulo. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 26 (2): 243-255.
- Roubik, D. W. & P. E. Hanson (2004). *Orchid bees of tropical America. Biology and field guide*. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica, Instituto Nacional de Biodiversidade (INBio), 370p.
- Santos, M. L. & C. A. Garófalo (1994). Nesting biology and nest re-use of *Eulaema nigrita* (Hymenoptera: Apidae, Euglossini). *Insectes Sociaux* 41: 99-110.
- Schiestl F. P. & P. M. Schlüter (2009). Floral isolation, specialized pollination, and pollinator behaviour in orchids. *Annual Review of Entomology* 54: 425-446.
- Skov, C. & J. Wiley (2005). Establishment of the neotropical orchid bee *Euglossa viridissima* (Hymenoptera: Apidae) in Florida. *Florida Entomologist* 88 (2): 225-227.
- Souza, R. O. (2007). Estrutura genética e sociogenética das populações e ninhos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) determinadas por meio de microssatélites. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 78 p.
- Zimmermann, Y.; D. W. Roubik; J. J. G. Quezada-Euan; R. J. Paxton & T. Eltz (2009). Single mating in orchid bees (*Euglossa*, Apinae): implications for mate choice and social evolution. *Insectes Sociaux* 56 (3): 241-249.

3 CAPÍTULO 1: Método não letal de amostragem de DNA validado por experimento de marcação-recaptura.

3.1 Resumo

Para a realização de análises genéticas, os métodos não-letais e não invasivos são de grande interesse, visto que não causam a diminuição dos indivíduos de uma população, alterando o tamanho da população futura ou mesmo sua estrutura genética. Com este objetivo é proposto um método não letal de amostragem de DNA em abelhas Euglossini a partir da realização de experimentos de marcação e recaptura. As espécies *Euglossa cordata* e *Eulaema nigrita* foram capturadas e marcadas em áreas urbanas em flores de *Thevetia peruviana*. Um total de 427 indivíduos de *Eg. cordata* foram marcados, dos quais 127 foram recapturados e 141 indivíduos de *El. nigrita*, dos quais 23 indivíduos foram recapturados. O teste de qui-quadrado foi aplicado para verificar se havia diferença entre as recapturas dos indivíduos com antenas intactas e dos indivíduos que tiveram a antena seccionada. Nas duas espécies foi demonstrada igual chance de recaptura nos dois grupos (antenas intactas vs. antenas seccionadas) - em *Eg. cordata* ($\chi^2 = 2,492$, $P = 0,114$), em *El. nigrita* ($\chi^2 = 1,683$, $P = 0,194$). As antenas retiradas foram amplificadas com sucesso para os locos microssatélites. A população de cada espécie amostrada na cidade de São Carlos demonstrou grande variabilidade genética e as amostras de machos mostraram-se geneticamente homogêneas às amostras de fêmeas. Os resultados indicam a viabilidade de se utilizar as antenas como fonte de DNA para análises genéticas.

3.2 Introdução

Atualmente, as análises genéticas de populações são possíveis graças ao uso de ferramentas moleculares, contribuindo para o avanço da biologia da conservação (Awise 2004). Basicamente, a análise molecular inicia-se com a coleta de material biológico para a extração de DNA. Usualmente, três métodos são amplamente utilizados para esta extração: o destrutivo, no qual há necessidade de sacrificar o animal para a análise genética; o não destrutivo e/ou não-letal, em que o animal é manipulado e alguma amostra do seu corpo é retirada, e o não-invasivo, no qual o animal não é manipulado e a amostragem é feita sem que o mesmo seja perturbado como, por exemplo, na coleta de penas e fezes (Taberlet *et al.* 1999).

Os métodos não-letais e não invasivos são de grande interesse para estudos genéticos em vários organismos como, por exemplo, em mamíferos (Chaves *et al.* 2006; Valière *et al.* 2007), aves (Horváth *et al.* 2005), peixes (Wasko *et al.* 2003) e insetos (Holehouse *et al.* 2003). Para tanto, há uma preocupação por parte dos pesquisadores para que não haja a necessidade do sacrifício do animal, uma vez que a diminuição de indivíduos numa população pode alterar o tamanho da população futura ou mesmo sua estrutura genética (Starks & Peters 2002).

Dentre os artrópodes, apesar do grande tamanho populacional, alguns estudos se preocupam em obter amostras de DNA sem sacrificar o animal. Em estudos com borboletas *Parnassius apollo*, foi retirada uma porção das asas como método não-letal de amostragem de DNA, reforçando a confiança nos marcadores moleculares para estudos demográficos sem pôr em risco a população de borboletas (Lushai *et al.* 2000). Outras espécies de borboletas, *Vanessa cardui* e *Satyrodes eurydice*, foram estudadas por Hamm *et al.* (2010) a partir de um método não-letal de DNA pela remoção de pequena porção da asa, observando ainda o possível impacto da técnica em campo sobre a sobrevivência destas borboletas. Além das asas, Vila *et al.* (2009) testaram amostras da perna média da mariposa (*moth*) *Graellsia isabellae* e obtiveram tanto em qualidade como em quantidade boas amostras de DNA; no entanto, os autores recomendaram a utilização das asas (*wings-tail clipping*), já que esta estratégia não produziu efeito negativo na sobrevivência e reprodução dos machos.

Em himenópteros com colônias sociais que apresentam um grande número de indivíduos, é possível retirar alguns indivíduos, por exemplo, operárias e/ou

indivíduos inférteis para análises genéticas sem prejudicar o funcionamento da colônia (Holehouse *et al.* 2003). Em “*bumblebees*” ou mamangavas, foi demonstrada que a retirada dos tarsos da perna média e da última perna não reduzia significativamente a sobrevivência das operárias (Holehouse *et al.* 2003). Em vespas do gênero *Polistes* (*P. dominulus* e *P. fuscatus*) a retirada da porção distal de uma única perna permitiu a obtenção de bons resultados para microssatélites e, apesar do tempo de sobrevivência destas operárias ter sido menor, o comportamento apresentado por elas aparentemente continuou normal (Starks & Peters 2002). Em *Apis mellifera*, Châline *et al.* (2004) propuseram um método não-letal para obter amostras de DNA de pequenas porções das asas “*wing tips*”, procedimento também utilizado por Bouga *et al.* (2005) para discriminar subespécies de abelhas de mel da Grécia.

As abelhas Euglossini, que se agrupam entre as abelhas corbiculadas (Cameron 2004), são importantes polinizadores de angiospermas e polinizadores específicos de algumas Orchidaceae (Dresser 1982). Algumas espécies apresentam níveis de socialidade (Garófalo 1985; Pereira-Martins & Kerr 1991; Augusto & Garófalo 2004; Soucy *et al.* 2003) e têm sido frequentemente estudadas pela sua facilidade na captura por iscas-armadilha (Morato 1994, Rebêlo & Garófalo 1997, Peruquetti *et al.* 1999, Brito & Rêgo 2001, Roubik 2001, Tonhasca *et al.* 2003). Geralmente, os estudos genéticos com essas abelhas são realizados com extração do DNA a partir do tórax do animal (Michel-Salzat *et al.* 2004) sendo, portanto, letal ao animal. A maioria dos trabalhos realizados com as abelhas da tribo Euglossini trata de questões ecológicas, sendo de grande relevância a associação do estudo ecológico com o genético, a fim de melhor responder às questões sobre a biologia destes insetos. Esta tribo não apresenta o comportamento social avançado comum entre as abelhas corbiculadas; portanto, não se pode amostrar operárias e nem retirar tarsos das pernas, já que estas estruturas são utilizadas para atividades de forrageamento (Holehouse *et al.* 2003).

Em experimentos de marcação-recaptura em áreas urbanas (López-Uribe *et al.* 2008), foi observado que alguns adultos de *Euglossa cordata* e *Eulaema nigrita* apresentavam uma ou as duas antenas parcial ou totalmente ausentes. Essas observações sugeriram que a falta de parte ou de uma antena completa poderia não afetar diretamente a sobrevivência desses insetos.

Para testar esta hipótese, o presente trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos: i) estimar a taxa de recaptura de abelhas marcadas que tiveram parte de uma antena seccionada e as abelhas cujas antenas foram deixadas intactas, a fim de propor um método não-destrutivo e não-letal para coleta de DNA em abelhas Euglossini; ii) verificar se o fragmento de antena retirado era suficiente para obter DNA com qualidade e quantidade suficiente para permitir análise de locos microsatélites; iii) a partir das antenas retiradas, estudar a genética da população de *Euglossa cordata* da cidade de São Carlos, dando especial atenção à verificação de possíveis diferenças genéticas entre as amostras de machos e fêmeas.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Área de estudo

A cidade de São Carlos está localizada na região central do estado de São Paulo (Brasil), entre 21°30'S 47°30'W e 22°30'S 48°30'W com altitude média de 856 m (<http://www.cppse.embrapa.br/a-unidade>). O clima da cidade é caracterizado por verão úmido e inverno seco, com temperatura média de 21,03°C ($\pm 2,3$) e precipitação média de 1400 mm. A vegetação nativa desta área era principalmente composta por cerrado, cerradão, floresta semidecídua e mata ripária (Soares *et al.* 2003). Cinco sítios de coleta foram amostrados na cidade em árvores que se localizavam em calçadas da área urbana (Tabela 1, Tabela 3). A planta *Thevetia peruviana* (Apocynaceae) parece ser uma importante fonte de néctar para as abelhas Euglossini (López-Uribe & Del Lama 2007).

Tabela 1: Informação geográfica dos sítios de coleta na cidade de São Carlos.

Sítios de coleta	Código	Latitude	Longitude
Bernardino de Campos	BC	22°01'31,9"S	47°53'59,9"W
José Benetti	JB	22°01'35,4"S	47°54'05,7"W
Kartódromo	K	21°59'58,4"S	47°53'55,2"W
Marginal	M	22°01'26,0"S	47°52'49,0"W
Rui Barbosa	RB	22°00'20,9"S	47°53'11,8"W

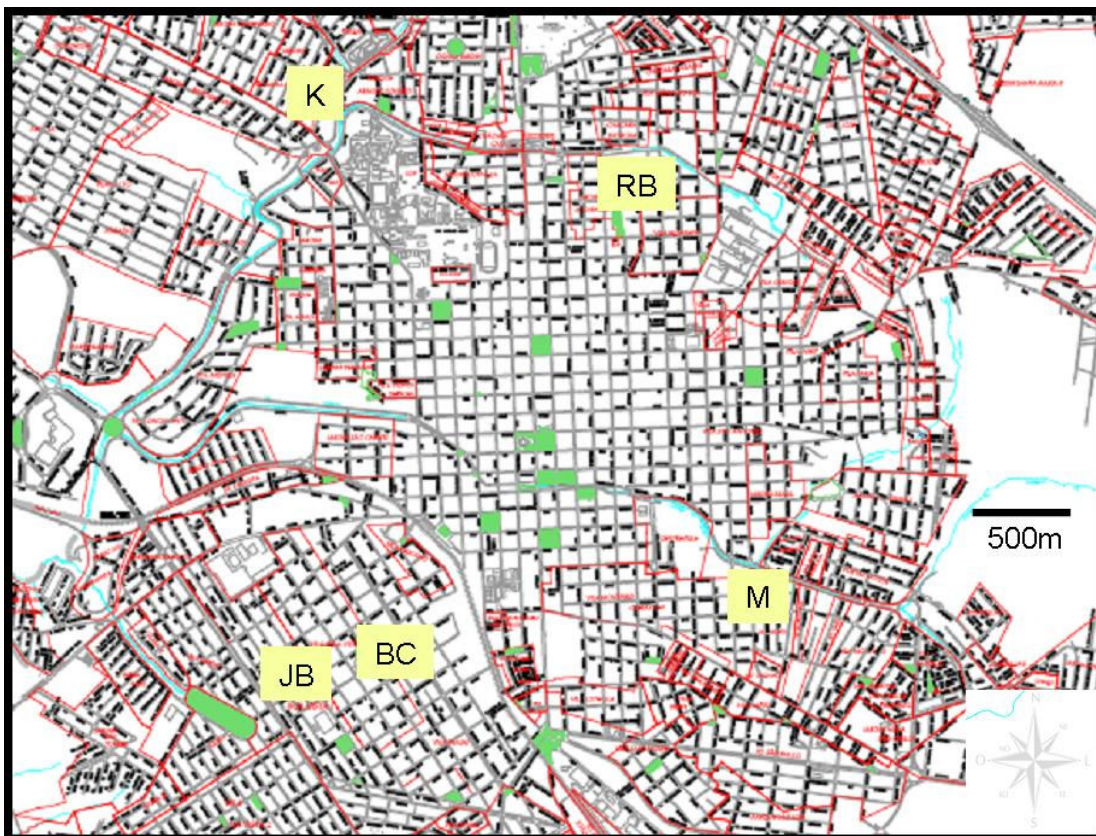


Figura 3: Mapa da cidade de São Carlos. Em verde estão representadas praças e áreas verdes da cidade; em amarelo, os sítios de coleta. (BC: Bernardino de Campos; JB: José Benetti; K: Kartódromo; RB: Rui Barbosa e ME: Marginal Educativa).

3.3.2 Marcação dos indivíduos e coleta da antena

As coletas foram realizadas uma vez por semana, pelo menos, no período de fevereiro/2006 a abril/2007, e nos meses de maio/2007 e junho/2007 foi realizada apenas uma coleta por semana. As abelhas foram coletadas em sacos plásticos ao visitarem as flores de *T. peruviana* (Figura 4). Uma vez capturadas, foram colocadas no gelo por 3 min, até atingirem estado de torpor. Em seguida, foi colada uma etiqueta sobre o tórax da abelha. Cada etiqueta tem cor e número próprios, o que permitiu a identificação de cada indivíduo capturado. Foram registrados a data, local, hora e sexo de cada indivíduo capturado. Durante as coletas foi intercalada a retirada de metade de uma das antenas de *Eg. cordata* (Figura 5) e de *El. nigrita* (Figura 6): em uma abelha, a antena era seccionada; na seguinte, ela era deixada intacta (exceto indivíduos que foram coletados já com antenas danificadas).



Figura 4: A) Árvore de *Thevetia peruviana* na calçada. B) Flor de *T. peruviana*. C) Flor de *T. peruviana* com *El. nigrita*.

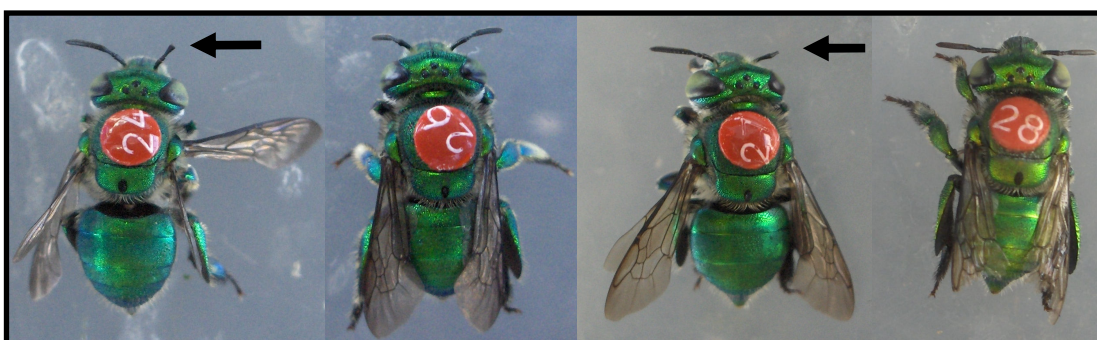


Figura 5: Retirada intercalada das antenas. As fotos mostram como foi realizada a retirada das antenas de *Eg. cordata*. As setas pretas indicam as antenas que foram seccionadas.

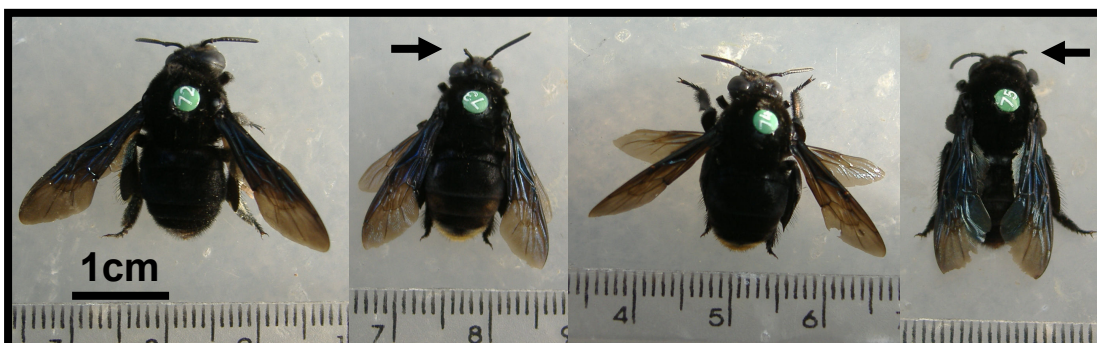


Figura 6: Retirada intercalada das antenas. As fotos mostram como foi realizada a retirada das antenas de *El. nigrita*. As setas pretas indicam as antenas que foram seccionadas.

As antenas foram armazenadas em tubos *ependorf* e ao serem trazidas para o laboratório foram adicionados 100 μ L de álcool etílico absoluto PA e estocadas em freezer a -20°C até a extração.

3.3.3 Análise das recapturas

Foi aplicado um teste de qui-quadrado ($\alpha=0,05$) para verificar a associação entre taxa de recaptura das abelhas e a retirada parcial da antena utilizando o software SYSTAT 12.0 (Wilkinson & Engelman 2007).

3.3.4 Análise molecular

A extração de DNA das antenas foi realizada utilizando o protocolo de fenol-clorofórmio (Sheppard & McPheron 1991) e o protocolo Chelex® 100 (Walsh *et al.* 1991). No protocolo de fenol-clorofórmio, as primeiras amostras extraídas foram maceradas em solução tampão; no entanto, como não foi obtido resultado satisfatório, na extração das demais amostras o protocolo foi modificado, macerando as antenas em nitrogênio líquido. Na extração com Chelex® 100, as antenas foram maceradas em nitrogênio líquido, seguida da adição de 100 µl Chelex e incubação por 30 minutos a 56°C. Esta solução foi misturada em vortex por 10 segundos e fervida por 5 minutos, sendo depois centrifugada a 14000 rpm. O sobrenadante obtido foi utilizado na reação de PCR.

Para verificar a qualidade do DNA obtido, as amostras foram amplificadas utilizando os locos microssatélites propostos por Souza *et al.* (2007) para cada espécie. O protocolo realizado foi o mesmo descrito pelos autores e os produtos foram corridos em sequenciador MegaBace-1000.

Os genótipos das fêmeas obtidos da leitura dos eletroferogramas foram analisados no software Micro-Checker 2.2.1 (van Oosterhout *et al.* 2004) para identificar possíveis erros de genotipagem (*stuttering*, alelo *dropout* e alelo nulo). A partir dos resultados de microssatélites foram estimadas as frequências alélicas para machos e fêmeas; dos dados de fêmeas estimou-se a variabilidade genética da população (Número de alelos (A), a Heterozigosidade esperada (He) e o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) utilizando o software GenAlex 6.3 (Peakal & Smouse 2006). A fim de verificar a diferença entre a amostragem de machos e fêmeas, foi estimado o grau de diferenciação populacional (Fst) e AMOVA, considerando as fêmeas como uma população e os machos (com genótipos diploidizados) outra população, utilizando o software Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.* 2005).

3.4 Resultados

Foram marcados 427 indivíduos de *Eg. cordata*, dos quais 127 foram recapturados, apresentando taxa de recaptura de 29,74% e 141 indivíduos de *El. nigrita*, dos quais 23 indivíduos foram recapturados, com taxa de recaptura de 16,31% (Tabela 2). Os indivíduos foram recapturados no mesmo sítio de coleta onde

foram marcados, exceto uma fêmea de *Eg. cordata* com antena seccionada que foi recapturada dois dias após a marcação num sítio a 360 m de distância.

Tabela 2: Número de indivíduos marcados e recapturados e suas características quanto às antenas (NR: não recapturados e R: recapturados) das espécies *Eg. cordata* e *El. nigrita*. Entre parênteses, as recapturas ocorridas no mesmo dia e nos dias posteriores.

	<i>Eg. cordata</i>			<i>El. nigrita</i>		
	NR	R	TOTAL	NR	R	TOTAL
Antenas intactas	131	69(10)	210	47	12(9)	68
Antenas seccionadas	147	55(7)	209	47	6(4)	57
Antenas já danificadas	4	3(1)	8	11	5(0)	16
Total	282	127(18)	427	105	23(13)	141

O teste de qui-quadrado foi aplicado para verificar se havia diferença entre as recapturas (R) e não recapturas (NR) nos dias posteriores à marcação dos indivíduos com antenas intactas e dos indivíduos que tiveram a antena seccionada. Em *Eg. cordata*, foram marcados 210 indivíduos (69 recapturados) cujas antenas foram deixadas intactas e 209 indivíduos (55 recapturados) que tiveram a antena seccionada. O valor do qui-quadrado de independência ($\chi^2 = 2,492$, $P = 0,114$) indicou igual chance de recaptura nos dois grupos (antenas intactas vs. antenas seccionadas).

Em relação ao tempo decorrido após a marcação, uma fêmea de *Eg. cordata* com antena intacta foi recapturada após 147 dias, enquanto que uma fêmea que teve a antena seccionada foi recapturada 133 dias após a marcação. No grupo das abelhas cujas antenas já estavam danificadas, uma fêmea foi recapturada 12 dias após ter sido marcada. Para o total das recapturas nas três classes (antenas intactas, seccionadas e danificadas), foi considerado o dia da última recaptura (Tabela 3). O período de recaptura na Tabela 3 indica o número de dias decorridos após a marcação, por exemplo, para a abelha com antena intacta, a primeira recaptura foi após dois dias, a segunda recaptura foi após sete dias, a terceira recaptura foi após oito dias, e a quarta e última recaptura foi após 147 dias. Para a abelha com antena seccionada, a primeira recaptura foi após seis dias, a segunda recaptura foi após 74 dias e a terceira e última recaptura foi após 133 dias. A maior taxa de recaptura se concentrou nos primeiros 15 dias (Figura 7), com as abelhas marcadas sendo geralmente recapturadas uma única vez (Figura 8).

Tabela 3: Data entre a marcação e a última recaptura para *Eg. cordata*. (EC – *Euglossa cordata*; F – fêmea; r – recaptura). A coluna Período r. indica os dias após marcação em que as abelhas foram recapturadas.

	Espécie	Sexo	Marcação	Recaptura	Dias	Período r.
Antenas intactas	EC	F	20.DEZ.06	16.MAI.07	147	2-7-8-147
Antenas seccionadas	EC	F	17.MAR.06	28.JUL.06	133	6-74-133
Antenas já danificadas	EC	F	9.MAR.06	21.MAR.06	12	12

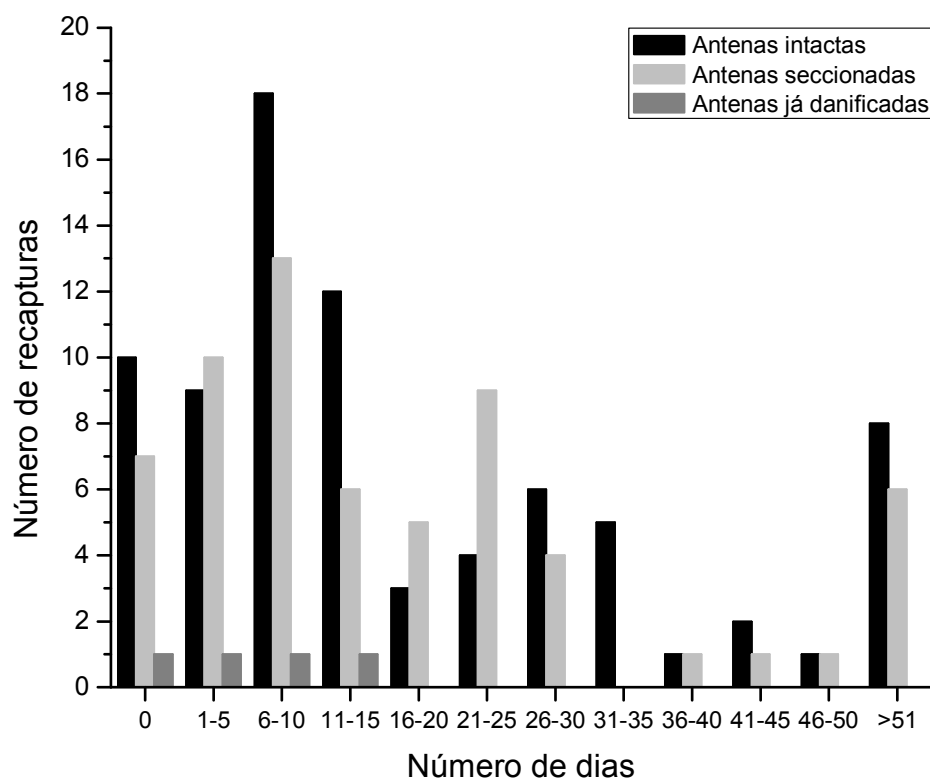


Figura 7: Número de dias decorridos após marcação para as recapturas de *Eg. cordata* nas três classes (antenas intactas, seccionadas e danificadas), considerando o dia em que a abelha foi recapturada pela última vez. O dia 0 representa as recapturas no mesmo dia.

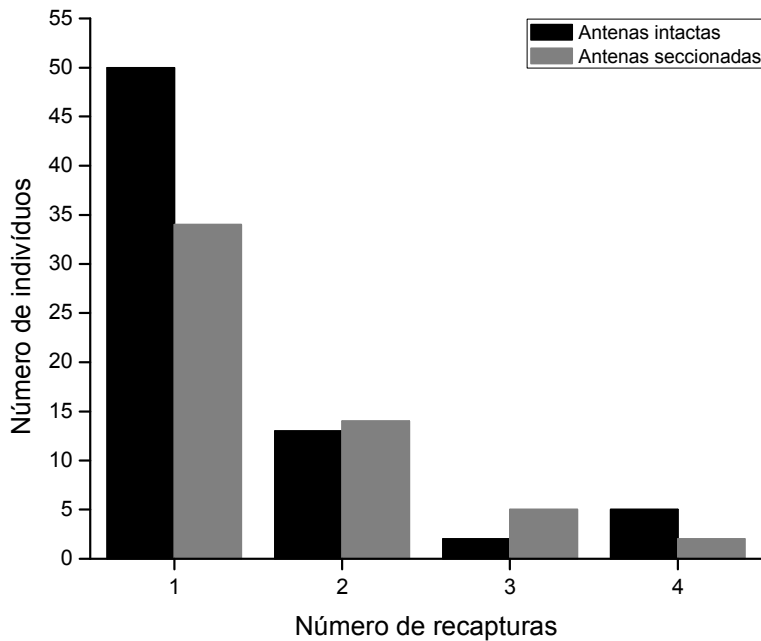


Figura 8: Número de recapturas em que um indivíduo marcado de *Eg. cordata* foi recapturado nas duas classes (antenas intactas e seccionadas). Não foram consideradas as recapturas no mesmo dia, apenas nos dias posteriores à marcação.

Em *El. nigrita*, foram marcados 68 indivíduos (12 recapturados) com a antena mantida intacta e 57 indivíduos marcados que tiveram ainda a antena seccionada (6 recapturados). Semelhantemente, o valor do qui-quadrado de independência indicou igual chance de recaptura entre os dois grupos ($\chi^2 = 1,683$, $P = 0,194$).

Considerando a recaptura no mesmo dia (valores entre parênteses na Tabela 2) e a recaptura nos dias subsequentes, também não foi verificado efeito da excisão ou não da antena sobre a taxa de recaptura tanto em *Eg. cordata* ($\chi^2 = 2,968$, $P = 0,085$) quanto em *El. nigrita* ($\chi^2 = 2,958$, $P = 0,085$). A razão de efetuar os dois tipos de testes reside no fato de que, se a abelha é marcada e volta rapidamente para a flor, ela pode apenas estar se recuperando, ao passo que se ela retorna em dias subsequentes, é provável que tenha retomado suas atividades normais, condição que melhor indica a ausência de efeito de seccionar a antena sobre a viabilidade dos indivíduos. Em relação às recapturas na espécie *El. nigrita*, foram somente recapturadas abelhas com as antenas seccionadas - cinco abelhas foram recapturadas uma vez em data posterior à marcação, sendo que uma delas foi recapturada duas vezes. O tempo maior entre na qual um macho de *El. nigrita* foi recapturado foi 26 dias.

Quanto à proporção sexual, foram marcadas 389 fêmeas de *Eg. cordata*, das quais 124 foram recapturadas, apresentando taxa de recaptura de 31,87%, e 38

machos, dos quais 3 foram recapturados, com taxa de recaptura de 7,89% (Tabela 4).

Tabela 4: Número de indivíduos de *Eg. cordata* quanto à proporção sexual e suas características quanto às antenas (NR: não recapturados e R: recapturados). Entre parênteses, as recapturas ocorridas no mesmo dia e em dias posteriores.

<i>Euglossa cordata</i>						
	Fêmeas			Machos		
	NR	R	TOTAL	NR	R	TOTAL
Antenas intactas	122	68(9)	199	9	1(1)	11
Antenas seccionadas	124	53(6)	183	23	2(1)	26
Antenas já danificadas	3	3(1)	7	1	-	1
Total	249	124(16)	389	33	3(2)	38

O teste de qui-quadrado foi aplicado ainda para verificar se havia diferença nos sexos quanto à taxa de recaptura (R e NR) dos indivíduos de *Eg. cordata* cujas antenas foram deixadas intactas ou seccionadas. O resultado encontrado não foi significativo em relação às fêmeas ($\chi^2 = 1,417$, $P = 0,234$); não foi possível a aplicação do teste para os machos devido ao baixo número amostral.

Em *El. nigrita* foram marcadas 58 fêmeas, das quais 8 foram recapturadas, com taxa de recaptura de 13,8%, e 83 machos, dos quais 15 foram recapturados, apresentando taxa de recaptura de 18,1% (Tabela 5).

Tabela 5: Número de indivíduos de *El. nigrita* quanto à proporção sexual e suas características quanto às antenas (NR: não recapturados; R: recapturados). Entre parênteses, as recapturas ocorridas no mesmo dia e dias posteriores.

<i>Eulaema nigrita</i>						
	Fêmeas			Machos		
	NR	R	Total	NR	R	Total
Antenas intactas	23	7(4)	34	24	5(5)	34
Antenas seccionadas	20	0(1)	21	27	6(3)	36
Antenas já danificadas	2	1(0)	3	9	4(0)	13
Total	45	8(5)	58	60	15(8)	83

O teste de qui-quadrado foi aplicado igualmente para verificar se havia diferença nos sexos em relação à recaptura dos indivíduos (R e NR) de *El. nigrita* cujas antenas foram deixadas intactas ou seccionadas. O resultado encontrado não foi significativo em relação aos machos ($\chi^2 = 0,009$, $P = 0,923$); não foi possível a aplicação do teste para as fêmeas devido ao baixo número amostral.

Das 210 antenas de *Eg. cordata*, 201 foram utilizadas para a extração de DNA por dois protocolos: fenol-clorofórmio e Chelex® 100. Em 13 antenas, não foi

possível a amplificação dos microssatélites, visto que a quantidade de DNA obtida não foi satisfatória, mesmo realizando duas tentativas de amplificação para os microssatélites. Durante a extração de DNA destes indivíduos, as antenas foram maceradas em solução tampão e, provavelmente, não houve ruptura suficiente das células dada a pequena proporção de massa das antenas. Após esta verificação, foi adotado o procedimento de macerá-las em nitrogênio líquido nos dois protocolos de extração utilizados. Das 58 antenas retiradas de *El. nigrita*, 54 foram submetidas à extração de DNA pelos protocolos do fenol-clorofórmio e Chelex® 100. Em 3 das 54 antenas, a quantidade de DNA obtido não foi satisfatória pela mesma razão apontada para *Eg. cordata*.

Após a extração de DNA, as amostras de *Eg. cordata* foram submetidas à amplificação para nove locos microssatélites (17, 18, 30b, 35, 51, 24, 26, 30a e 37) descritos em Souza *et al.* (2007). Foram analisados 188 adultos de *Eg. cordata*, sendo 162 fêmeas e 26 machos. A análise da genotipagem das fêmeas no software Micro-Checker 2.2.1 não identificou erros de genotipagem para todos os locos analisados, mas indicou a possibilidade de alelos nulos devido ao excesso de homozigotos para os locos 30b e 37 em *Eg. cordata*.

A análise dos dados foi separada por sexo em razão da diferença de ploidia das amostras. Nos machos e fêmeas foram estimadas as frequências alélicas (Figura 9, Figura 10 e Apêndice 1) e somente para as fêmeas, a heterozigosidade esperada (H_e) (Tabela 6) e o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (Tabela 7) utilizando o software GenAlex 6.3 (Peakal & Smouse 2006). A população de *Eg. cordata* da cidade de São Carlos, amostrada por meio das antenas, exibiu polimorfismo para todos os locos analisados. Exceto para os locos 30b e 37, os demais se encontravam na condição de equilíbrio genético de acordo com o modelo de Hardy-Weinberg.

Tabela 6: Estimativas de número de alelos, heterozigosidade esperada e observada para os locos microssatélites (17, 18, 30b, 35, 51, 24, 26, 30a e 37) em fêmeas da população de *Eg. cordata* de São Carlos. (N: número de indivíduos analisados; Na: número de alelos; Nae: número efetivo de alelos; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada).

	17	18	30b	35	51	24	26	30a	37
N	155	158	152	158	158	158	158	159	154
Na	13	14	19	6	6	8	10	7	14
Nae	7,573	9,091	6,651	2,071	2,058	3,177	5,967	2,772	5,768
Ho	0,897	0,911	0,776	0,525	0,500	0,658	0,835	0,623	0,669
He	0,868	0,890	0,850	0,517	0,514	0,685	0,832	0,639	0,827

Tabela 7: Verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os locos microssatélites (17, 18, 30b, 35, 51, 24, 26, 30a e 37) em fêmeas de *Eg. cordata* da população de São Carlos (ns: não significativo para $\alpha = 0,05$).

Loco	Grau de liberdade	χ^2	Probabilidade	Significância
17	78	73,093	0,636	Ns
18	91	95,669	0,348	Ns
30b	171	234,418	0,001	P<0,001
35	15	5,498	0,987	Ns
51	15	7,589	0,939	Ns
24	28	23,133	0,726	Ns
26	45	34,616	0,869	Ns
30a	21	14,103	0,865	Ns
37	91	176,504	0,000	P<0,001

A diferenciação genética entre as amostras de machos e fêmeas foi estimada pelo parâmetro F_{st} , com valor de 0,0056 ($P = 0,13$). Os valores obtidos pela AMOVA consideram homogêneas as amostras de fêmeas e machos diploidizados e, portanto, elas devem ser consideradas como tomadas de uma única população. A análise da partição da variação demonstrou que 0,56% da variação ocorre entre grupos e, portanto, 99,44% da variação ocorre dentro de grupos ($P = 0$). Ou seja, os resultados demonstram que, embora o número amostral de machos seja inferior e considerando a ploidia dos indivíduos, é possível verificar que a variação genética não está heterogeneamente distribuída entre os sexos.

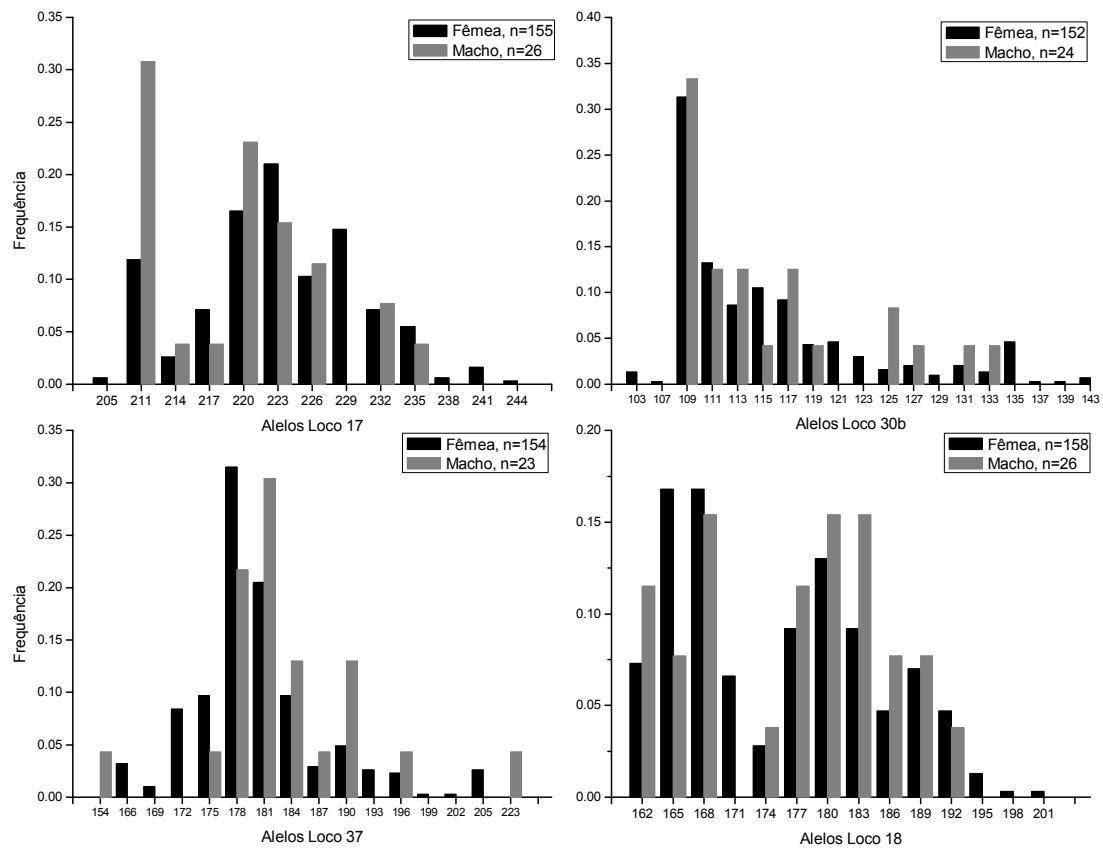


Figura 9: Frequências dos alelos dos locos em machos e fêmeas de *Eg. cordata*, locos 17, 30b, 37 e 18.

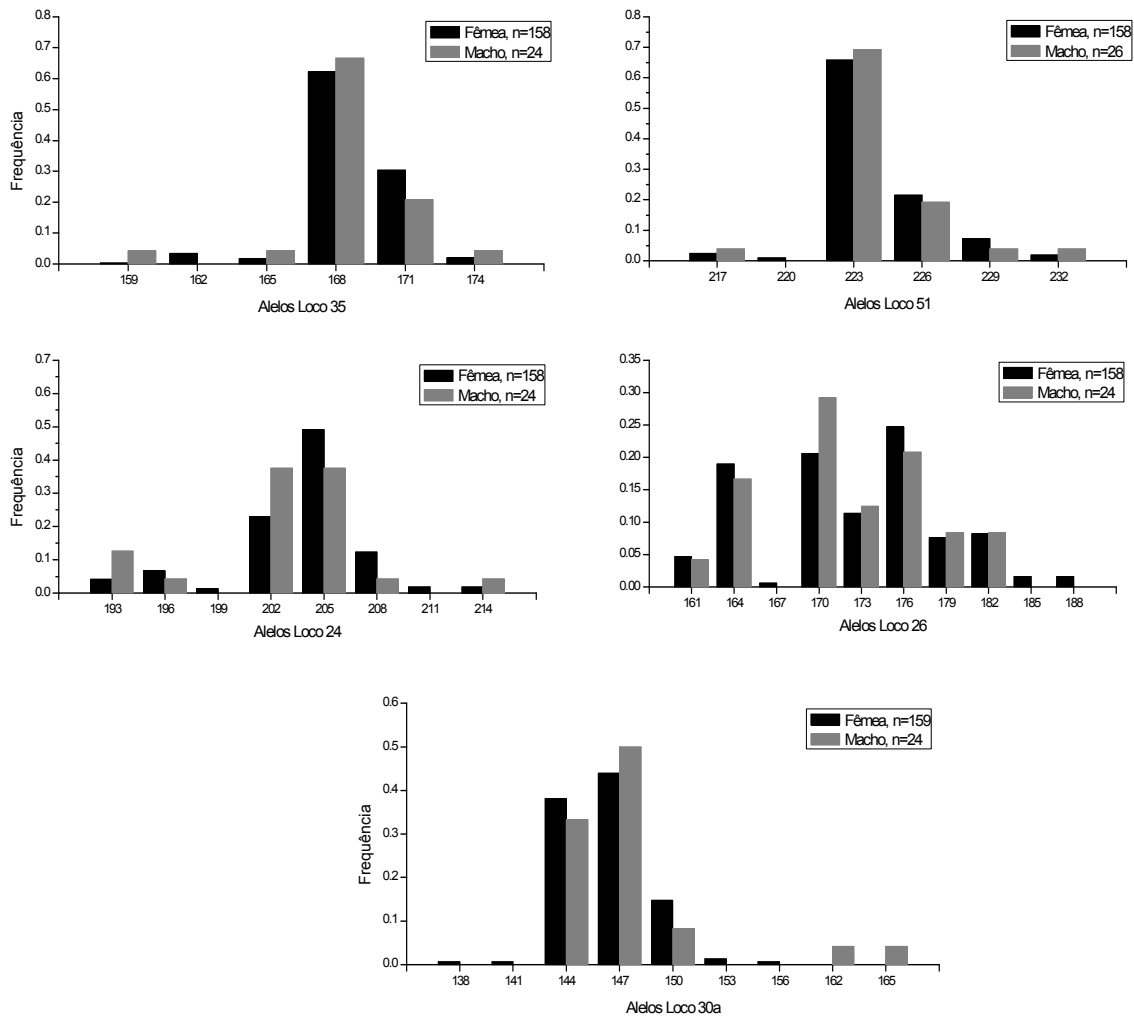


Figura 10: Frequências dos alelos dos locos em machos e fêmeas de *Eg. cordata*, locos 35, 51, 24, 26 e 30a.

Foram analisados 51 adultos de *El nigrita*, sendo 19 fêmeas e 32 machos, para 11 locos microssatélites (1, 12a, 12b, 13, 2J, 5J, 7J, 10J, 12J, 18J e 19J) descritos por Souza *et al.* (2007). A análise da genotipagem das fêmeas no software Micro-Checker 2.2.1 não identificou erros de genotipagem para todos os locos analisados e nem a evidência de alelos nulos. A análise dos dados foi feita separadamente para os dois sexos em razão da diferença de ploidia das amostras. Para os machos e fêmeas foram estimadas as frequências alélicas (Figura 11, Figura 12 e Apêndice 2); para as fêmeas, foram estimadas também a heterozigosidade esperada (H_e) (Tabela 8) e a condição de equilíbrio genético de Hardy-Weinberg (EHW) (Tabela 9) utilizando o software GenAlex 6.3 (Peakal & Smouse 2006). A população de *El. nigrita* apresentou todos os locos polimórficos; apenas um destes locos não se encontrava na condição de equilíbrio de Hardy-Weinberg (07J).

Tabela 8: Estimativa do número de alelos, heterozigosidade esperada e observada para os locos microssatélites (1, 12a, 12b, 13, 2J, 5J, 7J, 10J, 12J, 18J e 19J) na população de fêmeas de *El. nigrita* de São Carlos (N: número de indivíduos analisados; Na: número de alelos diferentes; Nae: número de alelos efetivos; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada).

	1	13	12a	12b	2J	10J	05J	12J	07J	18J	19J
N	18	19	19	17	19	19	19	19	18	19	19
Na	6	8	9	4	8	8	9	5	8	4	14
Nae	3,522	3,780	5,776	2,321	5,085	4,173	4,402	3,034	4,291	2,788	5,641
Ho	0,833	0,579	0,789	0,471	0,842	0,737	0,842	0,737	0,611	0,632	0,895
He	0,716	0,735	0,827	0,569	0,803	0,760	0,773	0,670	0,767	0,641	0,823

Tabela 9: Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os locos microssatélites (1, 12a, 12b, 13, 2J, 5J, 7J, 10J, 12J, 18J e 19J) na população de São Carlos para fêmeas de *El. nigrita* (ns: não significativo $\alpha = 0,05$).

Loco	Graus de liberdade	χ^2	Probabilidade	Significância
1	15	11,501	0,716	Ns
13	28	18,141	0,923	Ns
12a	36	33,334	0,596	Ns
12b	6	4,929	0,553	Ns
2J	28	23,856	0,689	Ns
10J	28	24,250	0,668	Ns
05J	36	21,132	0,977	Ns
12J	10	4,386	0,928	Ns
07J	28	64,617	0,000	P<0,001
18J	6	2,805	0,833	Ns
19J	91	104,733	0,154	Ns

A diferenciação genética entre as amostras de machos e fêmeas foi estimada pelo parâmetro F_{st} , com valor de 0,028 ($P = 0,04$). A distribuição da variação de acordo com a AMOVA considera que a amostra de fêmeas e machos com genótipos diploidizados apresenta uma baixa, porém significativa diferenciação. Se a variação entre grupos foi estimada em 2,9%, consequentemente, 97,1% da variação se refere à variação dentro de grupos ($P = 0$). Ou seja, os dados indicam que a variação está diferencialmente distribuída entre os sexos, embora o número amostral de fêmeas seja menor, o que pode justificar este resultado.

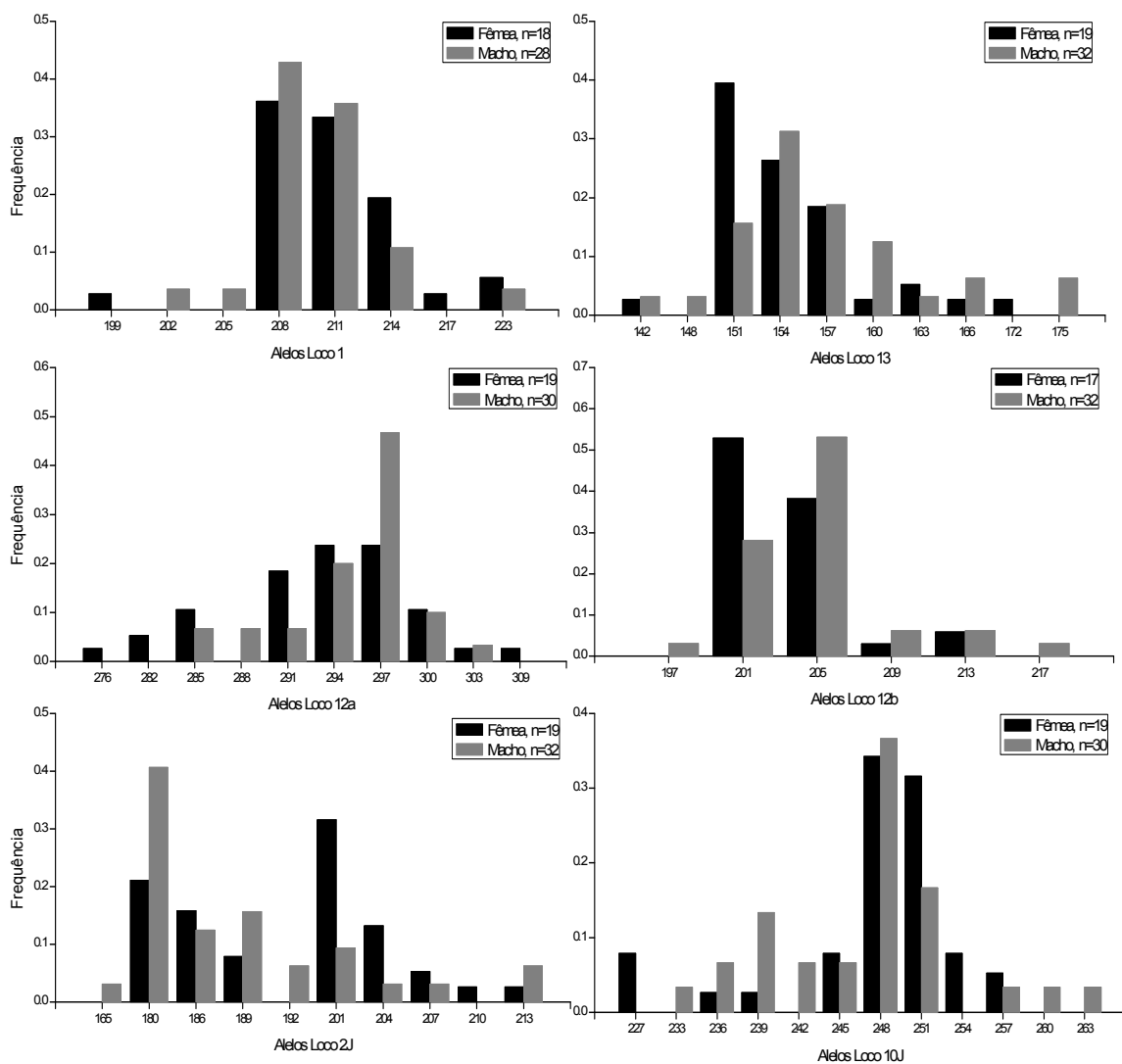


Figura 11: Frequências dos alelos dos locos em machos e fêmeas de *El. nigrita*, locos 1, 13, 12a, 12b, 2J e 10J.

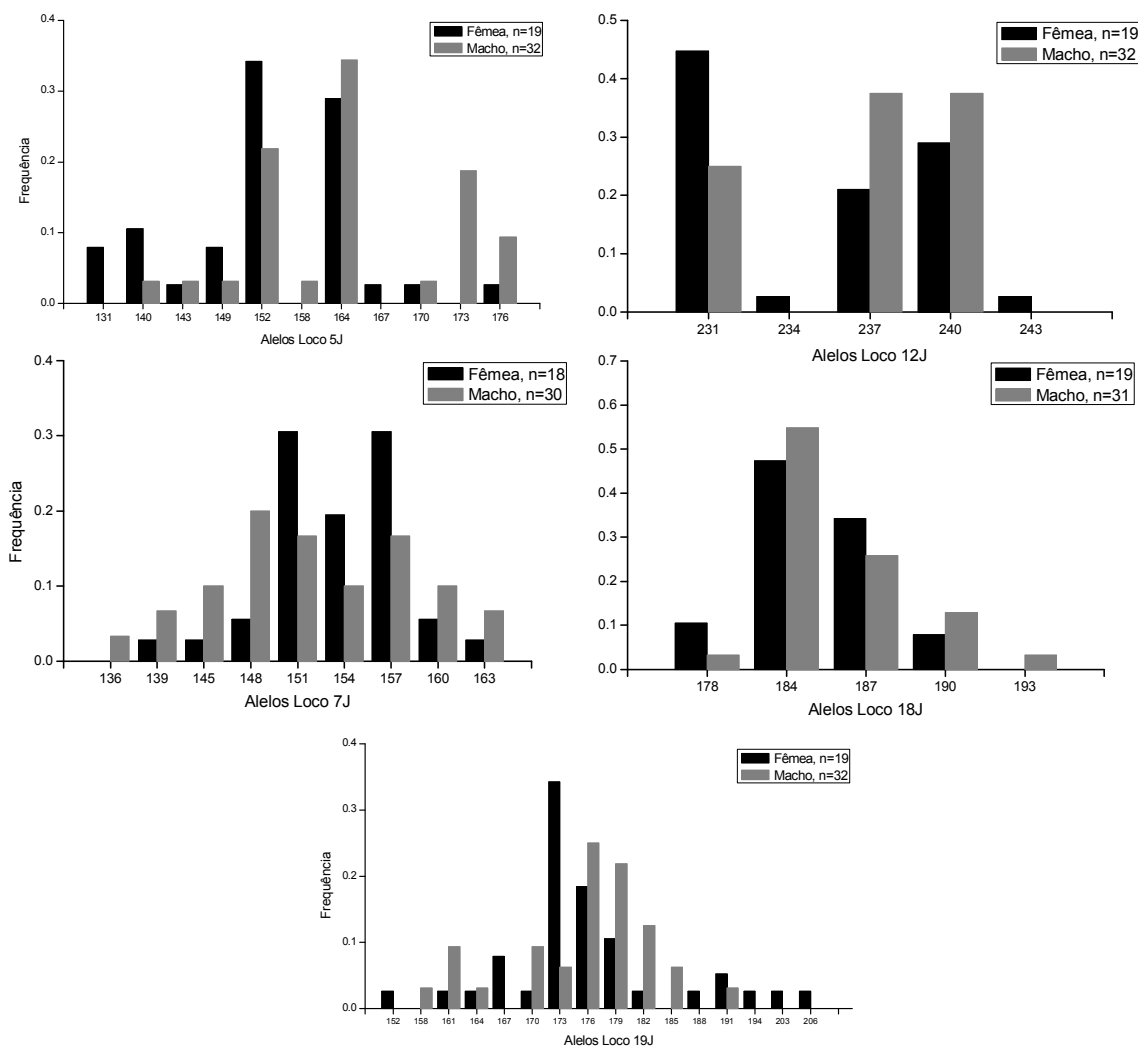


Figura 12: Frequências dos alelos dos locos em machos e fêmeas de *El. nigrita*, locos 5J, 12J, 7J, 18J, 19J.

3.5 Discussão

No presente estudo, a chance de recaptura dos adultos de *Eg. cordata* e *El. nigrita* não foi afetada significativamente pela excisão ou não de parte da antena dos indivíduos marcados. De modo similar, não foram detectadas diferenças entre as taxas de recaptura entre as fêmeas de *Eg. cordata* e entre os machos de *El. nigrita* que tiveram suas antenas seccionadas ou não.

Quanto às taxas de recaptura, nossos resultados (*Eg. cordata* = 29,7% e *El. nigrita* = 16,3%) revelaram níveis comparáveis a experimentos de marcação e recaptura realizados em outras espécies de abelhas - por exemplo, 17% para *Colletes cunicularius* (Peakall & Schiestl 2004) e 19% para machos e 56% para fêmeas de *Andrena vaga* em agregações de ninhos (Bischoff 2003). Nossos

achados se assemelham às taxas de recaptura descritas anteriormente para *Eg. cordata* (33%) e *El. nigrita* (25%) por López-Uribe *et al.* (2008).

A retirada de uma das antenas nas abelhas Euglossini não afetou significativamente a probabilidade de recaptura, o que indica que esta remoção não reduziu a observação no campo destas abelhas. Esta observação é suportada pelos dados de recaptura de *Eg. cordata* quando se verifica que entre as abelhas nas quais a antena foi mantida intacta ou a antena foi seccionada, ocorreram recapturas após 147 e 133 dias, respectivamente. Esta recaptura após um grande período nas flores de *T. peruviana* pode fornecer informações da longevidade das abelhas da tribo Euglossini, comparando dados da literatura, uma fêmea de *Eg. cordata* já foi recapturada 192 dias após marcada (López-Uribe *et al.* 2008) e um macho de *El. cingutala* após 5 meses e meio, totalizando mais ou menos 165 dias (Dodson 1966). Para medir a longevidade, Ackerman e Montalvo (1985) realizaram experimentos de marcação e recaptura com machos e machos e fêmeas mantidas em cativeiro, e as fêmeas demonstraram longevidade maior, *El. meriana* viveu cerca de quatro meses, *Ex. frontalis* cinco meses e *El. nigrita* dois meses e meio. Nossos resultados indicam que mesmo a abelha com a antena seccionada, demonstrou um alto período de recaptura sendo maior que outros trabalhos realizados, corroborando a alta longevidade da tribo (Ackerman & Montalvo 1985).

Realizando experimentos de marcação e recaptura a fim de associar um método não letal de amostragem, o DNA das antenas foi extraído utilizando dois protocolos diferentes e submetido à amplificação para locos microssatélites. Resultados satisfatórios foram obtidos, o que indica que os locos microssatélites podem ser analisados a partir de um fragmento de antena, podendo ser utilizados para responder, por exemplo, questões relativas à genética de populações (Cerântola *et al.* 2010).

Este trabalho reforça a evidência crescente de que é possível a associação de métodos genéticos a estudos da ecologia sem que procedimentos letais afetem diretamente as populações sob estudo.

A amostragem a partir de um fragmento de antena também pode ser utilizada como protocolo de extração de DNA quando há a necessidade de se preservar o máximo possível do corpo de um inseto, por exemplo, em espécimes de museu. Em determinados casos, a quantidade de DNA obtido das antenas pode ser suficiente para as análises genéticas, enquanto que partes com maior massa, como tórax e

pernas, às vezes necessitem de maior número de lavagens para obter um DNA de maior qualidade.

Em relação aos resultados obtidos pela análise das antenas para a população de São Carlos, a maioria dos locos se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Pode-se observar que mesmo com a razão altamente desviada para as fêmeas no caso de *Eg. cordata* (11,8:1), os alelos encontrados em maior frequência nas fêmeas são, geralmente, os que ocorrem mais frequentemente nos machos, visto a baixa e não significativa diferenciação genética entre os grupos, fêmeas e machos diploidizados. Em *El. nigrita*, foi encontrada razão sexual próxima de 1:1(1,4:1); entretanto, neste caso, foi observada uma baixa, mas significativa diferenciação entre as amostras dos dois sexos, resultado que merece confirmação para que possa ser devidamente interpretado. A heterozigosidade e o número de alelos encontrados na população de São Carlos para *Eg. cordata* é semelhante ao encontrado por Cerântola *et al.* (2010). As elevadas heterozigosidades estimadas para as duas espécies são indícios de que a população possui elevada diversidade genética, indicando uma boa saúde das populações.

Devido à facilidade de coleta dos machos por iscas-odores (Dressler 1982), os trabalhos genéticos têm sido realizados a partir de amostras de machos para inferir informações sobre a diversidade genética das fêmeas (Suzuki *et al.* 2010). Este trabalho corrobora que dados referentes aos machos são compatíveis ao obtidos via fêmeas no caso de marcadores microssatélites, pois a diferenciação dos alelos mostrou-se pequena quando se comparou fêmeas e machos diploidizados.

Este trabalho é o primeiro a propor a retirada de antenas como método não letal de amostragem de DNA em abelhas aliando experimentos ecológicos a experimentos moleculares. Porém, o método também pode se associado a estudos comportamentais, já que as antenas dessas abelhas podem conter neuroreceptores utilizados no reconhecimento dos compostos químicos (Eltz & Lunau 2005). Análises com eletroantenografia (EAG) demonstram que machos de diferentes espécies de abelhas respondem diferentemente aos odores (Eltz & Lunau 2005). Desta forma, a excisão de parte de uma das antenas pode alterar sua percepção. Considerando que os machos de Euglossini são atraídos por compostos químicos, torna-se interessante realizar experimentos de marcação e recaptura em machos atraídos em iscas-odores cujas antenas sejam excisadas ou não, verificando se a excisão não altera a percepção dos machos na coleta de fragrâncias.

Estas fragrâncias parecem servir para atração sexual (Cameron 2004). Portanto, a excisão da antena pode diminuir o *fitness* dos machos, que coletariam menos fragrâncias, obtendo menos parceiras para reprodução. Outro aspecto interessante a ser considerado seria a excisão parcial da antena esquerda ou direita, já que no presente estudo, esta escolha foi aleatória. Em experimento realizado para treinamento do reflexo de extensão da probóscide (PER) em *Apis mellifera* em resposta a diferentes odores, foi verificado que as abelhas respondem melhor quando a antena direita foi exposta à odores (Letzkus *et al.* 2006). Rogers & Vallortigara (2008) demonstraram, posteriormente, que o reconhecimento do odor envolve primeiramente a antena direita e depois a esquerda, indicando um processo de laterização na formação da memória similar ao verificado em vertebrados, sendo que a memória de longo prazo é acessada mediante a antena esquerda.

Nossos resultados indicam que a excisão de parte de uma antena pode ser utilizada para amostrar satisfatoriamente o DNA, constituindo um método não-letal para as abelhas Euglossini, fato suportado pelas taxas de recaptura de machos e fêmeas marcados. Como há um grande interesse dos pesquisadores em associar estudos ecológicos a análises genéticas, sugerimos que este método seja utilizado para estudos subsequentes de marcação e recaptura de machos em iscas-odores com o objetivo de identificar o possível efeito na coleta de fragrâncias.

3.6 Referências Bibliográficas

- Ackerman, J. D. & A. M. Montalvo (1985). Longevity of Euglossine bees. *Biotropica* 17 (1): 79-81.
- Augusto, S. C. & C. A. Garófalo (2004). Nesting biology and social structure of *Euglossa (Euglossa) townsendi* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Insectes Sociaux* 51: 400-409.
- Augusto, S. C. & C. A. Garófalo (2009). Bionomics and sociological aspects of *Euglossa fimbriata* (Apidae, Euglossini). *Genetics and Molecular Research* 8 (2): 525-538.
- Avise JC (2004) *Molecular markers, natural history and evolution*. Harvard University Press, Cambridge.
- Bischoff, I. (2003). Population dynamics of the solitary digger bee *Andrena vaga* Panzer (Hymenoptera, Andrenidae) studied using mark-recapture and nest counts. *Population Ecology* 45: 197-204.
- Brito, C. M. S. & M. M. C. Rêgo (2001). Community of male euglossine bees (Hymenoptera: Apidae) in a secondary forest, Alcântara, MA, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 61 (4): 631-638.
- Bouga, M.; E. Klossa-Kiliass; S. Alahiotis e G. Killias (2005). Non-lethal DNA sampling of wing tips discriminates subspecies of *Apis mellifera* occurring in Greece. *Journal of Apicultural Research* 44 (4): 00-00.
- Cameron, S. A. (2004). Phylogeny and biology of Neotropical orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Entomology* 49: 377-404.
- Cerântola, N. C. M.; C. A. Oi; M. Cervini & M. A. Del Lama (2010). Genetic differentiation of urban populations of *Euglossa cordata* Linnaeus 1758 from the state of São Paulo, Brazil. *Apidologie* (no prelo).
- Châline, N.; F. L. W. Ratnieks; N. E. Raine; N. S. Badcock & T. Burke. (2004). Non-lethal sampling of honey bee, *Apis mellifera*, DNA using wing tips. *Apidologie* 35: 311-318.
- Chaves, P. B.; M. F. Paes; S. L. Mendes; K. B. Strier; I. D. Louro & V. Fagundes (2006). Noninvasive genetic sampling of endangered muriqui (Primates, Atelidae): Efficiency of fecal DNA extraction. *Genetics and Molecular Biology* 29 (4): 750-754.
- Dodson, C. H. (1966). Ethology of some bees of the tribe Euglossini (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 39 (4): 607-629.
- Dressler, R. L. (1982). Biology of the orchid bees. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 373-394.

- Eltz, T. & K. Lunau (2005). Antennal response to fragrance compounds in male orchid bees. *Chemoecology* 15: 135-138.
- Excoffier, L.; G. Laval & S. Schneider (2005). Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Garófalo, C. A. (1985). Social structure of *Euglossa cordata* nests (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Entomologia Generalis* 11 (1-2): 77-83.
- Hamm, C. A.; D. Aggarwal & D. A. Landis (2010). Evaluating the impact of non-lethal DNA sampling on two butterflies, *Vanessa cardui* and *Satyrodes eurydice*. *Journal of Insect Conservation* 14: 11-18.
- Holehouse, K. A.; R. L. Hammond & A. F. G. Bourke (2003). Non-lethal sampling of DNA from bumble bees for conservation genetics. *Insectes Sociaux* 50: 277-285.
- Horváth, M. B.; B. Martinez-Cruz; J. J. Negro; L. Kalmár & J. A. Godoy (2005). An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology* 36: 84-88.
- Letzkus, P.; W. A. Ribic; J. T. Wood; H. Zhu; S. Zhang & M. V. Srinivasan (2006). Lateralization of olfaction in the honeybee *Apis mellifera*. *Current Biology* 16: 1471-1476.
- López-Uribe, M. M. & M. A. Del Lama (2007). Molecular identification of species of the genus *Euglossa* Latreille (Hymenoptera: Apidae, Euglossini). *Neotropical Entomology* 36 (5): 712-720.
- López-Uribe, M. M.; C. A. Oi & M. A. Del Lama (2008). Nectar-foraging behaviour of Euglossine bees (Hymenoptera: Apidae) in urban areas. *Apidologie* 39: 410-418.
- Lushai, G.; W. Fjellsted; O. Marcovitch; K. Aagaard; T. N. Sherratt; J. A. Allen & N. Maclean (2000). Application of molecular techniques to non-lethal tissue sample of endangered butterfly populations (*Parnassius apollo* L.) in Norway for conservation management. *Biological Conservation* 94: 43-50.
- Michel-Salzat, A.; S. A. Cameron & M. L. Oliveira (2004). Phylogeny of the orchid bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossini): DNA and morphology yield equivalent patterns. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 309-323.
- Morato, E. F. (1994). 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 Paraense "Emílio Goeldi", séries de Zoologia* 10 (1): 95-105.

- van Oosterhout, C.; W. F. Hutchinson; D. P. M. Wills & P. Shipley (2004). Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535–538.
- Peakall, R. & F. P. Schiestl (2004). A mark-recapture study of male *Colletes cunicularius* bees: implications for pollination by sexual deception. *Behaviour Ecology and Sociobiology* 56: 579-584.
- Peakall, R. & P. E. Smouse (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pereira-Martins, S. R. & W. E. Kerr (1991). Biologia de *Eulaema nigrita*. 1. Construção de células, oviposição e desenvolvimento. *Papéis Avulsos de Zoologia* 37 (13): 227-235.
- Peruquetti, R. C.; L. A. O. Campos; C. D. P. Coelho; C. V. M. Abrantes e L. C. Lisboa (1999). Abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância, riqueza e aspectos biológicos. *Revista Brasileira de Zoologia* 16 (2): 101-118.
- Rebêlo, J. M. M. & C. A. Garófalo (1997). Comunidades de machos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em matas semidecíduas do Nordeste de Estado de São Paulo. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 26 (2): 243-255.
- Rogers, L. J. & G. Vallortigara (2008). From antenna to antenna: Lateral shift of olfactory memory recall by honeybees. *Plos One* 3 (6): e2340.
- Roubik, D. W. (2001). Ups and downs in pollinator populations: when is there a decline? *Conservation Ecology* 5 (1): 1-11.
- Sheppard, W. S. & B. A. McPherson (1991). Ribosomal DNA diversity in Apidae. In: Smith, D. R. *Diversity in the genus Apis*. Boulder: Westview, p. 89-102.
- Soares, J. J.; D. W. Silva & M. I. S. Lima (2003). O município de São Carlos, São Paulo, Brasil: vegetação original e situação atual. *Brazilian Journal of Biology* 63 (3): 527-536.
- Soucy, S. L.; T. Giray & D. W. Roubik (2003). Solitary and group nesting in the orchid bee *Euglossa hyacinthina* (Hymenoptera, Apidae). *Insectes Sociaux* 50: 248-255.
- Souza, R. O.; M. Cervini; M. A. Del Lama & J. Paxton (2007). Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology Notes* 6: 1352-1356.
- Suzuki, K. M.; M. C. Arias; D. C. Giangarelli; G. A. Freiria & S. H. Sofia (2010). Mitochondrial DNA diversity of orchid bee *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera: Apidae) populations assessed by PCR-RFLP. *Biochemical Genetics* 48: 326-341.

- Starks, P. T. & J. M. Peters (2002). Semi-nondestructive genetic sampling from live eusocial wasps *Polistes dominulus* and *Polistes fuscatus*. *Insectes Sociaux* 49: 20-22.
- Taberlet, P.; L. P. Waits & G. Luikart (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Genetics* 14 (8): 323-327.
- Tonhasca, A. J.; G. S. Albuquerque & J. L. Blackmer (2003). Dispersal of euglossine bees between fragments of the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Tropical Ecology* 19: 99-102.
- Valière, N.; C. Bonenfant; C. Toïgo; G. Luikart; J. M. Gaillard & F. Klein (2007). Importance of a pilot study for non-invasive sampling: genotyping errors and population size estimations in red deer. *Conservation Genetics* 8: 69-78.
- Vila, M.; M. A. Auger-Rozenberg; F. Goussard & C. Lopez-Vaamonde (2009). Effect of non-lethal sampling on life-history traits of the protected moth *Graellsia isabelae* (Lepidoptera: Saturniidae). *Ecological Entomology* 34: 356-362.
- Walsh, P. S.; D. A. Metzger & R. Higuchi (1991). Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10: 506-513.
- Wasko, A. P.; C. Martins; C. Oliveira & F. Foresti (2003). Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas* 138: 161-165.
- Wilkinson, L. & L. Engelman (2007). SYSTAT 12.0: New Statistics. pp 235. Cranes Software International.

3.7 Apêndice

Apêndice 1: Frequências alélicas estimadas para os locos microssatélites (17, 18, 30b, 35, 51, 24, 26, 30a e 37) na população de *Eg. cordata* de São Carlos (N: número de indivíduos analisados).

Loco	Alelos	Fêmeas	Loco	Alelos	Machos
17	N	155	17	N	26
	205	0,006		205	-
	211	0,119		211	0,308
	214	0,026		214	0,038
	217	0,071		217	0,038
	220	0,165		220	0,231
	223	0,210		223	0,154
	226	0,103		226	0,115
	229	0,148		229	-
	232	0,071		232	0,077
	235	0,055		235	0,038
	238	0,006		238	-
	241	0,016		241	-
	244	0,003		244	-
18	N	158	18	N	26
	162	0,073		162	0,115
	165	0,168		165	0,077
	168	0,168		168	0,154
	171	0,066		171	-
	174	0,028		174	0,038
	177	0,092		177	0,115
	180	0,130		180	0,154
	183	0,092		183	0,154
	186	0,047		186	0,077
	189	0,070		189	0,077
	192	0,047		192	0,038
	195	0,013		195	-
	198	0,003		198	-
201	0,003	201	-		
30b	N	152	30b	N	24
	103	0,013		103	-
	107	0,003		107	-
	109	0,313		109	0,333
	111	0,132		111	0,125
	113	0,086		113	0,125
	115	0,105		115	0,042
	117	0,092		117	0,125
	119	0,043		119	0,042
	121	0,046		121	-
	123	0,030		123	-
	125	0,016		125	0,083
	127	0,020		127	0,042
	129	0,010		129	-
	131	0,020		131	0,042
	133	0,013		135	0,042
135	0,046	135	-		
137	0,003	137	-		

	139	0,003		139	-
	143	0,007		143	-
35	N	158	35	N	24
	159	0,003		159	0,042
	162	0,035		162	-
	165	0,016		165	0,042
	168	0,623		168	0,667
	171	0,304		171	0,208
	174	0,019		174	0,042
51	N	158	51	N	26
	217	0,025		217	0,038
	220	0,009		220	-
	223	0,658		223	0,692
	226	0,215		226	0,192
	229	0,073		229	0,038
	232	0,019		232	0,038
24	N	158	24	N	24
	193	0,041		193	0,125
	196	0,066		196	0,042
	199	0,013		199	-
	202	0,228		202	0,375
	205	0,491		205	0,375
	208	0,123		208	0,042
	211	0,019		211	-
	214	0,019		214	0,042
26	N	158	26	N	24
	161	0,047		161	0,042
	164	0,190		164	0,167
	167	0,006		167	-
	170	0,206		170	0,292
	173	0,114		173	0,125
	176	0,247		176	0,208
	179	0,076		179	0,083
	182	0,082		182	0,083
	185	0,016		185	-
	188	0,016		188	-
30a	N	159	30a	N	24
	138	0,006		138	-
	141	0,006		141	-
	144	0,381		144	0,333
	147	0,440		147	0,500
	150	0,148		150	0,083
	153	0,013		153	-
	156	0,006		156	-
	162	-		162	0,042
	165	-		165	0,042
37	N	154	37	N	23
	154	-		154	0,043
	166	0,032		166	-
	169	0,010		169	-
	172	0,084		172	-
	175	0,097		175	0,043
	178	0,315		178	0,217
	181	0,205		181	0,304

184	0,097	184	0,130
187	0,029	187	0,043
190	0,049	190	0,130
193	0,026	193	-
196	0,023	196	0,043
199	0,003	199	-
202	0,003	202	-
205	0,026	205	-
223	-	223	0,043

Apêndice 2: Frequências alélicas estimadas para os locos microssatélites (1, 12a, 12b, 13, 2J, 5J, 7J, 10J, 12J, 18J e 19J) na população de *Ei. nigrita* de São Carlos (N: número de indivíduos analisados).

Loco	Alelos	Fêmea	Loco	Alelos	Macho
1	N	18	1	N	28
	199	0,028		199	-
	202	-		202	0,036
	205	-		205	0,036
	208	0,361		208	0,429
	211	0,333		211	0,357
	214	0,194		214	0,107
	217	0,028		217	-
	223	0,056		223	0,036
	13	N		19	13
142		0,026	142	0,031	
148		-	148	0,031	
151		0,395	151	0,156	
154		0,263	154	0,313	
157		0,184	157	0,188	
160		0,026	160	0,125	
163		0,053	163	0,031	
166		0,026	166	0,063	
172		0,026	172	-	
175		-	175	0,063	
12a	N	19	12a	N	30
	276	0,026		276	-
	282	0,053		282	-
	285	0,105		285	0,067
	288	-		288	0,067
	291	0,184		291	0,067
	294	0,237		294	0,200
	297	0,237		297	0,467
	300	0,105		300	0,100
	303	0,026		303	0,033
	309	0,026		309	-
12b	N	17	12b	N	32
	197	-		197	0,031
	201	0,529		201	0,281
	205	0,382		205	0,531
	209	0,029		209	0,063
	213	0,059		213	0,063
	217	-		217	0,031

2J	N	19	2J	N	32
	165	-		165	0,031
	180	0,211		180	0,406
	186	0,158		186	0,125
	189	0,079		189	0,156
	192	-		192	0,063
	201	0,316		201	0,094
	204	0,132		204	0,031
	207	0,053		207	0,031
	210	0,026		210	-
	213	0,026		213	0,063
10J	N	19	10J	N	30
	227	0,079		227	-
	233	-		233	0,033
	236	0,026		236	0,067
	239	0,026		239	0,133
	242	-		242	0,067
	245	0,079		245	0,067
	248	0,342		248	0,367
	251	0,316		251	0,167
	254	0,079		254	-
	257	0,053		257	0,033
	260	-		260	0,033
	263	-		263	0,033
05J	N	19	05J	N	32
	131	0,079		131	-
	140	0,105		140	0,031
	143	0,026		143	0,031
	149	0,079		149	0,031
	152	0,342		152	0,219
	158	-		158	0,031
	164	0,289		164	0,344
	167	0,026		167	-
	170	0,026		170	0,031
	173	-		173	0,188
	176	0,026		176	0,094
12J	N	19	12J	N	32
	231	0,447		231	0,250
	234	0,026		234	-
	237	0,211		237	0,375
	240	0,289		240	0,375
	243	0,026		243	-
07J	N	18	07J	N	30
	136	-		136	0,033
	139	0,028		139	0,067
	145	0,028		145	0,100
	148	0,056		148	0,200
	151	0,306		151	0,167
	154	0,194		154	0,100
	157	0,306		157	0,167
	160	0,056		160	0,100
	163	0,028		163	0,067
18J	N	19	18J	N	31
	178	0,105		178	0,032

	184	0,474		184	0,548
	187	0,342		187	0,258
	190	0,079		190	0,129
	193	-		193	0,032
19J	N	19	19J	N	32
	152	0,026		152	-
	158	-		158	0,031
	161	0,026		161	0,094
	164	0,026		164	0,031
	167	0,079		167	-
	170	0,026		170	0,094
	173	0,342		173	0,063
	176	0,184		176	0,250
	179	0,105		179	0,219
	182	0,026		182	0,125
	185	-		185	0,063
	188	0,026		188	-
	191	0,053		191	0,031
	194	0,026		194	-
	203	0,026		203	-
	206	0,026		206	-

4 CAPÍTULO 2: Genética intranidal de Euglossini determinada pela análise de microssatélites

4.1 Resumo

As abelhas Euglossini fazem parte do grupo das abelhas corbiculadas sendo as únicas deste grupo que não apresentam comportamento social avançado. A biologia de nidificação desta tribo é ainda pouco conhecida em relação ao número de espécies existentes, pois os ninhos não são facilmente encontrados na natureza. Conhecer o parentesco genético intranidal pode esclarecer sobre as relações sociais que variam dentro da tribo Euglossini e contribuir para o estudo do comportamento de compartilhamento de ninhos. Neste trabalho foram coletados 15 ninhos de três espécies – *Euglossa cordata* (8), *Euglossa townsendi* (6) e *Eufriesea violacea* (1) - e os indivíduos foram analisados para locos microssatélites. A análise genética intranidal revelou que os genótipos dos indivíduos dos ninhos são explicados usualmente pelo acasalamento de uma fêmea com um macho. Nos ninhos em que esta condição não foi indicada, ou o ninho continha poucas células ou, no caso de *Eg. cordata*, fêmeas presas a resina não aparentadas com a progênie foram encontradas. O tipo de acasalamento monândrico e monogínico pode favorecer as relações sociais dentro do ninho e corroboram a maioria dados encontrados para outras espécies de Euglossini.

4.2 Introdução

A biologia da nidificação e estrutura social das abelhas euglossíneas tem sido bem descrita para algumas espécies (Garófalo 1992; Garófalo 1985; Santos & Garófalo 1994; Augusto & Garófalo 2004; Soucy *et al.* 2003; Otero *et al.* 2008). Considerando, porém, o número de espécies da tribo, estas informações são pouco representativas (Ramírez *et al.* 2002). Este desconhecimento é, em parte, devido a que os ninhos de Euglossini são dificilmente encontrados na natureza (Cameron 2004), já que essas abelhas utilizam cavidades pré-existentes para construção (Santos & Garófalo 1994). No gênero *Euglossa* já foram encontrados ninhos em partes altas de árvores (Eberhard 1988; Ramírez-Arriaga *et al.* 1996) e também no solo (Dressler 1982).

A observação de ninhos indica que pode haver reutilização do local ou mesmo do material de provisionamento por outras abelhas (Garófalo 1985), podendo haver também o compartilhamento do ninho com outras fêmeas, estabelecendo-se interações entre irmãs, mãe-filha (Cocom Pech *et al.* 2008; Augusto & Garófalo 2009) ou fêmeas não relacionadas (Augusto & Garófalo 2004). As abelhas da tribo Euglossini, juntamente com as abelhas de mel, as abelhas sem ferrão e as mamangavas, constituem o grupo das abelhas corbiculadas, sendo as únicas deste grupo que não apresentam comportamento social avançado, podendo encontrar espécies que compartilham ninhos (Augusto & Garófalo 2009; Dressler 1982). Conhecer o parentesco genético dentro de ninhos pode esclarecer a relação de compartilhamento dos ninhos e também determinar as relações sociais que variam dentro da tribo Euglossini.

No gênero *Euglossa*, já foi verificado que os ninhos das espécies *Eg. hemichlora* coletadas no Panamá, e *Eg. viridissima* e *Eg. "2dentada"* coletadas do México são geralmente fundados por uma fêmea acasalada com um macho (Zimmermann *et al.* 2009). Estes resultados suportam a teoria de seleção sexual, já que a fêmea pode escolher o melhor macho através do *bouquet* de fragrâncias que eles coletam (Zimmermann *et al.* 2009).

O acasalamento único parece ser um comportamento comum no gênero *Euglossa*, o que leva a crer que possa ocorrer também frequentemente em toda tribo Euglossini (Zimmermann *et al.* 2009). O objetivo deste trabalho foi determinar a

estrutura sociogenética de ninhos de *Eg. cordata*, *Eg. townsendi* e *Eufriesea violacea*. O sistema de determinação do sexo haplodiplóide faz com que os himenópteros sejam organismos modelo para inferir os haplótipos dos pais, uma vez que a progênie será constituída de machos que apenas herdarão os alelos da mãe, e de fêmeas que, por resultarem de fertilização do óvulo, herdarão alelos dos dois parentais.

4.3 Material e Métodos

Primeiramente, foram dispostos ninhos armadilha de bambu pelo campus da Universidade Federal de São Carlos; no entanto, poucas nidificações foram obtidas mediante esta estratégia (Figura 13). Foram utilizados, então, ninhos provenientes de São Carlos coletados em tocos de árvores na área urbana da cidade e em bandejas de cultivo de mudas de isopor localizadas na casa de vegetação do Departamento de Botânica – UFSCar (Tabela 10 e Figura 14). O ninho de *Ef. violacea* foi coletado em bambu na Estação Ecológica de Caetetus (Gália, SP) e foi cedido pelo Prof. Dr. Carlos Alberto Garófalo. Os ninhos foram levados ao laboratório e, de alguns ninhos, foram retiradas as fêmeas vivas que seriam supostamente a mãe. Os indivíduos foram coletados ao emergirem e após a última emergência do ninho, foi feita uma inspeção para verificar se todos haviam nascido. Foram retiradas então as pupas não desenvolvidas e também foi verificada a presença de algumas fêmeas presas em resina nos ninhos de *Eg. cordata*; estas fêmeas foram retiradas e analisadas juntamente com as demais crias deste ninho.

Tabela 10: Ninhos de Euglossini coletados (*ninhos em que a suposta mãe foi capturada).

Número	Espécie	Ninho	Coletado	Local	Fêmea	Macho	Total
1	<i>Eg. cordata</i>	1704	jun/07	São Carlos	2	3	5
2	<i>Eg. cordata</i>	8.bot	jan/10	São Carlos	2	1	3
3	<i>Eg. cordata</i>	X1	jan/10	São Carlos	6*	5	11
4	<i>Eg. cordata</i>	Y1	jan/10	São Carlos	5*	4	9
5	<i>Eg. cordata</i>	Z1	jan/10	São Carlos	2	1	3
6	<i>Eg. cordata</i>	X2	jan/10	São Carlos	2	1	3
7	<i>Eg. cordata</i>	Z2	jan/10	São Carlos	7	1	8
8	<i>Eg. cordata</i>	X3	jan/10	São Carlos	2	0	2
1	<i>Eg. townsendi</i>	3.bot	set/08	São Carlos	0	9	9
2	<i>Eg. townsendi</i>	14.bot	set/08	São Carlos	3	1	4
3	<i>Eg. townsendi</i>	1.bot	set/08	São Carlos	1	6	7
4	<i>Eg. townsendi</i>	9.bot	set/08	São Carlos	2	1	3
5	<i>Eg. townsendi</i>	11.bot	set/08	São Carlos	1	1	2
6	<i>Eg. townsendi</i>	3536.bot	dez/09	São Carlos	6*	1	7
1	<i>Ef. violacea</i>	B639		Gália	1	6	7



Figura 13: Ninho do gênero *Eg. townsendi* coletado em ninho armadilhas de bambu na UFSCar

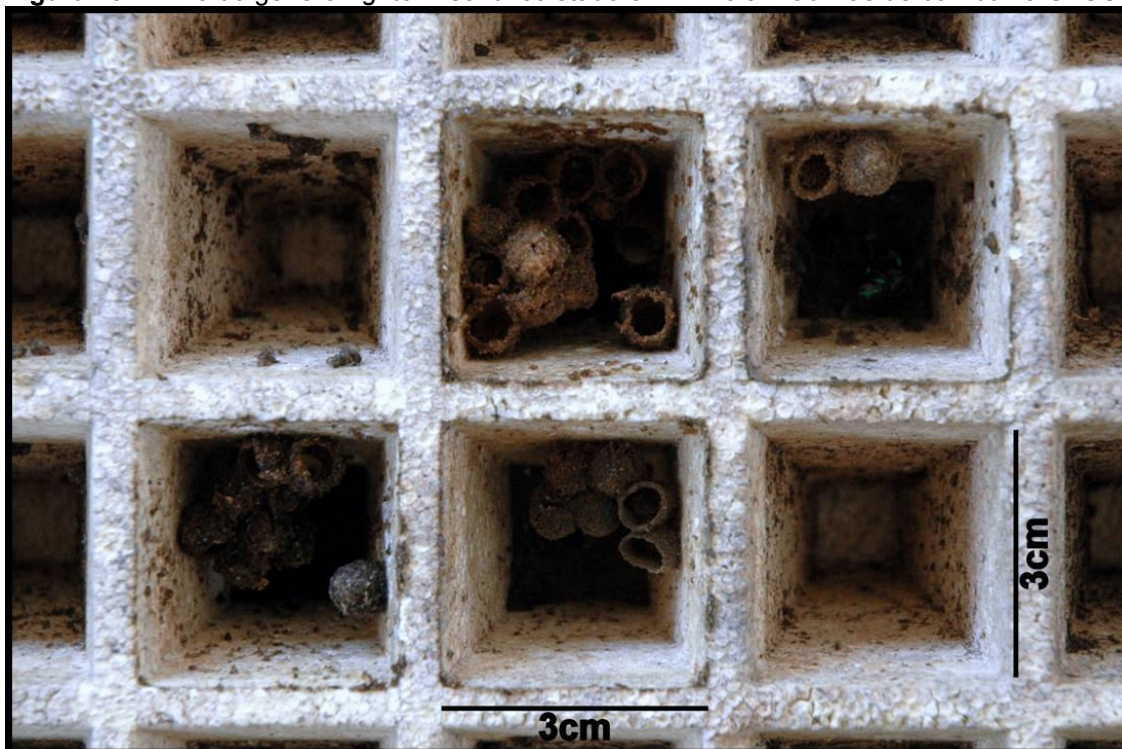


Figura 14: Ninhos de *Eg. townsendi* construídos em cavidades de bandeja de isopor de cultivo de mudas coletados na UFSCar.

A extração do DNA total foi realizada a partir da antena ou pernas dos adultos maceradas em nitrogênio líquido. Foram utilizados os procedimentos de fenol-clorofórmio (Sheppard & McPheron 1991) ou de Chelex® 100 (Walsh *et al.* 1991). As amostras foram amplificadas, via PCR, utilizando os microssatélites desenvolvidos por Souza *et al.* (2007), os nove locos de *Eg. cordata* foram utilizados nas análises dos ninhos de *Eg. cordata* e *Eg. townsendi* e os 11 locos desenvolvidos para *El. nigrita* foram utilizados na análise do ninho de *Ef. violacea*. As condições das reações de PCR foram as descritas pelo autor e foi utilizado o sequenciador automático MegaBace 1000-GE para as análises. A leitura dos eletroferogramas foi realizada no programa MegaBace Fragment Profiler versão 1.2.

Os genótipos obtidos dos eletroferogramas foram analisados no software Micro-Checker 2.2.3 (van Oosterhout *et al.* 2004) para identificar possíveis erros de genotipagem (*stuttering*, alelo *dropout* e alelo nulo). Cada ninho foi analisado pelo software Matesoft 1.0 (Moilanen *et al.* 2004) para o parâmetro F que indica o número de fêmeas responsáveis pela cria. Este parâmetro é o primeiro estimado pelo software e o resultado é correspondente a cada loco analisado, e indica o provável tipo de acasalamento ocorrido, se monogínico/poligínico. Este software foi desenvolvido especialmente para espécies haplodiplóides. O programa requer a estimativa de frequência alélica para a população estudada; neste caso, a frequência dada ao programa foi a estabelecida para as fêmeas presentes nos ninhos de cada espécie, já que o objetivo do estudo era determinar a maternidade e paternidade de um dado grupo de indivíduos.

4.4 Resultados

4.4.1 Ninhos de *Euglossa cordata*

Foram analisados oito ninhos de *Eg. cordata* num total de 43 indivíduos para nove locos microssatélites (17, 18, 30b, 35, 51, 24, 26, 30a e 37) descritos por Souza *et al.* (2007). O software Micro-checker não identificou erros de genotipagem, e os genótipos das fêmeas não acusaram a presença de alelos nulos. As análises F realizadas no software Matesoft revelaram que três dos ninhos eram poligínicos (X1, X2 e Z2), quatro ninhos (1704, 8, Y1 e X3) sugeriram monoginia e monandria e, em um ninho (Z1), os dados sugeriram que a fêmea se acasalou com dois machos.

Observando a segregação dos alelos para verificar o genótipo dos possíveis pais, foi determinado o número mínimo de mães e pais, dada a progênie de cada ninho. Em seis dos ninhos foi indicado o acasalamento entre uma fêmea e um macho. Em dois ninhos de *Eg. cordata*, X1 e Y1, foi verificado que a fêmea viva coletada era realmente a mãe de acordo com a análise dos locos microssatélites.

Os ninhos X1, X2 e Z2 foram indicados como poligínicos pelo software Matesoft. A análise de segregação de cada ninho possibilitou determinar que em X1, umas das fêmeas era a mãe e as outras duas fêmeas que estavam presas na resina não eram aparentadas aos demais indivíduos analisados, todos resultantes de um acasalamento único. Como exemplo, na Tabela 11 está demonstrado a segregação dos alelos analisados no ninho X1.

Nos ninhos X2 e Z2 também foram coletadas fêmeas presas em resina e que não pertenciam àquele ninho. Embora poucas células tenham restado para análise, o único indivíduo analisado de X2 e os quatro de Z2 também indicaram a ocorrência de um único acasalamento (Tabela 12)

Tabela 11: Segregação dos alelos no ninho X1 de *Eg. cordata* para os locos microssatélites (17, 18, 30b, 35, 51, 24, 26, 30a e 37). Destacadas em cinza estão as fêmeas que se encontravam presas na resina e que não são aparentadas aos demais indivíduos do ninho (F – fêmea; M – macho).

X1	17	18	30b	35	51	24	26	30a	37
MÃE*	211/220	171/174	109/121	168/171	226/232	205/208	164/176	144/144	181/184
F	211/217	165/171	109/115	168/168	229/232	193/205	173/176	144/147	181/181
F	217/220	165/174	115/121	168/171	226/229	??/?	??/?	??/?	??/?
F	217/220	165/174	109/115	168/171	229/232	193/205	173/176	144/147	184/184
M	211	171	109	171	232	205	164	144	184
M	211	171	109	168	226	205	176	144	184
M	220	171	121	171	232	208	164	144	181
M	220	174	121	171	232	208	164	144	184
M	211	174	109	171	226	205	176	144	184
F	217/238	165/195	115/135	168/171	223/223	196/205	170/182	147/147	175/178
F	220/238	168/180	109/109	168/168	223/223	202/208	179/185	141/144	178/178

4.4.2 Ninhos de *Euglossa townsendi*

Foram analisados seis ninhos de *Eg. townsendi*, totalizando 30 indivíduos analisados para sete locos microssatélites (17, 18, 35, 51, 24, 26, e 37) descritos por Souza *et al.* (2007). No software Micro-checker não foram identificados erros de genotipagem e os locos se mostraram polimórficos, exceto para o loco 24. A análise com os genótipos das fêmeas não acusaram a presença de alelos nulos. No

software Matesoft, na primeira análise F, o ninho 14 foi indicado como poligínico; os outros cinco ninhos revelaram que a progênie é explicada por monoginia-monandria.

No ninho 3536 foi verificado que a fêmea viva coletada era realmente a mãe pela análise dos microssatélites. Nos demais ninhos, com exceção do ninho 14, a segregação dos alelos para verificar o genótipo dos possíveis pais indicou a ocorrência de acasalamento único (Tabela 12).

4.4.3 Ninho de *Eufriesea violacea*

O único ninho analisado da espécie tinha sete indivíduos, uma fêmea e seis machos. Os indivíduos foram submetidos à amplificação para os 11 locos desenvolvidos para *El. nigrita* descritos por Souza *et al.* (2007). Destes, dois não amplificaram (1 e 05J), três foram monomórficos (13, 12b e 19J), e seis foram utilizados na análise de segregação (12a, 2J, 10J, 12J, 7J e 18J). A segregação dos locos neste único ninho indica o acasalamento de um macho com uma fêmea, embora este resultado deva ser considerado com cautela, visto que apenas uma filha estava presente na progênie (Tabela 12).

Tabela 12: Número de pais e mães responsáveis pela progênie e número de filhos e filhas analisados. A coluna intitulada "Extra" indica as fêmeas que estavam presas na resina dentro dos ninhos (*certificada a presença da mãe).

Número do ninho	Espécie	Ninho	Mãe	Pai	Filhos	Filhas	Extra
1	<i>Eg. cordata</i>	1704	1	1	3	2	-
2	<i>Eg. cordata</i>	8.bot	1	1	1	2	-
3	<i>Eg. cordata</i>	X1	1*	1	5	3	2
4	<i>Eg. cordata</i>	Y1	1*	1	4	4	-
5	<i>Eg. cordata</i>	Z1	1	2	1	2	-
6	<i>Eg. cordata</i>	X2	1	-	1	-	2
7	<i>Eg. cordata</i>	Z2	1	1	1	3	3
8	<i>Eg. cordata</i>	X3	1	1	-	2	-
1	<i>Eg. townsendi</i>	3.bot	1	1	7	-	-
2	<i>Eg. townsendi</i>	14.bot	1	2	1	3	-
3	<i>Eg. townsendi</i>	1.bot	1	1	6	1	-
4	<i>Eg. townsendi</i>	9.bot	1	1	1	2	-
5	<i>Eg. townsendi</i>	11.bot	1	1	1	1	-
6	<i>Eg. townsendi</i>	3536.bot	1*	1	1	5	-
1	<i>Ef. violacea</i>	B639	1	1	6	1	-

4.5 Discussão

A análise genética dos ninhos indica que o sistema de acasalamento nas espécies da tribo Euglossini analisadas neste estudo seja simples, ou seja, um macho e uma fêmea explicam as crias. Este sistema monogínico - monândrico tem sido usualmente reportado na literatura para os himenópteros (Strassmann 2001) e, mais especificamente, para o gênero *Euglossa* (Souza 2007; Zimmermann *et al.* 2009).

Não foram detectados desvios deste tipo de acasalamento que podem ser devido ao compartilhamento do ninho por outras fêmeas, comportamento já relatado na literatura para a espécie *Eg. cordata* (Augusto & Garófalo 2004). Na espécie *Eg. viridissima* o compartilhamento de ninhos é realizado por fêmeas aparentadas ou geralmente numa relação matrifilial (Cocom Pech *et al.* 2008). Os ninhos que apresentaram indivíduos com genótipos diferentes entre si continham poucas células ($n \leq 3$) e não foi possível calcular o grau de parentesco entre a prole (coeficiente r), especialmente em razão de que para tal estimativa, é necessário fornecer as frequências alélicas da população em estudo.

A reutilização do material ou local de nidificação já foi descrita para espécies dos gêneros de *Euglossa* como, por exemplo, em *Eg. cordata* (Garófalo 1985) e em *Eg. townsendi* (Augusto & Garófalo 2004). Nos ninhos de *Eg. cordata*, a presença de fêmeas não aparentadas cobertas com resina no ninho sugere que pode ter ocorrido reutilização do local e que, provavelmente, a fêmea fundadora encontrou as fêmeas mortas dentro do ninho e as recobriu com resina. Outra alternativa seria que a fêmea que fundou o ninho tenha sacrificado a fêmea ao nascer ou, por algum outro motivo, por exemplo, na disputa pelo local de nidificação. O comportamento agressivo já foi relatado para *Eg. cordata* nos ninhos onde haviam mãe ou filhas mais velhas que tinham o controle sobre a postura, com dominância física sobre as fêmeas subordinadas (Augusto & Garófalo 1994). Comportamentos agressivos não foram relatados em ninhos de *Eg. townsendi* e *Eg. viridissima* (Augusto & Garófalo 2004; Cocom Pech *et al.* 2008).

Dados recentes obtidos no laboratório em ninhos de *Eg. cordata*, *El. nigrita* e *Eg. townsendi* coletados em cidades no sudeste brasileiro (Araras, Rifaina e São Carlos), revelaram que, no início da construção do ninho de *El. nigrita*, detecta-se inicialmente apenas a postura de uma fêmea e depois, na sequência, observa-se a

postura de outras fêmeas. Em *Eg. cordata* e *Eg. townsendi*, os ninhos encontrados geralmente foram fundados por uma fêmea, acasalada com apenas um macho (Souza 2007), o que corrobora os resultados encontrados neste trabalho. A análise de um único ninho de *Ef. violacea* sugere que o acasalamento seja simples, e indica uma razão sexual desviada altamente para machos, o que corrobora dados de ninhos com razão desviada para machos (Peruquetti & Campos 1997).

O acasalamento único faz com que as relações de parentesco entre a progênie sejam altas e, portanto, pode favorecer a tolerância entre irmãs no compartilhamento do ninho, favorecendo a seleção por parentesco. O estreitamento destas relações e a ocorrência de especialização de trabalho, como, por exemplo, na busca por material de provisionamento (Otero *et al.* 2008), em algumas espécies de Euglossini sugerem que em ninhos de indivíduos geneticamente mais próximos possa estar a chave para o entendimento do comportamento social nos Apidae. A análise genética intranidal, aliada a observações dos ninhos em outros gêneros e espécies da tribo Euglossini, contribuirá para incrementar nosso entendimento da evolução social entre os corbiculados.

4.6 Referências Bibliográficas

- Augusto, S. C. & C. A. Garófalo (2004). Nesting biology and social structure of *Euglossa (Euglossa) townsendi* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Insectes Sociaux* 51: 400-409.
- Augusto, S. C. & C. A. Garófalo (1994). Comportamento das fêmeas nas associações formadas em ninhos de *Euglossa cordata* (Hymenoptera; Apidae; Euglossini). Encontro sobre abelhas, Ribeirão Preto, SP, Brasil 1: 171-181.
- Augusto, S. C. & C. A. Garófalo (2009). Bionomics and sociological aspects of *Euglossa fimbriata* (Apidae, Euglossini). *Genetics and Molecular Research* 8 (2): 525-538.
- Cameron, S. A. (2004). Phylogeny and biology of Neotropical orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Entomology* 49: 377-404.
- Cocom Pech, M. E.; W J. May-Itzá; L. A. Medina & J. J. G. Quezada-Euán (2008). Sociality in *Euglossa (Euglossa) viridissima* Friese (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Insectes Sociaux* 55: 428-433.
- Dressler, R. L. (1982). Biology of the orchid bees. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 373-394.
- Eberhard, W. G. (1988). Group nesting in two species of *Euglossa* bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 61 (4): 406-411.
- Garófalo, C. A. (1985). Social structure of *Euglossa cordata* nests (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Entomologia Generalis* 11 (1-2): 77-83.
- Garófalo, C. A. (1992). Comportamento de nidificação e estrutura de ninhos de *Euglossa cordata* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Revista Brasileira de Biologia* 52 (1): 187-198.
- Moilanen, A.; L. Sundström & J. S. Pedersen (2004). MateSoft: a program for deducing parental genotypes and estimating mating system. *Molecular Ecology Notes* 4 (4): 795-797.
- Otero, J.T.; P. Ulloa-Chacón; P. Silverstone-Sopkin & T. Giray (2008). Group nesting and individual variation in behavior and physiology in the orchid bee *Euglossa nigropilosa* Moure (Hymenoptera, Apidae). *Insectes Sociaux* 55: 320-328.
- Peruquetti, R. C. & L. A. O. Campos (1997). Aspectos da biologia de *Euplusia violacea* (Blanchard) (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Revista Brasileira de Zoologia* 14 (1): 91-97.

- Ramírez, S., R. L. Dressler & M. Ospina (2002). Abejas euglossinas (Hymenoptera: Apidae) de la Región Neotropical: Listado de especies con notas sobre su biología. *Biota Colombiana* 3 (1): 7-118.
- Ramírez-Arriaga, E.; J. I. Cuadrielo-Aguilar & E. Martínez-Hernández (1996). Nest structure and parasite of *Euglossa atroveneta* Dressler (Apidae: Bombinae: Euglossini) at Union Juarez, Chiapas, Mexico. *Journal of the Kansas Entomological Society* 69: 144-152.
- Santos, M. L. & C. A. Garófalo (1994). Nesting biology and nest re-use of *Eulaema nigrita* (Hymenoptera: Apidae, Euglossini). *Insectes Sociaux* 41: 99-110.
- Sheppard, W. S. & B. A. McPheron (1991). Ribosomal DNA diversity in Apidae. In: Smith, D.R. *Diversity in the genus Apis*. Boulder: Westview, p. 89-102.
- Soucy, S. L.; T. Giray & D. W. Roubik (2003). Solitary and group nesting in the orchid bee *Euglossa hyacinthine* (Hymenoptera, Apidae). *Insectes Sociaux* 50: 248-255.
- Souza, R. O. (2007). Estrutura genética e sociogenética das populações e ninhos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) determinadas por meio de microssatélites. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 78 p.
- Souza, R. O.; M. Cervini; M. A. Del Lama & J. Paxton (2007). Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology Notes* 6: 1352-1356.
- Strassmann J. (2001). The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera. *Insectes Sociaux* 48: 1-13.
- van Oosterhout, C.; W. F. Hutchinson; D. P. M. Wills (2004). Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Walsh, P. S.; D. A. Metzger & R. Higuchi (1991). Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10: 506-513.
- Zimmermann, Y.; D. W. Roubik; J. J. G. Quezada-Euan; R. J. Paxton & T. Eltz (2009). Single mating in orchid bees (*Euglossa*, Apinae): implications for mate choice and social evolution. *Insectes Sociaux* 56: 241-249.

5 CAPÍTULO 3. A estrutura populacional de *Euglossa cordata* vista pela variação do DNA mitocondrial

5.1 Resumo

O DNA mitocondrial é uma ferramenta importante no estudo de populações, pois possui características únicas como herança uniparental e alta taxa de mutação. Com o advento de técnicas mais modernas na análise molecular tem sido descobertas exceções a esse modelo. Este trabalho foi proposto para verificar a estrutura das populações de *Eg. cordata* por meio da análise de sequenciamento de genes mitocondriais *cyt b* e *COI*. O sequenciamento do produto direto de PCR exibiu variação em muitas posições de ambos os genes, 23 posições entre 485 pb analisados para *cyt b* e 29 posições entre 629 pb analisados para o fragmento de *COI*. Estes achados sugeriram a presença de heteroplasmia e para confirmar esta suposição foi realizada a clonagem dos fragmentos. Foi sequenciado cerca de dois a quatro clones para 12 indivíduos de *cyt b* e 13 indivíduos para *COI*. Os clones gerados apresentaram variação ainda maior, o que sugere, além da possível ocorrência de heteroplasmia, amplificação de pseudogenes conhecidos como *numts*. Não foi possível estabelecer com acurácia ao que se deve a variação encontrada e novos estudos deverão ser realizados a fim de que seja possível realizar as análises populacionais propostas, além de esclarecer sobre a variação encontrada.

5.2 Introdução

As características do DNA mitocondrial, herança uniparental e alta taxa de mutação comparada ao DNA nuclear (Brown *et al.* 1979), fazem desta molécula uma ferramenta importante para estudos de biologia evolutiva. O DNA mitocondrial tem sido utilizado em estudos de populações (Moritz *et al.* 1987) e após o sequenciamento completo do genoma mitocondrial de *Apis mellifera* (Crozier & Crozier 1993) foi possível um grande avanço nos estudos de outras espécies do grupo.

Os estudos com o mtDNA em populações naturais foram iniciados com a utilização de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição, conhecidos como RFLP (Awise *et al.* 1987). Em abelhas, a caracterização e estruturação populacional das subespécies no gênero *Apis* foi estabelecida com sucesso, sendo possível verificar uma distribuição diferencial dos haplótipos em diversos continentes (Garnery *et al.* 1992; Franck *et al.* 2001).

Na tribo Euglossini, apenas recentemente foram iniciados os estudos genéticos utilizando o DNA mitocondrial. Um dos primeiros estudos foi realizado por Dick *et al.* (2004) tratando da filogeografia de euglossíneos com o sequenciamento do gene *COI*. Neste estudo, foi verificada ausência de estruturação filogeográfica nas populações separadas pela cordilheira dos Andes devido provavelmente a especiação recente (quaternário), expansão populacional e grande fluxo gênico. No Brasil, seis populações de *Eg. fimbriata* provenientes de fragmentos de mata atlântica, localizados no norte do estado do Paraná, apresentaram pouca estruturação genética para marcadores RFLP (Suzuki *et al.* 2010).

Além dos marcadores mitocondriais, marcadores RAPD têm sido utilizados e, semelhantemente, demonstram uma grande variabilidade das populações de Euglossini. As populações de *El. nigrita* provenientes de fragmentos de mata de tamanhos distintos na região do estado de Minas Gerais foram analisadas, demonstrando que os fragmentos de tamanho médio apresentaram menor diversidade genética, enquanto que fragmentos grandes e pequenos apresentaram maiores diversidade e semelhança entre si (Waldschmidt *et al.* 2005). Fragmentos de mata localizados no norte do estado do Paraná também apresentaram grande variabilidade genética para populações de *Ef. violacea*, fornecendo indícios de que os machos se movimentam entre fragmentos próximos (Sofia *et al.* 2005). Embora

estes trabalhos relatem uma recente fragmentação deste tipo de habitat devido à ação antrópica, eles apresentam as populações de abelhas Euglossini com alta variabilidade genética e algum fluxo gênico entre os fragmentos.

Os trabalhos referentes às populações de abelhas Euglossini têm sido realizados usualmente em fragmentos de mata atlântica capturando machos atraídos por iscas armadilhas (Peruquetti *et al.* 1999; Brito & Rêgo 2001). Porém, as informações das populações utilizando apenas machos capturados em iscas odores podem gerar inferências errôneas sobre a estrutura genética (Cerântola *et al.* 2010). A captura de machos e fêmeas em flores possibilitou demonstrar que as populações de *Eg. cordata* em cinco cidades no estado de São Paulo estão fortemente estruturadas para o DNA mitocondrial (RFLP), indicando um comportamento filopátrico das fêmeas (López-Urbe 2006). Por outro lado, a análise de microssatélites com a mesma espécie demonstrou ausência de estruturação genética em onze populações do mesmo estado, o que pode ser atribuído à dispersão de machos (Cerântola *et al.* 2010).

Devido à diferença entre os resultados obtidos com o uso de marcadores genéticos distintos, DNA mitocondrial e microssatélites, e visto que a maioria dos trabalhos realizados com espécies desta tribo indique uma alta variabilidade genética nas populações do Brasil, este trabalho foi proposto para confirmar, a partir de dados de sequências de genes mitocondriais, se as populações de *Eg. cordata* do estado de São Paulo são estruturadas.

5.3 Material e Métodos

Foram amostradas 11 cidades do estado de São Paulo (Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro, Piracicaba e Bertioga) e uma cidade do estado da Paraíba (João Pessoa) como controle (Tabela 13).

Tabela 13: Informação geográfica dos sítios de coleta.

Cidades	Sigla	Latitude	Longitude
Rifaina	RIF	20°05'96''S	47°25'11''W
Pedregulho	PED	20°16'55''S	47°27'34''W
Franca	FRA	20°32'19''S	47°24'03''W
Ribeirão Preto	RIB	21°10'28''S	47°48'99''W
Jaboticabal	JAB	21°01'64''S	48°04'62''W
Araraquara	ARA	21°47'61''S	48°10'73''W
São Carlos	SC	22°00'27''S	47°53'00''W
Leme	LEM	22°11'43''S	47°23'44''W
Rio Claro	RC	22°24'55''S	47°33'86''W
Piracicaba	PIR	22°43'91''S	47°38'36''W
Bertioga	BER	23°51'16''S	46°08'19''W
João Pessoa (PB)	JP	7°06'54''S	34°51'47''W

Nas cidades do interior - Rifaina, Pedregulho, Franca, Ribeirão Preto, Jaboticabal, Araraquara, São Carlos, Leme, Rio Claro e Piracicaba - as abelhas foram coletadas com sacos plásticos ao visitarem as flores de *Thevetia peruviana*, em árvores que se localizavam nas calçadas destas localidades. Nas cidades litorâneas de Bertioga e João Pessoa (PB), a coleta foi realizada com isca-armadilha utilizando o composto químico atrativo cineol. Os indivíduos coletados foram levados ao laboratório e mantidos em freezer -20°C até a extração de DNA.

5.3.1 A) Sequenciamento dos genes mitocondriais por produto direto de PCR

A extração do DNA total das amostras foi realizada utilizando o protocolo de fenol-clorofórmio (Sheppard & McPheron 1991) ou o protocolo Chelex® 100 (Walsh *et al.* 1991). No protocolo fenol-clorofórmio foi macerado o tórax de cada abelha, enquanto na extração com Chelex® 100 foram maceradas as pernas posteriores. Algumas amostras já se encontravam no banco de DNA do laboratório (LGEH – UFSCar).

Um fragmento do gene mitocondrial *cyt b* foi amplificado utilizando os *primers* descritos para *Apis mellifera*, CR091A e CR091B (Crozier *et al.* 1991). Para a amplificação de parte do gene *COI*, foi utilizado o *primer reverse* descrito por Dick *et al.* (2004) para abelhas Euglossini; já o *primer forward* foi desenhado por nós, com a sequência: 5'- GATATTAATCCTAAAAAATGTTGAGG – 3.

As reações de amplificação do gene *cyt b* foram realizadas nas seguintes condições: 2,5 µL de dNTPs 10 mM, 1,25 µL de MgCl₂ 50 mM, 2,5 µL de tampão Fermentas 10x, 1 µL de cada *primer* (R e F) a 12,5 µM, 1 µL de Taq DNA polimerase

(Fermentas, 1 U/ μ L), 1 μ L da solução de DNA e água para completar volume final de 25 μ L. Utilizamos o programa de amplificação com 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 20 segundos e 70°C por 1 minuto.

As reações de amplificação do gene *COI* foram realizadas nas seguintes condições: 2,5 μ L de dNTPs 10 mM, 1 μ L de MgCl₂ 50 mM, 2,5 μ L de tampão Fermentas 10x, 0,5 μ L de cada oligo (R e F) a 12,5 μ M, 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (Fermentas, 5 U/ μ L), 1 μ L de DNA extraído e água para completar volume final de 25 μ L. Utilizamos o programa de amplificação inicial com 4 ciclos de 94°C por 30 segundos, 48°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 20 segundos e 72°C por 45 segundos.

Os fragmentos amplificados para ambos os genes foram detectados em gel de agarose 1% corado com Gel Red™ e visualizado sob luz UV. Confirmado o sucesso da amplificação, os produtos foram purificados com 1U de SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, GE Healthcare) e 10U de *ExoI* (Exonuclease I, GE Healthcare) para cada 8 μ L de PCR. A mistura foi incubada a 37°C por 1 hora e a 80°C por 15 minutos; em seguida, 1 μ L da mistura foi visualizada em gel de agarose 1% corado com Gel Red™ e visualizado em luz UV para quantificação visual.

As amostras purificadas foram enviadas para o laboratório da FCAV da UNESP de Jaboticabal para serem sequenciadas com os respectivos *primers* em sequenciador automático ABI 750 (Applied).

Os eletroferogramas foram visualizados no software CodonCode 1.6.3 (CodonCode, Dedham, Massachusetts, United States), editados e alinhados no software BioEdit 7.0.5.3 (Hall 1999) utilizando a ferramenta ClustalW e a obtenção das sequências consenso foi possível utilizando o alinhamento dos eletroferogramas de ambas as fitas (*forward* e *reverse*).

5.3.2 B) Sequenciamento dos genes mitocondriais por clonagem dos produtos de PCR

As reações de amplificação e clonagem foram realizadas com a colaboração do Laboratório de Genética de Populações e Evolução (DGE – UFSCar) sob coordenação do Prof. Dr. Reinaldo Otávio Alvarenga Alves de Brito.

5.3.2.1 Reações de Amplificação

Os genes mitocondriais foram amplificados utilizando os mesmos *primers*. As reações de amplificação dos genes para a clonagem foram modificadas, foi reduzido o número de ciclos a fim de reduzir os possíveis erros de amplificação.

As reações de amplificação do gene *cyt b* foram realizadas nas seguintes condições: 2,5 µL de dNTPs 10 mM, 1,25 µL de MgCl₂ 50 mM, 2,5 µL de tampão Fermentas 10x, 0,5 µL de cada oligo (R e F) a 12,5 µM, 0,2 µL de Taq DNA polimerase (Fermentas, 5 U/µL), 1µL de DNA extraído e água para completar volume final de 25 µL. Utilizamos o programa de amplificação com 32 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 20 segundos e 70°C por 1 minuto.

As reações de amplificação do gene *COI* foram realizadas nas seguintes condições: 2,5 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL de MgCl₂ 50 mM, 2,5 µL de tampão Fermentas 10x, 0,5 µL de cada oligo (R e F) a 12,5 µM, 0,2 µL de Taq DNA polimerase (Fermentas, 5 U/µL), 1µL de DNA extraído e água para completar volume final de 25 µL. Utilizamos o programa de amplificação com 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguidos com temperatura final de extensão por 5 minutos a 72°C.

Os produtos das reações de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% com brometo de etídeo em luz UV.

5.3.2.2 Purificação do PCR

Os produtos de PCR obtidos foram purificados através do protocolo de precipitação diferencial com PEG (Polietileno Glicol) 8000 (Lis & Schleif 1975) modificado pelo Laboratório de Genética de Populações e Evolução (DGE – UFSCar).

A solução de Polietileno Glicol 8000 foi preparada a 20% com 2,5M NaCl. O volume do produto de PCR foi adicionado à solução de PEG na proporção 1:1; a mistura foi homogeneizada e colocada em termo bloco a 37°C por 15 minutos. Após esta etapa, foi iniciado o processo de lavagem. Por duas vezes consecutivas, a mistura foi centrifugada a 13000 rpm por 2 minutos, foi retirado o sobrenadante e adicionado 125 µL de etanol 80%. Após a segunda lavagem, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e o precipitado foi colocado em termo bloco para secagem a 50°C por 5 minutos, pelo menos, até estar completamente seco. Depois de seco, o *pellet* foi eluído com 27 µL de água miliQ.

Para quantificação e pureza do PCR purificado foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo e visualizados em luz UV.

5.3.2.3 Clonagem

Para isolar cada fita amplificada foi clonado o produto de PCR. Para as reações de ligação foram utilizados os plasmídeos PTZ57R/T com o kit de clonagem InsTAclone (Fermentas).

O produto de ligação foi utilizado na transformação de bactérias ultracompetentes da cepa DH5 α . A reação foi colocada em gelo por 30 minutos, depois em termobloco a 42°C por 2 minutos e novamente em gelo por 5 minutos. Para crescimento das bactérias, foi adicionado à reação 500 μ L de meio LB líquido e colocados em termobloco a 37°C por 1 hora. A solução foi centrifugada a 3000 rpm por 2 minutos e foi descartado 400 μ L do sobrenadante, os 100 μ L restantes foram homogeneizados.

As colônias recombinantes foram inoculadas em placas com meio sólido de cultura seletivo com adição de ampicilina (0,1 μ g/ μ L) a 37°C por cerca de 18 horas. Foram repicadas cerca de 10 colônias, e, para avaliar a presença do inserto, foi realizado PCR direta de colônia (Dallas-Yang *et al.* 1998) com os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse* que amplificam regiões flanqueadoras da região do inserto no clone.

5.3.2.4 Reações de Amplificação de M13

Para a realização da PCR, as colônias foram eluídas em 20 μ L de água por 5 minutos a 80°C para a lise das células e liberação dos plasmídeos.

As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: 2,5 μ L de dNTPs 100 mM, 2,5 μ L de tampão a 25 mM, 2,5 μ L de cada oligo (R e F) a 2 pmol, 0,15 μ L de Taq DNA polimerase (Fermentas, 5 U/ μ L), 1 μ L de DNA e água até completar volume final de 25 μ L. Utilizamos o seguinte programa de amplificação com temperatura inicial de 94°C por 1 minuto, 3 ciclos de 94°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 20 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com temperatura final de extensão de 72°C por 10 minutos.

Os insertos foram purificados com PEG (Polietileno Glicol) 8000 (Lis & Schleif 1975) e o *pellet* foi ressuscitado em água. Para verificar o sucesso das reações, os

insertos foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo sob luz UV.

5.3.2.5 Sequenciamento dos insertos

Os insertos purificados foram enviados para o laboratório da FCAV da UNESP de Jaboticabal para serem sequenciadas com os respectivos *primers* M13 em sequenciador automático ABI 750 (Applied).

5.3.2.6 Análise das sequências

Os eletroferogramas foram visualizados no software CodonCode 1.6.3 (CodonCode, Dedham, Massachusetts, United States) e editados e alinhados no software BioEdit 7.0.5.3 (Hall 1999) utilizando a ferramenta ClustalW e a obtenção das sequências consenso foi possível utilizando o alinhamento dos eletroferogramas de ambas as fitas (*forward* e *reverse*).

5.4 Resultados

5.4.1 A) Sequenciamento dos genes mitocondriais por produto direto de PCR

Foram sequenciadas 207 amostras para um fragmento de 485 pb do gene *cyt b* e 186 amostras para uma região de 629 pb do gene *COI* (Tabela 14).

Tabela 14: Número de indivíduos, com a respectiva procedência geográfica, que tiveram seus genes mitocondriais *cyt b* e *COI* sequenciados.

Cidades	<i>cyt b</i>	<i>COI</i>
Rifaina	17	19
Pedregulho	16	17
Franca	17	16
Ribeirão Preto	17	17
Jaboticabal	19	16
Araraquara	19	16
São Carlos	18	19
Leme	19	17
Rio Claro	17	17
Piracicaba	20	16
Bertioga	16	16
João Pessoa	12	0
TOTAL	207	186

Todas as amostras analisadas para o gene *cyt b* apresentaram algumas posições na sequência com dois picos, ou também não houve concordância entre as

fitas *forward* e *reverse*, totalizando 23 sítios com este tipo de variação dos 485 pb analisados. A Figura 15 ilustra a ocorrência de dois picos na mesma posição em uma das fitas, *forward* ou *reverse*.

Das 186 amostras analisadas para o gene *COI*, a maioria das sequências analisadas também apresentou discordância entre as fitas *forward* e *reverse* (Figura 16) e a presença de dois picos em uma posição da mesma fita, totalizando 29 sítios dos 629 pb analisados. As variações em ambos os genes foram repetidamente observadas em amostras sequenciadas em sequenciadores diferentes (ABI e MegaBACE 1000), bem como em amostras re-amplificadas e re-sequenciadas.

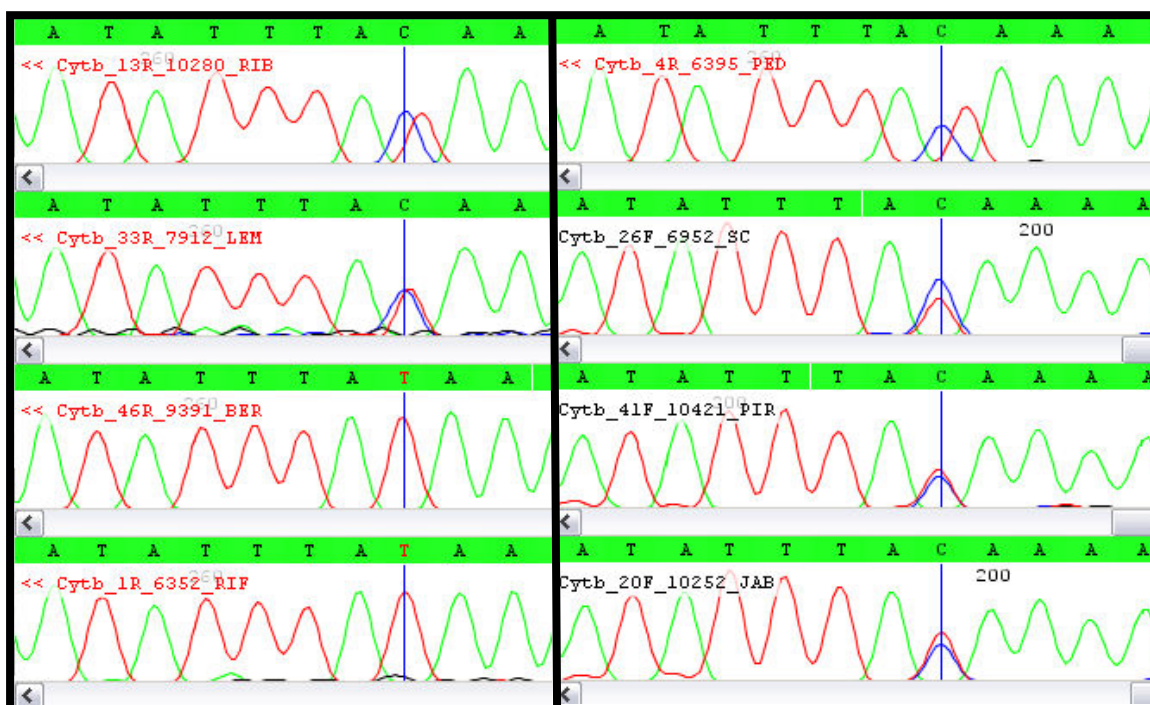


Figura 15: Dois picos na posição 258 no sequenciamento do gene *cyt b*. Em vermelho, as fitas *reverse*; em preto, as fitas *forward*, com o número do eletroferograma, número de extração e sigla da cidade correspondente (RIB - Ribeirão Preto, LEM - Leme, BER - Bertioga, RIF - Rifaina, PED - Pedregulho, SC - São Carlos, PIR – Piracicaba, JAB - Jaboticabal).

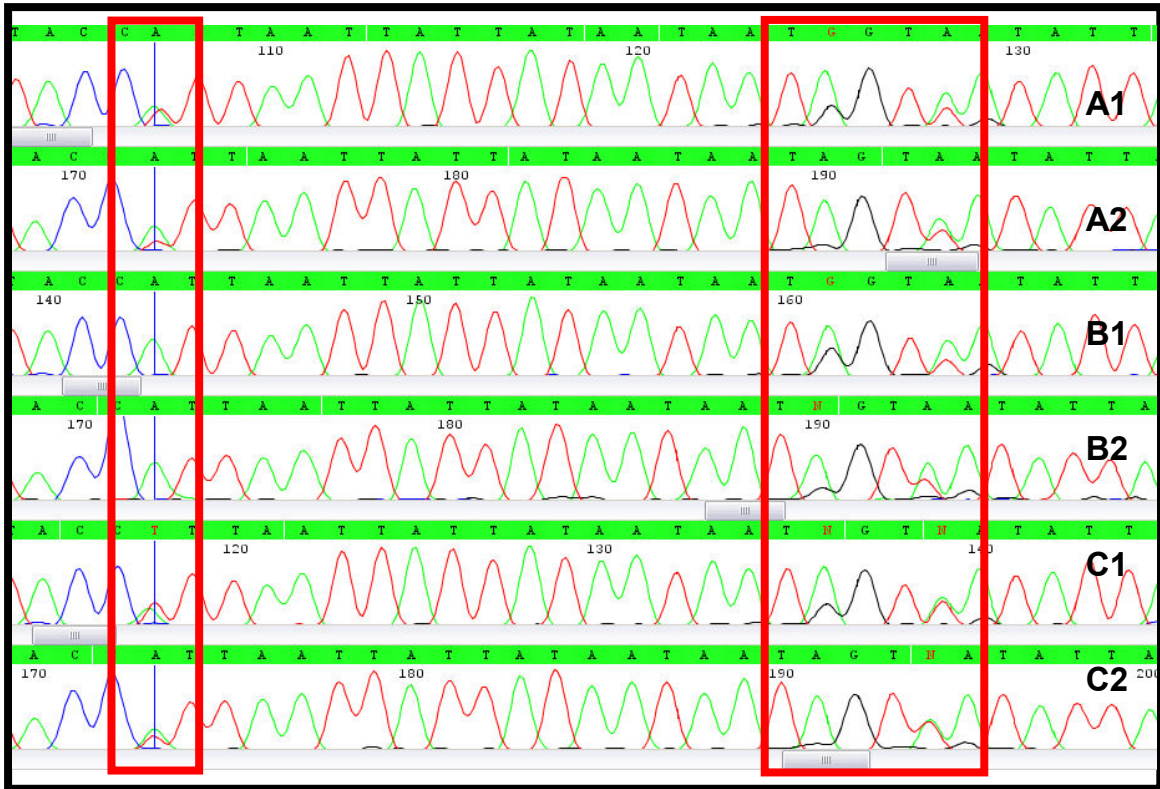


Figura 16: Variações de bases entre as fitas *forward* e *reverse* do gene *cyt b* na mesma posição. Indicadas em vermelho as posições 168, 186 e 189. (A- Pedregulho, B- Rifaina, C- Ribeirão Preto, 1- fita *forward*, 2- fita *reverse*).

Estas variações entre uma base ou outra nas sequências *forward* e *reverse* foram apontadas com o código IUB de bases degeneradas (Tabela 15). Duas sequências de cada população foram alinhadas para demonstrar as variações presentes em diferentes indivíduos e diferentes populações.

Tabela 15: Código de bases degeneradas IUB.

Código degenerado	Base
W	A ou T
R	A ou G
K	G ou T
S	G ou C
Y	C ou T
M	A ou C

Para o fragmento *cyt b*, não estão representadas as sequências referentes às populações de Rio Claro e João Pessoa, pois as amostras destas localidades foram sequenciadas em sequenciador Mega Bace 1000 (Tabela 16).

Tabela 16: Sítios variáveis no fragmento do gene *cyt b* de dois indivíduos de cada população de *Eg. cordata*. (RIF: Rifaina; PED: Pedregulho; FRA: Franca; RIB: Ribeirão Preto; JAB: Jaboticabal; ARA: Araraquara; SC: São Carlos; LEM: Leme; PIR: Piracicaba; BER: Bertiooga).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
<i>cytb</i>		69	85	100	102	114	168	186	189	190	228	235	258	316	319	324	346	363	369	388	392	415	419	447
1	RIF							R			W			Y	M	R	Y				S	R	S	
2	RIF	Y	Y	R	W	Y	W		W		W	R	Y	Y	M				W		S			W
3	PED							R			W				M	R	Y				S	R	S	
4	PED		Y					R			W				M						S	R	S	
5	FRA	Y	Y	R	W	Y	W	R	W		W	R	Y	Y	M	R			W		S	R	S	W
6	FRA							R		R					M						S	R	S	
7	RIB	Y	Y	R	W	Y	W	R	W		W	R	Y	Y	M				W		S	R	S	W
8	RIB							R			W			Y	M		Y				S	R	S	
9	JAB	Y	Y	R	W	Y	W	R	W	R	W	R	Y	Y	M	R			W		S	R	S	W
10	JAB	Y	Y	R	W	Y	W	R	W		W	R	Y	Y	M	R			W		S		S	W
11	ARA	Y	Y	R		Y	W	R	W		W	R	Y	Y	M	R			W		S			W
12	ARA	Y	Y	R	W	Y	W	R	W		W	R	Y	Y	M	R			W		S	R	S	W
13	SC	Y	Y	R	W	Y	W	R	W		W	R	Y	Y	M	R			W		S			W
14	SC							R		R			Y		M				W	M	S	R	S	
15	LEM	Y	Y	R	W	Y	W	R	W		W	R	Y	Y	M	R			W		S	R	S	W
16	LEM		Y	R	W	Y	W	R	W		W	R	Y	Y	M				W		S	R	S	W
17	PIR		Y	R	W	Y	W	R	W		W	R	Y	Y	M				W		S	R	S	W
18	PIR	Y	Y	R	W	Y	W	R	W		W	R	Y		M				W		S		S	
19	BER		Y			Y		R	W		W	R		Y	M			Y	W		M	S	R	S
20	BER		Y			Y		R	W		W	R		Y	M			Y	W		M	S	R	S

Para o fragmento do gene *COI*, semelhantemente, duas sequências de cada população foram alinhadas para demonstrar as variações presentes em diferentes indivíduos e em diferentes populações. As variações nas posições encontradas estão apontadas utilizando o código de bases degeneradas da IUB (Tabela 17).

Tabela 17: Sítios variáveis no fragmento do gene *COI* de dois indivíduos de cada população de *Eg. cordata*. (SC: São Carlos; RIF: Rifaina; PED: Pedregulho; JAB: Jaboticabal; LEM: Leme; ARA: Araraquara; PIR: Piracicaba; RC: Rio Claro; RIB: Ribeirão Preto; FRA: Franca; BER: Bertiooga).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
<i>COI</i>		54	81	108	114	122	168	174	180	206	243	263	270	284	288	323	336	341	354	362	378	390	396	435	477	483	489	519	556	566
1	SC			R				M				S		Y	R			W						R	W	W		R	Y	
2	SC																												R	Y
3	RIF																													
4	RIF		R		W							R		Y	R							R	W						R	Y
5	PED													Y	R				W										R	Y
6	PED			R		R		M				S		Y	R				W						R	W	W	W	Y	Y
7	JAB			R								S		Y	R				W						R	W	W	W	R	Y
8	JAB											S		K	Y	R			W						R	W	W	W	R	Y
9	LEM		R		W							R		Y										R	W				R	Y
10	LEM			R		R		M				S		Y	R	Y		W	Y						R	W	W	W		
11	ARA			R		R								K	Y	R			W						R		W		R	Y
12	ARA			R		R		M				S		Y	R				W	Y					R	W	W	W	R	
13	PIR		R		W	R		M			W	S	R		Y	R	Y						R	W	R	W	W	W	R	
14	PIR													Y					W						R				R	Y
15	RC		R		W						W	S					R								W				R	Y
16	RC																R			W									R	Y
17	RIB			R					Y			S		K		R			W				R		R	W	W	W	R	Y
18	RIB				R	K	M	Y	Y			S		Y	R			Y	W										W	
19	FRA		R		W			M		W	S	R	K	Y	R								R	W	R	W	W	W	R	
20	FRA				R			M	Y		S			Y	R				W	Y					R		W	W	R	
21	BER				W			M	Y		W			K	Y	R				Y	R	R		W	R	W	W	W	R	
22	BER	Y			W			M		W				Y	R					Y	R	R		W	R	W	W	W	R	Y

Como visto, os dois genes mitocondriais, *cyt b* e *COI*, apresentaram dois picos em uma mesma posição para as populações de *Eg. cordata*. Nestas posições, ou a concordância de pareamento entre as bases das bases das sequências *forward* e *reverse* não era observada, ou as fitas apresentavam dois picos, ainda que um dos picos com maior intensidade que o segundo. Como foi detectada realmente a presença desta variação ao repetir o sequenciamento de produto direto de PCR em

várias amostras, foi feita a tentativa de tentar interpretar esta variação de modo a possibilitar a realização das análises populacionais.

Dentre a variação presente nas 23 posições dos 485 pb do gene *cyt b* (Apêndice 3), 39,1% dos sítios correspondem à primeira base do códon de leitura, 8,7% à segunda base e 52,2% à terceira base (Tabela 18).

Tabela 18: Posição no códon da variação para o gene *cyt b* nas posições.

Posição	Código	Códon	Posição códon
69	Y	ATY	3
85	Y	YTA	1
100	R	RTW	1
102	W	RTW	3
114	Y	TTY	3
168	W	CCW	3
186	R	ATR	3
189	W	GTW	3
190	R	RTA	1
228	W	ACW	3
235	R	RTA	1
258	Y	TAY	3
316	Y	YTA	1
319	M	MCT	1
324	R	TTR	3
346	Y	YAT	1
363	W	GGW	3
369	W	CCW	3
388	M	MAT	1
392	S	TSA	2
415	R	RAA	1
419	S	CSA	2
447	W	TCW	3

Dentre a variação presente nas 29 posições dos 629 pb do gene *COI* (Apêndice 4), 6,9% dos sítios correspondem à primeira base do códon de leitura, 24,1% à segunda base e 69% à terceira base (Tabela 19).

Tabela 19: Posição no códon da variação para o gene *COI* nas posições.

Posição	Código	Códon	Posição códon
54	Y	GTY	3
81	R	GGR	3
108	R	GAR	3
114	W	GGW	3
122	R	GRA	2
168	K	GGK	3
174	M	TTM	3
180	Y	TTY	3
206	Y	AYT	2
243	W	ACW	3
263	S	SCT	1
270	R	CCR	3
284	K	GKT	2
288	Y	TTY	3
323	R	ARA	2
336	Y	TCY	3
341	Y	AYA	2
354	W	GGW	3
362	Y	TYA	2
378	R	GGR	3
390	R	GGR	3
396	R	ATR	3
435	W	ACW	3
477	R	GGR	3
483	W	GTW	3
489	W	TCW	3
519	W	CCW	3
556	R	RTT	1
566	Y	TYT	2

Foi levantada a hipótese da ocorrência de heteroplasmia nestas abelhas. Como a identificação taxonômica das espécies do gênero *Euglossa* é difícil, dada a semelhança morfológica entre as espécies, para fins comparativos foram sequenciados 12 indivíduos de *Eg. fimbriata*, uma espécie com distribuição geográfica similar e também abundante no estado de São Paulo. Foram analisados machos coletados com compostos químicos, sendo sete indivíduos coletados em São Carlos e quatro indivíduos provenientes de Ubatuba. A região amplificada foi parte do gene *cyt b* e as condições de amplificação e sequenciamento do produto direto de PCR foram as mesmas utilizadas para *Eg. cordata*. O sequenciamento de *Eg. fimbriata* apresentou 14 posições dos 485 pb com variação (dados não apresentados), semelhante a algumas posições observadas em *Eg. cordata* e não ajudou a interpretar os resultados.

Realizamos então a clonagem dos produtos amplificados de ambos os genes de *Eg. cordata* para caracterizar as diferentes sequências oriundas do mesmo indivíduo.

5.4.2 B) Sequenciamento dos genes mitocondriais por clonagem dos produtos de PCR

Para interpretar as variações encontradas nos vários sítios do sequenciamento direto do produto de PCR, foram sequenciados quatro clones de cada indivíduo de *Eg. cordata*, tanto para a fita *forward* como *reverse*, a fim de poder identificar as diferenças encontradas. Em alguns indivíduos, o procedimento da clonagem ou a amplificação do PCR do M13 não foi satisfatória, razão pela qual um menor número de clones foi sequenciado.

Foram obtidas 47 sequências do gene *cyt b* de 12 indivíduos de cidades diferentes (Tabela 20), enquanto que para o gene *COI* foram obtidas 48 sequências de 13 indivíduos de cidades diferentes (Tabela 21).

Tabela 20: Relação dos indivíduos e número de clones sequenciados para o gene *cyt b*.

<i>cyt b</i>	Número do indivíduo	Número de clones	Cidade	Sexo
1	6339	4	São Carlos	F
2	6962	4	São Carlos	F
3	7910	4	Leme	F
4	9353	4	Bertioga	M
5	10263	4	Jaboticabal	F
6	10317	4	Piracicaba	F
7	6350	3	Pedregulho	F
8	6386	4	Pedregulho	F
9	8525	4	Araraquara	F
10	9396	4	Rio Claro	F
11	10265	4	Jaboticabal	M
12	10270	4	Piracicaba	F

Tabela 21: Relação dos indivíduos e número de clones sequenciados para o gene *COI*.

<i>COI</i>	Número do indivíduo	Número de clones	Cidade	Sexo
1	6387	4	Pedregulho	F
2	6389	4	Pedregulho	M
3	6981	4	São Carlos	F
4	7910	4	Leme	F
5	8522	4	Araraquara	M
6	8525	4	Araraquara	F
7	9353	4	Bertioga	M
8	9396	2	Rio Claro	F
9	9490	4	Leme	F
10	9523	4	Leme	F
11	10263	2	Jaboticabal	F
12	10265	4	Jaboticabal	M
13	10270	4	Piracicaba	F

Cada clone foi analisado individualmente para a fita *forward* e *reverse* e foi obtida a sequência consenso. Após esta análise, todos os clones de cada indivíduo foram alinhados no software BioEdit 7.0.5.3 (Hall 1999) utilizando a ferramenta ClustalW. A maioria dos sítios que apresentavam variação em uma mesma posição no sequenciamento direto do produto de PCR gerou clones com diferentes bases (Figura 17).

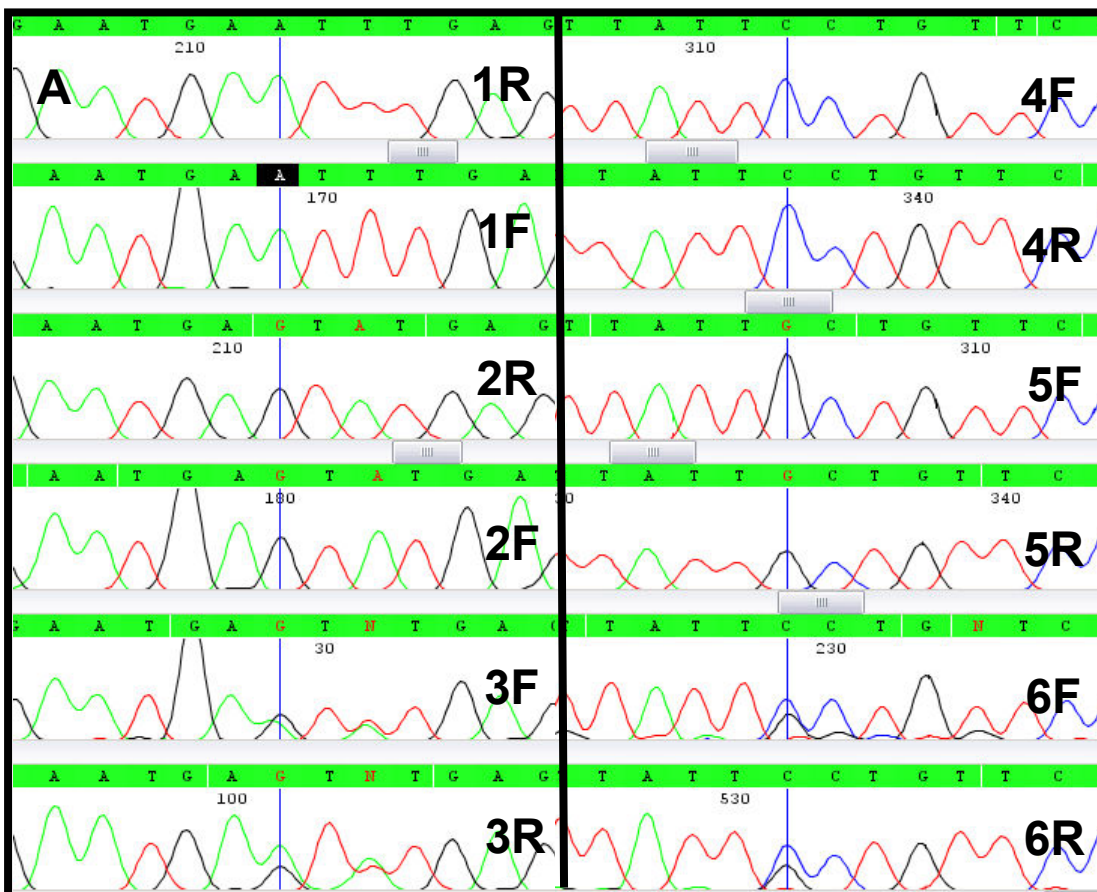


Figura 17: A) Posição 100 do sequenciamento do gene *cyt b*. Indicado em azul (1 e 2 clones; 3 produto de PCR do indivíduo 10317 de Piracicaba). B) Posição 262 do sequenciamento do gene *COI*. Indicado em azul (4 e 5 clones; 6 produto de PCR do indivíduo 9353 de Bertioga). F - *forward*; R - *reverse*.

Os clones de cada indivíduo referentes aos genes *cyt b* e *COI* apresentaram muitas diferenças entre si. Na tentativa de interpretar o significado da alta variação observada foi construída uma rede haplotípica por parcimônia estatística (Templeton *et al.* 1992) utilizando o software TCS 1.21 (Clement *et al.* 2001). Usualmente, cada clone obtido de um indivíduo gerou uma sequência nucleotídica diferente (Tabela 22).

Tabela 22: Quantidade de clones sequenciados e número de haplótipos gerados.

	<i>cyt b</i>	Clones	Haplótipos		<i>COI</i>	Clones	Haplótipos
1	6339	4	3	1	6387	4	3
2	6962	4	2	2	6389	4	4
3	7910	4	2	3	6981	4	4
4	9353	4	4	4	7910	4	4
5	10263	4	3	5	8522	4	2
6	10317	4	4	6	8525	4	3
7	6350	3	3	7	9353	4	4
8	6386	4	3	8	9396	2	2
9	8525	4	4	9	9490	4	3
10	9396	4	2	10	9523	4	4
11	10265	4	3	11	10263	2	2
12	10270	4	4	12	10265	4	3
				13	10270	4	4

Não foram encontrados somente dois tipos de DNA mitocondrial em cada indivíduo. A presença de *indels* em genes que desempenham funções muito importantes na cadeia oxidativa sugere que poderia estar ocorrendo a amplificação de pseudogenes e/ou a presença de *numts*. Particularmente no gene *COI*, um dos clones de três indivíduos diferentes de Leme e um clone do indivíduo de Piracicaba apresentaram uma inserção/deleção de 8 pb (Figura 18 e Figura 19).

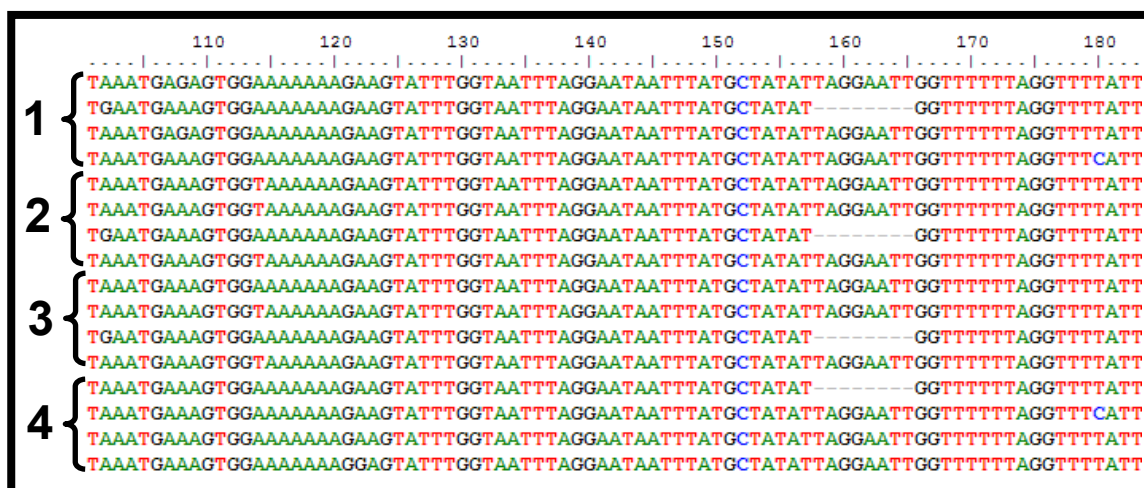


Figura 18: Presença de um *indel* de oito pb em quatro sequências de clones no gene *COI* entre as posições 158 e 165. Os números são referentes aos clones de cada indivíduo (1 – 7910; 2 – 9490; 3 – 9523; 4 – 10270).

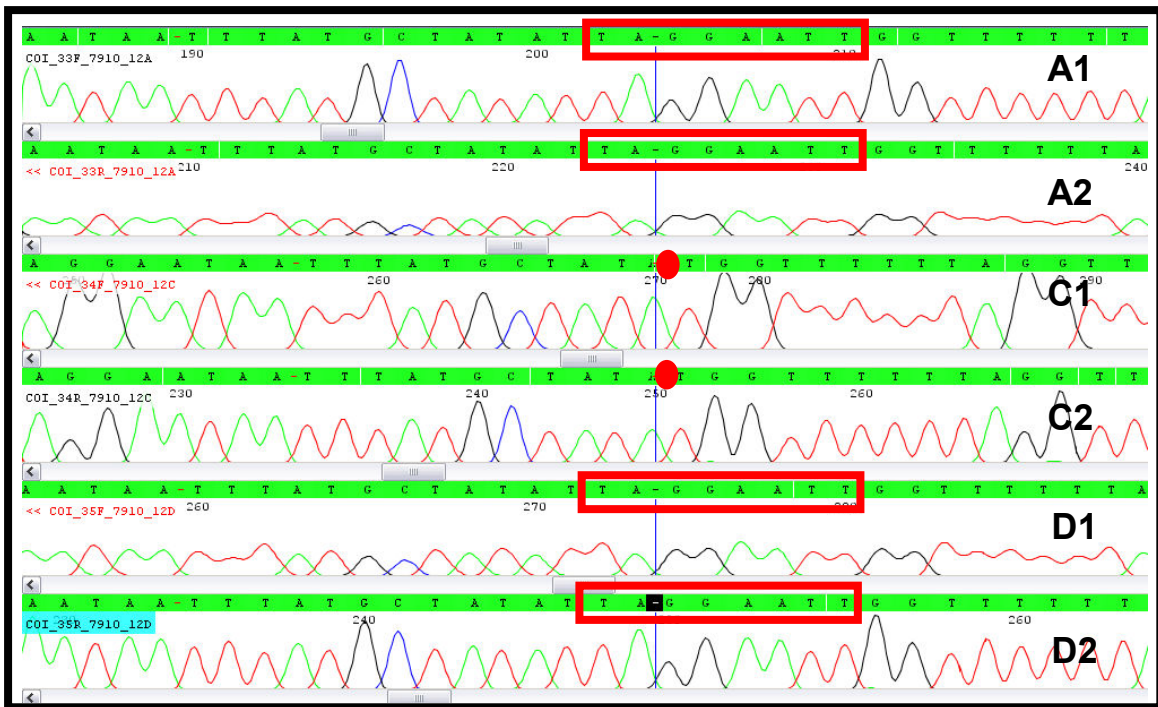


Figura 19: Eletroferograma de três clones do indivíduo 7910. Clone A, C e D. Em vermelho estão destacadas as bases que estão faltando na sequência do clone C. (1 – forward; 2 – reverse).

Devido à presença de *indels* foi realizada a tradução dos clones. Para comparação foi utilizada a sequência referente à mesma região do gene que se encontra na rede (NCBI). Para o gene *cyt b* foi utilizada a sequência correspondente de uma espécie próxima, *Eg. cognata* (NCBI: AAY22985.1). Para o gene *COI* foi utilizada a sequência presente na rede do gene correspondente a *Eg. cordata* (NCBI: ACF72625.1). A presença dos *indels*, seja um ou oito, altera toda a leitura dos aminoácidos durante a tradução. No caso do gene *COI*, os clones que apresentaram uma deleção de 8 pb podem ser alinhados com a sequência traduzida dos demais, se na posição referente à deleção não forem considerados três aminoácidos. Foi realizado então o alinhamento de todas as sequências dos clones, e todas as sequências foram novamente editadas, com a correção de alguns polimorfismos únicos, pois poderiam ter sido causados pela incorporação incorreta da polimerase durante a PCR. Com esta correção, as sequências foram novamente alinhadas e foi utilizado o software MEGA 3.1 (Tamura *et al.* 2007) para inferir relações filogenéticas por Neighbor-Joining a fim de verificar se havia a separação entre os clones das cópias mitocondriais e cópias *numts* a partir da sequências de bases. As árvores filogenéticas não demonstraram diferenças nos ramos, e,

portanto, não indicaram com acurácia a presença de *numts* (Figura 20). É possível verificar que em alguns indivíduos, apenas um dos clones se diferencia dos demais.

A fim de verificar a variação nas sequências traduzidas, foi feita a partir da sequência dos aminoácidos uma árvore filogenética por Neighbor-Joining para cada gene, adicionando inclusive as sequências que geravam *stop* códons. É possível verificar que os clones dos dois genes que se localizam em ramos diferentes nas árvores são os que contêm uma inserção ou deleção que alteram a leitura dos aminoácidos, gerando *stop* códons, ou então possuem variações únicas (Figura 21).

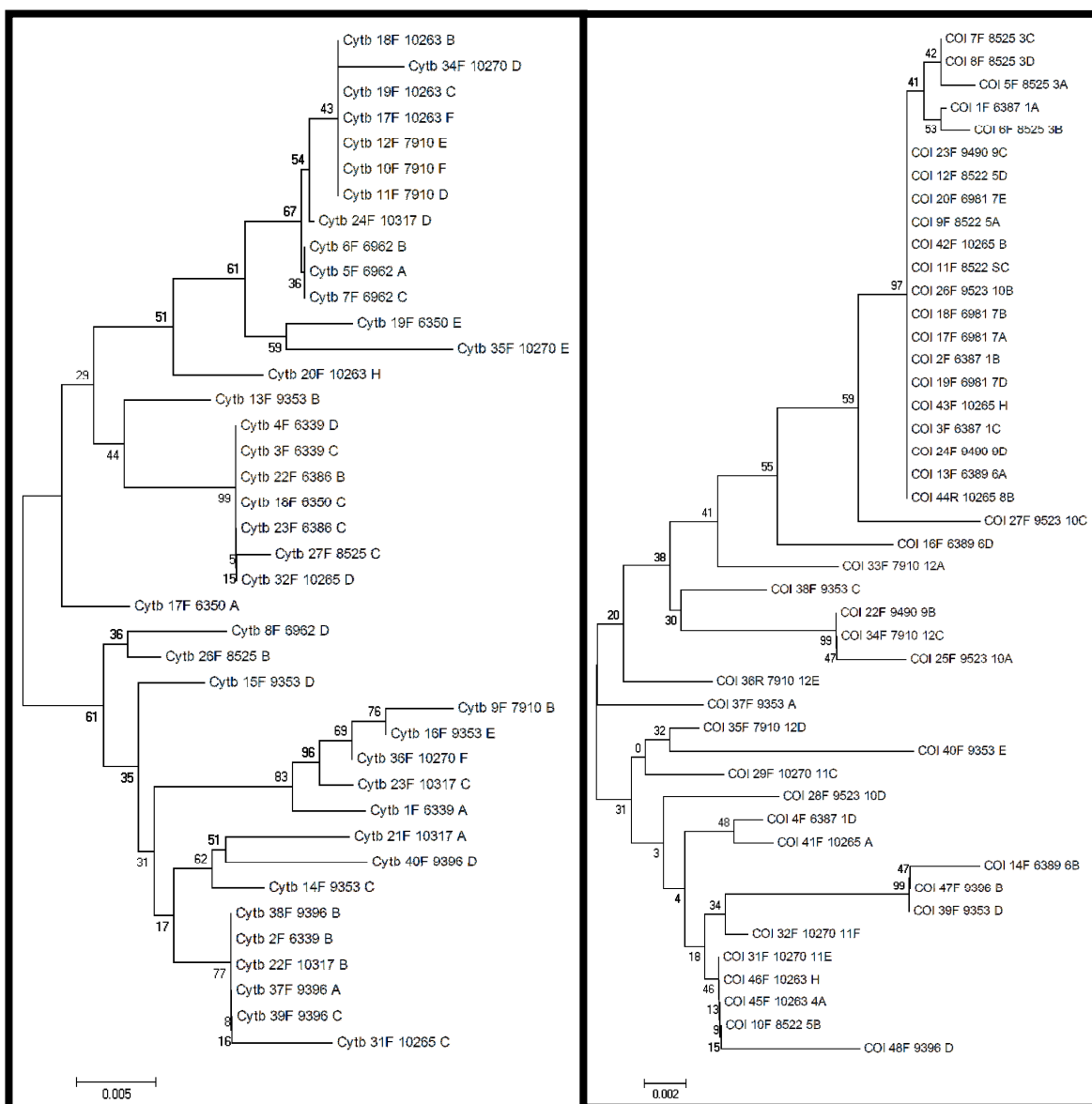


Figura 20: Árvore por Neighbor-Joining dos clones corrigidos do gene *cytb* e *COI*.

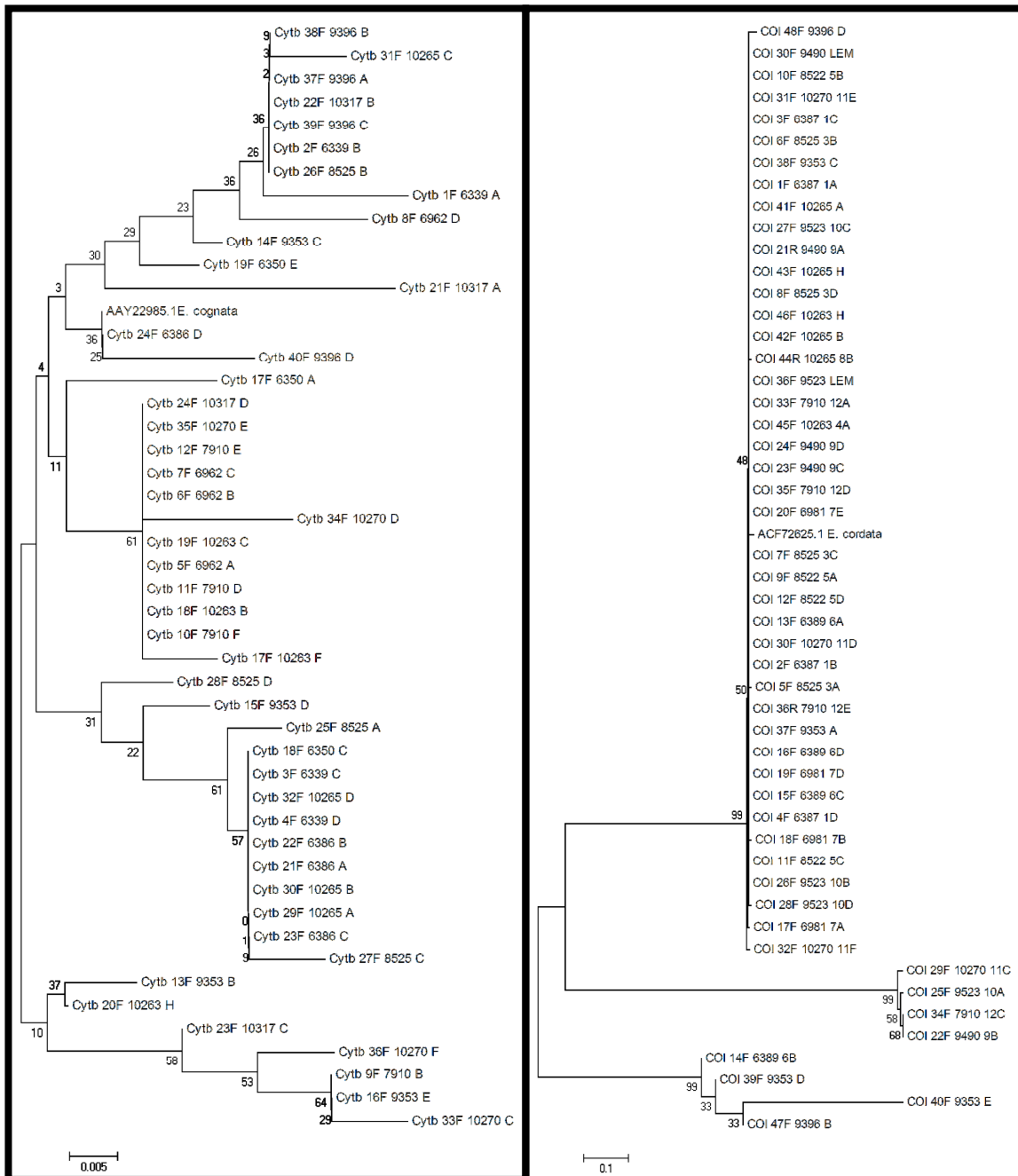


Figura 21: Árvore filogenética obtida a partir da sequência de aminoácidos dos clones de partes do gene *cyt b* e do gene *COI*.

5.5 Discussão

A interpretação da variação encontrada no sequenciamento dos fragmentos dos genes mitocondriais não foi conclusiva; portanto, não foi possível caracterizar as mutações que ocorrem em cada um dos indivíduos e, conseqüentemente, não foi possível realizar as análises populacionais. Porém, a partir das variações encontradas numa mesma posição e/ou entre as fitas *forward* e *reverse* foi levantada

a hipótese de que heteroplasma seja um evento comum na espécie em estudo, *Eg. cordata*.

A heteroplasma é um estado em que mais de um tipo de mitocôndria ocorre num organismo, e tem sido relatada em várias espécies de plantas e animais (Kmiec *et al.* 2006). Pode ocorrer por mutação ou quando a mitocôndria paterna penetra o citoplasma do ovo durante a fertilização, fenômeno conhecido como *paternal leakage*, condição em que os dois tipos de mitocôndrias vêm a coexistir no mesmo indivíduo (White *et al.* 2008). Esta condição pode ocorrer de maneira transitória em alguns estágios do desenvolvimento e, geralmente, um tipo de mitocôndria é proporcionalmente predominante (Kmiec *et al.* 2006).

Uma das estratégias para detectar heteroplasma é realizar o PCR seguido de sequenciamento (Kmiec *et al.* 2006). O sequenciamento dos clones oriundos do mesmo indivíduo em *Eg. cordata* possibilitou a separação de variantes em várias posições geradas pelo sequenciamento direto do PCR. Porém, como uma grande quantidade de variação surgiu, maior que a esperada pelos sítios que apresentavam ambiguidades, não é possível afirmar com segurança que se trata de heteroplasma. As variações presentes em apenas um clone podem ser devidas aos erros de incorporação da polimerase, já que foi utilizada uma enzima comum para a amplificação. Erros de incorporação são possíveis de acontecer (Tindall & Kunkel 1988) e podem ocorrer tanto na amplificação do gene de interesse como também na amplificação a partir do PCR de M13. Os sítios que provavelmente apresentaram heteroplasma ocorrem em 4,75% do fragmento amplificado de *cyt b* (considerando 23 sítios polimórficos em 485 pb) e 4,6% para o fragmento amplificado *COI* (considerando 29 sítios polimórficos em 629 pb). Em comparação com os sítios de heteroplasma encontrados para a espécie de abelha *Hylaeus* do Havaí, a proporção foi um pouco maior, variando entre 5 a 6% (Magnacca & Brown 2010).

Em animais e plantas, fragmentos do DNA mitocondrial podem ser integrados no genoma do núcleo (Bensasson *et al.* 2001). Em animais, estas sequências são chamadas de *numts* (*nuclear mtDNA*) (Kmiec *et al.* 2006). Na ausência de uma heteroplasma “verdadeira” pode ocorrer uma pseudo heteroplasma com a presença de *numts*, já que estes fragmentos podem apresentar homologia com os genes mitocondriais (White *et al.* 2008). Os *numts* têm sido relatados como altamente frequentes em alguns organismos, como em insetos, mais precisamente no genoma de *A. mellifera* (Pamilo *et al.* 2007) e *Aedes aegypti* (Black IV & Bernhardt 2009).

É possível que os clones sequenciados do gene *COI* que apresentaram *indels* (com a deleção de 8pb) sejam *numts*, devido à baixa frequência em relação ao total dos clones sequenciados e devido a sua presença alterar o esquema de leitura durante a tradução, gerando *stop* códons. Apesar de serem considerados *numts*, estas sequências apresentaram grande homologia com a sequência mitocondrial em ambos os genes.

Em comparação com pseudo-amplificações, a heteroplasmia apresenta uma alta proporção de polimorfismos na terceira posição do códon, resultando em mutações sinônimas, ausência de *stop* códon, *indels* e mudanças para aminoácidos incomuns e agrupamento de haplótipos (dominantes e subdominantes) num grupo monofilético por espécie (Magnacca & Brown 2009). Em relação às posições dos códons, a maior parte da variação encontrada para o gene *COI* foi na terceira base do códon, e resultou em substituições sinônimas. Mesmo apresentando um número maior de sítios polimórficos que o gene *cyt b*, é possível notar que as árvores filogenéticas dos dois genes demonstraram diferenças, o que pode indicar que o gene *cyt b* não seja tão conservado como relatado na literatura. Resultados obtidos no nosso laboratório referentes a sequenciamento de genes mitocondriais para as espécies de abelhas do gênero *Apis* e *Partamona* indicam que genes mitocondriais como *COI* e 16S apresentam maior número de mutações sinônimas. O gene *cyt b*, embora apresente menor número de substituições, têm maior proporção de substituições não sinônimas (Ferreira K. M., dados não publicados).

Não foi possível caracterizar toda a variação detectada. Serão necessários experimentos adicionais para comprovar a ocorrência de heteroplasmia, *numts* ou recombinação. Como estes eventos não são mutuamente excludentes, é possível que no caso destas amostras sequenciadas de *Eg. cordata* esteja ocorrendo uma combinação destes eventos.

As amostras de *Eg. cordata* já tinham sido analisadas anteriormente para padrões alozímicos (Cerântola *et al.* 2010), a fim de certificar a espécie estudada (López-Uribe & Del Lama 2007). As amostras de *Eg. fimbriata* não foram analisadas para a certificação da espécie e para fins comparativos foi sequenciado o gene *cyt b* do produto direto de PCR na espécie *Eg. fimbriata*, que semelhantemente apresentou variações em todas as sequências analisadas. Este fato também merece ser interpretado para verificar as causas que podem estar levando a ocorrência destas variações.

Uma alternativa para o reconhecimento da ocorrência de *numts* e heteroplasma é isolar o DNA mitocondrial do DNA genômico, realizar a extração e assim dar continuidade ao sequenciamento dos genes mitocondriais. Outra alternativa é realizar uma PCR mais longa, que abranja genes flanqueadores e, a partir deste fragmento, utilizá-lo como molde para realizar as reações de amplificação com os *primers* aqui utilizados para posterior sequenciamento dos fragmentos. Para o gene *COI*, o laboratório já dispõe de pares de *primers* da sequência *ile-ND2* e *COII* para a espécie *Apis mellifera*, que abrange todo o gene *COI*, amplificando cerca de 2713 pb. Esta reação de amplificação requer uma enzima de alta fidelidade *Pfu* que amplifica até 40000 pb, porém, como estes *primers* são heterólogos, é possível que sejam necessários ajustes para o sucesso da reação em *Eg. cordata*.

A ocorrência de problemas na amplificação dos genes mitocondriais, sejam a causa *numts* ou heteroplasma, demonstra um problema para o Barcode (Song *et al.* 2008; Magnacca & Brown 2010). O Barcode surgiu a fim de servir como um código genético da vida a partir do sequenciamento de uma porção do gene mitocondrial *COI* com a amplificação de cerca de 600 pb (Hebert *et al.* 2003). As condições de amplificação e os *primers* das regiões são universais. O sequenciamento do produto direto de PCR pode gerar inferências errôneas acerca das bases que compõem a sequência. O próprio editor, mesmo com muita experiência, pode se enganar e passar despercebido pelos sítios com este tipo de variação já que em alguns casos os picos extras se assemelham a ruídos (Magnacca & Brown 2010). O sequenciamento de apenas um clone também pode esconder a variação presente no DNA mitocondrial. As consequências da presença de *numts* ou heteroplasma podem não condizer com a sequência real e, portanto, o código universal tem que ser elaborado com toda a cautela.

Há a necessidade de dar continuidade a este trabalho a fim de que se possa interpretar os dados obtidos até o presente momento. É muito provável que as variações apresentadas pelos dois genes mitocondriais sejam devidas a *numts* e à ocorrência de heteroplasma. Contudo, para realizar as análises genéticas populacionais inicialmente propostas será necessário isolar o DNA mitocondrial do DNA nuclear, a fim de que a questão sobre a estruturação genética das populações de *Eg. cordata* possa ser futuramente investigada.

5.6 Referências Bibliográficas

- Avise, J. C.; L. Arnold; R. M. Nall; E. Bermingham; T. Lamb; J. E. Niegel; C. A. Reeb & N. C. Saunders (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 18: 489-522.
- Bensasson, D.; D. X. Zhang; D. L. Hartl & G. M. Hewitt (2001). Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology and Evolution* 16 (6): 314-321.
- Black IV, W. C. & S. A. Bernhardt (2009). Abundant nuclear copies of mitochondrial origin (NUMTs) in the *Aedes aegypti* genome. *Insect Molecular Biology* 18 (6): 705-713.
- Brito, C. M. S. & M. M. C. Rêgo (2001). Community of male euglossini bees (Hymenoptera: Apidae) in a secondary forest, Alcântara, MA, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 61 (4): 631-638.
- Brown, W. M.; M. George Jr. & A. C. Wilson (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA* 76 (4): 1967-1971.
- Cerântola, N. C. M.; C. A. Oi; M. Cervini & M. A. Del Lama (2010). Genetic differentiation of urban populations of *Euglossa cordata* Linnaeus 1758 from the state of São Paulo, Brazil. *Apidologie* (no prelo).
- Clement, M.; D. Posada & K. A. Crandall (2001). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1660.
- Crozier, R. H. & Y. C. Crozier (1993). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and the genome organization. *Genetics* 133: 97-117.
- Crozier, Y. C.; S. Koulianos & R. H. Crozier (1991). An improved test for Africanized honeybee mitochondrial DNA. *Experientia* 47: 968-969.
- Dallas-Yang, Q; G. Jiang; F. M. Sladek (1998). Avoiding false positives in colony PCR. *BioTechniques* 24: 580-582.
- Dick, C. W.; D. W. Roubik; K. F. Gruber & E. Bermingham (2004). Low-distance gene flow and across-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. *Molecular Ecology* 13: 3775-3785.
- Franck, F.; L. Garnery; A. Loiseau; B.P. Oldroyd; H.R. Hepburn & M. Solignac (2001). Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity* 86: 420-430.

- Garnery, L.; J.M. Cornuet & M. Solignac (1992). Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology* 1: 145-154.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hebert, P. D. N.; S. Ratnasingham & J. R. deWaard (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series Biological Sciences* 270: 96-99.
- Kmiec, B.; M. Woloszynska & H. Janska (2006). Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. *Current Genetics* 50: 149-159.
- Lis, J. T. & R. Schleif (1975). Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. *Nucleic Acids Research* 2: 383-389.
- López-Uribe, M. M. (2006). 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, Brasil, 67 p.
- López-Uribe, M. M. & M. A. Del Lama (2007). Molecular identification of females of *Euglossa* spp. Latreille (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) floral visitors of *Thevetia peruviana* (Apocynaceae) in urban areas. *Neotropical Entomology* 36 (5): 712-720.
- Magnacca, K. N. & M. J. F. Brown (2009). Tissue segregation of mitochondrial haplotypes in heteroplasmic Hawaiian bees: implications for DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 10: 60-68.
- Magnacca, K. N. & M. J. F. Brown (2010). Mitochondrial heteroplasmy and DNA barcoding in Hawaiian *Hylaeus* (*Nesopropis*) bees (Hymenoptera: Colletidae). *BMC Evolutionary Biology* 174 (10): 1-16.
- Moritz, C.; T. E. Dowling & W. M. Brown (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 18: 269-292.
- Pamilo, P.; L. Viljakainen & A. Viljakainen (2007). Exceptionally high density of NUMTs in the honeybee genome. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1340–1346.
- Peruquetti, R. C., L. A. O. Campos, C. D. P. Coelho, C. V. M. Abrantes & L. C. Lisboa (1999). Abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância, riqueza e aspectos biológicos. *Revista Brasileira de Zoologia* 16 (2): 101-118.

- Sheppard, W. S & B. A. McPherson (1991). Ribosomal DNA diversity in Apidae. In: Smith, D. R. *Diversity in the genus Apis*. Boulder: Westview, p. 89-102.
- Sofia, S. H.; F. M. Paula; A. M. Santos; F. S. Almeida & L. M. K. Sodr  (2005). Genetic structure analysis of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae) populations from southern Brazilian Atlantic rainforest remnants. *Genetics and Molecular Biology* 28 (3): 479-484.
- Song, H.; J. E. Buhay; M. F. Whiting & K. A. Crandall (2008). Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA* 105: 13486-13491.
- Suzuki, K. M.; M. C. Arias; D. C. Giangarelli; G. A. Freiria & S. H. Sofia (2010). Mitochondrial DNA diversity of orchid bee *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera: Apidae) populations assessed by PCR-RFLP. *Biochemical Genetics* 48: 326-341.
- Tamura, K.; J. Dudley; M. Nei & S. Kumar (2007). *MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Templeton, A. R.; K. A. Crandall; C. F. Sing (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619-633.
- Tindall, K. R. & T. A. Kunkel (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 27 (16): 6008-6013.
- Waldschmidt, A. M.; L. A. Lopes; P. Marco Jr. & L. A. O. Campos (2005). Genetics of Euglossini bees (Hymenoptera) in fragments of the Atlantic Forest in the region of Viçosa, MG. *Brazilian Journal of Biology* 65 (3): 541-549.
- Walsh, P. S.; D. A. Metzger & R. Higuchi (1991). Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10: 506-513.
- White, D. J.; J. N. Wolff; M. Pierson & N. J. Gemmell (2008). Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Molecular Ecology* 17: 4925-4942.

5.7 Apêndice

Apêndice 3: Parte do gene *cyt b* sequenciado e traduzido. Está alinhada a sequência de *Apis mellifera* (NC_001566.1) correspondente à porção do gene sequenciado. O gene *cyt b* está representado com bases degeneradas pelo código IUB. Na sequência traduzida, X representa os códons sem o aminoácido correspondente devido à variação encontrada.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Cytb	TATGTACTACCATGAGGACAAATATCTTTTGAGGAGCTATAGTAATTACAAATTAATATCAGCAATYCCCTTATTTGGTCAAATATAGTAGAATGAR									
Apis	TATGTACTACCATGAGGACAAATATCATATTTGAGGTGCAACAGTTATTACTAATCTTTTATCAGCAATCCTTATATTTGGTGATACAATGTATTATGAA									
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Cytb	TWTGAGGAGGATTTCAATTAATAATCAACATTAATCGATTTTTTTCATTACATTTTATTTTACCWTTAATTTATAATAATRGTWRTIATACATTT									
Apis	TTTGAGGTGGATTTTCAATTAATAATGCTACATTAATCGATTTTTTTCATTACATTTTATTTTACCATTATAATTTTATTATAGTTATTTCTCATTTT									
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Cytb	AATTATTTTACATATTACAGGATCAACWAATCCRTAGGAACAAATAGAAATATTAYAAAATCCATTTTATCCTTATTTTATAAATAAGATTTATTA									
Apis	ATTTGCCTTACATTTAACTGGATCATCTAATCCCTTGATCAAATTTAATAATATAAAAATTCATTTCCATATTTTCAATTAAGATCCTTTTA									
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
Cytb	GGATTTATTTATTTATTTAMCTTTRTTTATTTTAAATTTCAAATCCTTATTTATTTGGWGATCCWGATAATTTAAAAATAGCTMAATTSAAATAATTA									
Apis	GGATTTTATATCATCTTATTTATCTTTATATTCATTAATTTCAAATTCATATCATTAGGAGATCCAGACAATTCAAAATTCCAAATCCAAATAATA									
	410	420	430	440	450	460	470	480		
Cytb	CACCAATTCATATRAACSAGAATGATATTTTTTATTGCTTATTCWATTTTACGATCAATTCCTAATAAATAGGAGGTGTAAT-									
Apis	CTCCAATTCATATTAACCTGAATGATATTTCCATTTGCAATTTCAATTTTACGAGCAATTCCTAATAAATAGGAGGTGTAATC									

Apêndice 4: Parte do gene *COI* sequenciado e traduzido. Está alinhada a sequência de *Apis mellifera* (NC_001566.1) correspondente à porção do gene sequenciado. O gene *COI* está representado com as bases degeneradas segundo o código IUB. Na sequência traduzida, X representa os códons sem o aminoácido correspondente devido à variação encontrada.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
COI	GGAGATCCAATTC	TTTATCAACATTT	ATTTTGATTTTT	GGTCATCCAGAAG	TYATATTTTAATTT	ACCTGGTTTT	GGRTTAATTC	CAAAATTATTA			
Apis	G D P I L Y Q H L F W F F G H P E X Y I L I L P G F X L I S Q I I										
COI	TAAATGARAGTGG	WAAAAAAGRAGT	ATTTGGTAATTT	TAGGAATAATTT	TGCTATATTAGGA	ATTGGKTTTT	MGGTTYATG	TTTGAGCTCAT	CATAT		
Apis	I N X S X K K X V F G N L G I I Y A I L G I X F X G X I V W A H H I										
COI	ATTAYTATGGAT	TAGATGTTGAT	ACTCGAGCTT	ATTTACNTCAGCA	ACTATAGTTATT	SCTGTTCC	RACTGGT	ATTAAGKTT	YAGATGAT	TAGCA	
Apis	F X I G L D V D T R A Y F X S A T I V I X V X T G I K X X R W L A										
COI	ACTTATATGGTT	CAAAATTA	ARAATAAATTA	ATTCYATTAYAT	GATCTTTAGG	TTTTATTYAT	TATTTACA	ATTGGG	GATTAAC	CAGGRATTA	TRTTAT
Apis	T Y Y G S K F X I N N X I X W S L X F I X L F T I X G L T X I X L										
COI	CTAATTCATCT	ATGATATTT	TACATGATAC	WTATATGTT	GTCATTTTC	ATTATGTTT	TCAATAGGR	CTGTWTTT	CWATTT	TTCAAG	
Apis	S N S S I D I I L H D X Y Y V V A H F H Y V L S I X A X F X I I S R										
COI	ATTTATTCATG	ATCCNTTA	ATTACTGGTT	TAATATTA	ATAAAAAAT	GATTARTTT	ATCAATYTT	TAATAAT	ATTTATG	GTAAATTA	AACATTT
Apis	F I H W Y X L I T G L I L N K K W L X Y Q X L I I F I G V N L T F										
COI	TTTCCTCAAC	ATTTTT	TAGGATTA	ATATC							
Apis	F P Q H F L G L I										

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho permitiram obter um conhecimento maior sobre a biologia da tribo Euglossini a partir de análises genéticas realizadas utilizando microssatélites e genes mitocondriais.

Os trabalhos referentes às populações de abelhas Euglossini têm sido realizados usualmente em fragmentos de mata atlântica capturando machos atraídos por iscas armadilhas (Peruquetti *et al.* 1999; Brito & Rêgo 2001). Neste trabalho, foi realizada a captura de machos e fêmeas em flores a fim de possibilitar a obtenção de informações das populações de abelhas Euglossini, com a finalidade de aliar as informações geradas com a utilização de ferramentas moleculares.

A proposição de um novo método de amostragem de DNA a partir de parte de uma antena foi bem sucedida. Os experimentos de marcação e recaptura não demonstraram diferenças significativas nas recapturas de abelhas com as antenas mantidas intactas e excisadas, o que indica que a excisão pode não afetar diretamente a sobrevivência destas abelhas. O DNA obtido a partir das antenas foi suficiente para realizar as análises genéticas utilizando microssatélites. Este método mostrou que é possível amostrar as abelhas sem a necessidade de sacrificá-las, evitando-se, assim, a alteração do tamanho e da estrutura genética populacional (Starks & Peters 2002).

Os dados a partir das antenas obtidos nos diferentes sexos de *Eg. cordata* e *El. nigrita* indicam que a variação genética é similar. Como muito da informação sobre a tribo é realizada com a captura de machos atraídos por iscas (Dodson 1969), este achado sugere que a realização de análises genéticas a partir de machos fornece informações que podem ser extrapoladas, com o cuidado necessário, para as populações de fêmeas.

Para corroborar os resultados obtidos durante o experimento de marcação e recaptura serão necessários experimentos com iscas odores para ver o efeito da excisão sobre a coleta de fragrâncias pelos machos. Quanto às análises genéticas, as amostras foram obtidas a partir de uma única população, coletada em área urbana, fazendo-se necessária a realização de experimento similar em áreas de mata.

Em relação à estrutura genética dos ninhos, foi demonstrado que as progênes de *Eg. cordata*, *Eg. townsendi* e *Ef. violacea* são explicadas usualmente pelo acasalamento de uma fêmea com um macho se considerarmos as segregações verificadas nos locos microssatélites. O acasalamento simples parece ocorrer na maior parte das espécies de Euglossini e esta estreita relação entre os indivíduos da progênie pode contribuir para o comportamento de compartilhamento de ninhos, comportamento já relatado para o gênero *Euglossa* (Augusto & Garófalo 1994). Há a necessidade de aliar as observações de ninhos às análises genéticas para obter indícios sobre mecanismos que favoreceram a evolução do comportamento social entre os corbiculados (Souza 2007; Zimmermann *et al.* 2009; Augusto & Garófalo 2004; Cocom Pech *et al.* 2008).

Em relação ao uso da segunda ferramenta molecular, foram utilizados genes mitocondriais para o estudo genético de populações. Os resultados obtidos não foram conclusivos a respeito da possível estruturação das populações de *Eg. cordata* do estado de São Paulo. O sequenciamento direto do produto de PCR de fragmentos dos genes *cyt b* e *COI* exibiu variação em muitas posições em ambos os genes, apresentando dois picos numa mesma posição e/ou não correspondência entre as fitas *forward* e *reverse*. Os resultados sugeriram a presença de heteroplasmia e foi realizada a clonagem dos fragmentos. Os clones gerados apresentaram variação intra-individual ainda maior, o que sugere a ocorrência de heteroplasmia associada à amplificação de pseudogenes (*numts*). Não foi possível determinar as causas da variação detectada, o que exigirá a continuidade destes estudos. Como alternativas, serão feitos esforços no sentido de isolar as mitocôndrias por centrifugação diferencial (Saito *et al.* 2005), ou realizar a amplificação de um fragmento maior para incorporar genes flanqueadores das regiões de interesse.

Este trabalho contribuiu para elucidar aspectos da biologia de nidificação em espécies de Euglossini; além disso, novas questões sobre a genética das populações de *Eg. cordata* requerem a continuidade dos estudos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Augusto, S. C. & C. A. Garófalo (1994). Comportamento das fêmeas nas associações formadas em ninhos de *Euglossa cordata* (Hymenoptera; Apidae; Euglossini). Encontro sobre abelhas, Ribeirão Preto, SP, Brasil 1: 171–181.
- Augusto, S. C. & C. A. Garófalo (2004). Nesting biology and social structure of *Euglossa (Euglossa) townsendi* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Insectes Sociaux* 51: 400-409.
- Brito, C. M. S. & M. M. C. Rêgo (2001). Community of male euglossini bees (Hymenoptera: Apidae) in a secondary forest, Alcântara, MA, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 61 (4): 631-638.
- Cocom Pech, M. E.; W J. May-Itzá; L. A. Medina & J. J. G. Quezada-Euán (2008). Sociality in *Euglossa (Euglossa) viridissima* Friese (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Insectes Sociaux* 55: 428-433.
- Dodson, C. H.; R. L. Dressler; H. G. Hills; R. M. Adams & N. H. Williams. (1969) Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science* 164: 1243-1249.
- Peruquetti, R. C., L. A. O. Campos, C. D. P. Coelho, C. V. M. Abrantes & L. C. Lisboa (1999). Abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância, riqueza e aspectos biológicos. *Revista Brasileira de Zoologia* 16 (2): 101-118.
- Saito, S.; K. Tamura & T. Aotsuka (2005). Replication Origin of Mitochondrial DNA in Insects. *Genetics* 171: 1695-1705.
- Souza, R. O. (2007). Estrutura genética e sociogenética das populações e ninhos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) determinadas por meio de microssatélites. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 78 p.
- Starks, P. T. & J. M. Peters (2002). Semi-nondestructive genetic sampling from live eusocial wasps *Polistes dominulus* and *Polistes fuscatus*. *Insectes Sociaux* 49: 20-22.
- Zimmermann, Y.; D. W. Roubik; J. J. G. Quezada-Euan; R. J. Paxton & T. Eltz (2009). Single mating in orchid bees (*Euglossa*, Apinae): implications for mate choice and social evolution. *Insectes Sociaux* 56: 241-249.