



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Sistemática e Ecologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Área de Concentração: Zoologia)

BIOLOGIA E ECOLOGIA DA NIDIFICAÇÃO E VARIABILIDADE
GENÉTICA DE *Centris (Centris) flavifrons* FABRICIUS
(HYMENOPTERA: APIDAE, CENTRIDINI)

Marcella Pereira Peixoto



João Pessoa – PB
Fevereiro/2012

Marcella Pereira Peixoto

BIOLOGIA E ECOLOGIA DA NIDIFICAÇÃO E
VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Centris (Centris) flavifrons*
FABRICIUS (HYMENOPTERA: APIDAE, CENTRIDINI)



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Departamento de Sistemática e Ecologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Zoologia.

Orientador: Prof.º Dr. Celso Feitosa Martins

João Pessoa – PB
Fevereiro/2012

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P377b Peixoto, Marcella Pereira.

Biologia e Ecologia da nidificação e variabilidade
Genética de *Centris (Centris) flavifrons* Fabricius
(Hymenoptera: Apidae, Centridini). / Marcella Pereira
Peixoto. - João Pessoa, 2012.

98 f. : il.

Orientação: Celso Feitosa Martins.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

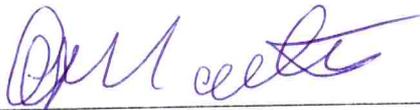
1. Abelhas solitárias *Centris flavifrons* Nidificação.
I. Martins, Celso Feitosa. II. Título.

UFPB/CCEN

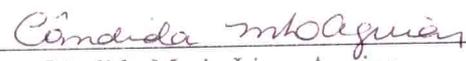
1 **Ata da 212^a Apresentação da Defesa de**
2 **Dissertação da Mestranda Marcella Pereira**
3 **Peixoto.**
4

5 Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro de dois mil e doze, no Auditório do DSE do Centro de
6 Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba, reuniu-se, em caráter de
7 solenidade pública, às 14:00 horas, a banca examinadora da mestranda **Marcella Pereira Peixoto**
8 composta pelos seguintes professores doutores Celso Feitosa Martins (UFPB), Cândida Maria
9 Lima Aguiar (UEFS/BA) e Fernando César Vieira Zanella (UFCG). Compareceram à solenidade,
10 além da candidata e membros da banca examinadora, alunos e professores do PPGCB. Dando
11 início à sessão, a senhora coordenadora, Professora Maria Regina Vasconcellos Barbosa, fez a
12 abertura da sessão, apresentando a candidata **Marcella Pereira Peixoto**. Em seguida, fez a
13 apresentação da banca examinadora e passou a presidência da sessão para o Prof. Celso Feitosa
14 Martins que, concomitantemente, como orientador da aluna, assumiu a posição de Presidente da
15 sessão que, após declarar o objeto da solenidade, concedeu a palavra a mestranda **Marcella**
16 **Pereira Peixoto**, candidata ao grau de Mestre em Ciências Biológicas, para que dissertasse, oral
17 e sucintamente, a respeito do tema “Biologia e ecologia da nidificação e variabilidade genética de
18 *Centris (Centris) flavifrons* (FABRICIUS, 1775) (Hymenoptera: Apidae, Centridini)”. Passando
19 então a discorrer sobre o aludido tema, dentro do prazo legal, a candidata foi a seguir argüida
20 pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a Comissão, em caráter secreto, a
21 proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito
22 **APROVADO COM DISTINÇÃO** Perante a aprovação, declarou-se a candidata
23 **Marcella Pereira Peixoto**, legalmente habilitada a receber o grau de Mestre em Ciências
24 Biológicas, área de concentração Zoologia. Nada mais havendo a tratar eu, Celso Feitosa Martins,
25 como presidente, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, assino juntamente com os demais
26 membros da banca examinadora.

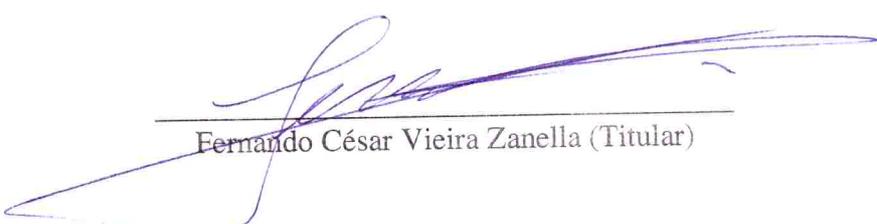
27
28
29 João Pessoa, 27 de fevereiro de 2012
30
31
32

33 

34
35
36 Celso Feitosa Martins
37 (Orientador)

38 

39
40
41 Cândida Maria Lima Aguiar
42 (Titular)

43 
Fernando César Vieira Zanella (Titular)

“As coisas mais maravilhosas que podemos experimentar são as misteriosas. Elas são a origem de toda verdadeira arte e ciência. Aquele para quem essa sensação é uma estranha, aquele que não mais consegue parar para admirar e extasiar-se em veneração, é como se estivesse morto: seus olhos estão fechados.”

Albert Einstein

Dedico àqueles que se encantam com o mesmo que eu: os “pequenos detalhes” da vida, os quais me puseram a realizar este estudo.

AGRADECIMENTOS

São muitas as imagens que me vêm à mente... Muitos nomes que pulam à boca... De alguns que vejo todos os dias, e de outros que deixam saudades e a angústia da ausência. São pessoas com quem planejo dividir minhas melhores vontades – e o que existir de melhor no mundo –, e tantas outras com quem já as vivi e que, agora, em memória, estarão comigo sempre.

Mas é preciso citar nomes, pôr em ordem, sistematizar pensamentos – ou seriam sentimentos? – que se apresentam em formas e intensidades tão distintas... Uma tarefa difícil! É peculiar... Passa a existir o receio de ser injusta, mas a tarefa tem que ser feita... É preciso deixar registrado, e que cada um possa sentir de forma especial, os meus verdadeiros agradecimentos:

Aos meus pais, Marcos e Socorro, por todo o carinho e apoio ofertado, por todo o orgulho declarado e por toda a confiança que depositam em mim; e à minha irmã, Helena, pelo amor louco, desmedido, e pela companhia constante, pois, mesmo havendo milhares de quilômetros entre nós, está comigo em cada detalhe. *“In union we stand”!*

Ao professor Celso Feitosa Martins, primeiramente, pela amizade e total apoio, e pelos valiosos ensinamentos – acadêmicos ou não. Sempre terei de me orgulhar por ter tido-o como orientador. Agradeço também à sua tão doce família, que me recebeu todos os dias da melhor forma possível, fazendo do meu campo de estudo parte da minha casa.

Ao professor Marco Antônio Del Lama pela agradável e rica parceria, pronta atenção e todo o seu peculiar modo de alegrar os dias de trabalho dos seus alunos.

Aos amigos entomólogos: Liedson Carneiro (Liiiii), Carolina Nunes, Renata, Wellington (Well), Aninha, Aline, Daniel, Anthony, Rodrigo César e a todos que estiveram conosco no nosso laboratório, fazendo deste um ambiente prazeroso de se estar. Agradeço a Liedson, Carolina, Renata e Jerônimo pela ajuda em campo: *“vocês são ‘Ótimos’!”*

Aos amigos que fiz ao longo da minha odisséia na Biologia, seja na graduação ou na pós-graduação, muitos dos quais eu sei que estarão comigo eternamente: Nyara, Carol e Rowse (lendárias *“Fab Four”*), Rita, Felipe Alves, Jocelmo, Héllio, Felipe Campos, Jean, Anderson (A.), Nivaldo (N.), Lívia, Anne, Arielson, Ricardo, Samuel (os dois), Felipe, Amanda e todos, todos os demais.

Aos surpreendentes amigos que fiz no LGEH (UFSCar) pela incrível recepção e apoio, estando, todos, sempre a postos para me ajudar e que, literalmente desde o primeiro dia de convivência, me proporcionaram as melhores conversas e risadas. Obrigada à Kátia (Katiúska, muitíssimo obrigada por me socorrer com aqueles

“breguetes” lá!), Juliana, Natália, Gabriella (Bad Gab's), Isabel (Bel), Antônio (Caíto), Tony, Diego e Regina (nossa agregada). Foi um prazer!

Aos demais amigos que fiz na incrível cidade de São Carlos e que me perguntam, vinte vezes ao dia, como vão “minhas” abelhas. Em especial, agradeço ao Pedro Fabiano, Tatiana Salata, Murilo Deriggi e Nathália Muylaert. Vocês são especiais! São Carlos, o frio, o som do trem e minha varanda são especiais!

Aos grandes amigos que fazem parte efetiva da minha vida: Kécia, Cibele, Larissa, Maxime Valgard, Luana, Fabíola, Andrei, Mariana, Ludmila, Adriaen e Dayse. Agradeço vossas amizades e a tantos outros amigos que sei que tenho e posso contar.

Também agradeço à CAPES e ao CNPq, por financiarem o meu estudo.

Por fim, agradeço à todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, na minha formação pessoal e acadêmica. Grata!

☪☪☪ SUMÁRIO ☪☪☪

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 APRESENTAÇÃO	09
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPÍTULO I - Biologia e ecologia da nidificação de <i>Centris (Centris) flavifrons</i> (FABRICIUS, 1775) (Hymenoptera: Apidae, Centridini) em uma área urbana.....	16
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Biologia e ecologia das abelhas	17
1.1.1 As abelhas solitárias e os Centridini	17
1.1.2 O gênero <i>Centris</i> e a espécie <i>Centris (Centris) flavifrons</i>	19
1.2 A alteração do ambiente e as populações de abelhas	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS	22
2.1 Sítio específico do estudo	22
2.2 Monitoramento e coleta de dados	24
2.2.1 Método de marcação	28
2.3 Análise dos dados	30
3 RESULTADOS	31
3.1 Locais de nidificação e ninhos	31
3.1.1 Estrutura dos ninhos e células	37
3.2 Marcação das Fêmeas	41
3.3 Comportamento de nidificação	43
4 DISCUSSÃO	51
I REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
CAPÍTULO II - Extração de DNA e variabilidade genética de <i>Centris (Centris) flavifrons</i> (FABRICIUS, 1775) (Hymenoptera: Apidae, Centridini)	66

1 INTRODUÇÃO.....	67
1.1 O habitat e a variabilidade genética	67
1.2 Estudos genéticos com abelhas	68
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	70
2.1 Material e locais de coleta.....	70
2.2 Extração do DNA	73
2.3 Amplificação e purificação do DNA mitocondrial.....	73
2.4 Sequenciamento do DNA mitocondrial	74
2.5 Análise dos dados.....	74
3 RESULTADOS.....	76
3.1 Extração do e amplificação do DNA mitocondrial	76
3.2 Características das sequências do DNA mitocondrial para o gene <i>cytb</i>	78
3.3 Características das sequências do DNA mitocondrial para o gene COI	80
3.4 Redes de haplótipos	82
4 DISCUSSÃO	85
4. 1 Material e período de coleta para <i>C. flavifrons</i>	85
4.2 Extração e amplificação do DNA mitocondrial.....	86
4.3 DNA mitocondrial.....	87
II REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

Capítulo I – Biologia e ecologia da nidificação de *Centris (Centris) flavifrons* (FABRICIUS, 1775) (Hymenoptera: Apidae, Centridini) em uma área urbana da cidade de João Pessoa – Paraíba

TABELA I.1. Medidas das 16 células encontradas no vaso 3. Não foi possível realizar as medições nas células 8, 10 e 13, pois estas quebraram durante o processo de medição. Todas as medidas estão em milímetros, exceto a profundidade, que está em centímetros40

TABELA I.2. Lista das abelhas marcadas durante o estudo (n = 54). A designação da combinação realizada para a marcação de cada abelha segue sempre o mesmo padrão (cor e região do corpo, nesta ordem)42

TABELA I.3. Número de fêmeas marcadas e seus respectivos ninhos43

TABELA I.4. Relação entre o número de células e tempo de atividade dos ninhos monitorados intensivamente. Para estes ninhos, foi observado que uma fêmea despende, em média, 1,65 dias para a construção de uma única célula (incluindo o tempo despendido na escavação do ninho). 49

TABELA I.5. Duração da atividade dos ninhos, em dias, construídos por uma mesma fêmea. Notar que em 60% dos segundos ninhos construídos a duração diminuiu (cinza claro); em 33,3% a duração foi semelhante (cinza escuro) e em apenas 6,0% (1 ninho) a duração aumentou49

Capítulo II – Variabilidade genética de *Centris (Centris) flavifrons* (FABRICIUS, 1775) (Hymenoptera: Apidae, Centridini)

TABELA II.1. Áreas onde houve amostragens de *C. flavifrons* e suas respectivas coordenadas geográficas. Para essas áreas, foram atribuídos códigos numéricos de identificação e abreviaturas das localidades amostradas, os quais serão utilizadas ao longo do presente estudo72

TABELA II.2. Distância (em Km) entre as áreas onde houve amostragens de *C. flavifrons*.....72

TABELA II.3. Número de amostras de *C. flavifrons* obtidas em cada área. F=fêmea; M=macho.....76

TABELA II.4. Lista de haplótipos observados para o gene mitocondrial *cytb* e as suas respectivas localidades. Os números precedentes em cada amostra referem-se ao número da extração do material genético; CasaCelso = Área principal de monitoramento, em João Pessoa/PB; SODÁgua = Sítio Olho D’água, em Alhandra/PB; CamaragibePE e IgarassuPE correspondem a amostras provenientes desses municípios, localizados no estado de Pernambuco.83

TABELA II.5. Lista de haplótipos observados para o gene mitocondrial *COI* e as suas respectivas localidades. Os números precedentes em cada amostra referem-se ao número da extração do material genético; CasaCelso = Área principal de monitoramento, em João Pessoa/PB; SODÁgua = Sítio Olho D’água, em Alhandra/PB; CamaragibePE e IgarassuPE correspondem a amostras provenientes desses municípios, localizados no estado de Pernambuco.84

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I – Biologia e ecologia da nidificação de *Centris (Centris) flavifrons* (FABRICIUS, 1775) (Hymenoptera: Apidae, Centridini) em uma área urbana da cidade de João Pessoa – Paraíba

- FIGURA I.1.** *Centris* sp. coletando óleo em flor de Malpighiaceae. Foto: Roe Brasil18
- FIGURA I.2.** *Epicharis rustica*. Foto: Giorgio Venturieri.18
- FIGURA I.3.** *Centris (Centris) flavifrons*. Foto: Paianiplan (Flickr)19
- FIGURA I.4.** A – Mapa do Brasil destacando o estado da Paraíba; B – Imagem de satélite de parte da cidade de João Pessoa, capital da Paraíba; MB – Localização da Mata do Buraquinho. A cruz vermelha indica a localização do bairro Jardim Cidade Universitária. Fontes: Google Earth; <http://www.paperbox.com.br/imagens/mapa_PB.jpg>.....23
- FIGURA I.5.** Parte do jardim lateral com ênfase em uma coroa de planta, as quais são utilizadas no entorno das espécies vegetais frutíferas. Foto: Marcella Peixoto24
- FIGURA I.6.** Ninho 34 (N34) marcado. Observar a marcação posicionada para a entrada do ninho (importante na detecção do ninho quando há muitos próximos). Foto: Marcella Peixoto.....26
- FIGURA I.7.** Vasos disponibilizados como “vasos-armadilha”. A – Vaso exposto; sobre o substrato; B – Vaso enterrado; no nível do substrato. Foto: Marcella Peixoto.....26
- FIGURA I.8.** Gaiola maior disposta sobre um ninho fundado no vaso. Foto: Marcella Peixoto.27
- FIGURA I.9.** Gaiolas menores dispostas sobre ninhos fundados em uma coroa do jardim. Foto: Marcella Peixoto.....27
- FIGURA I.10.** Escavação de um ninho. Foto: Marcella Peixoto.27
- FIGURA I.11.** Escavação de ninhos em vaso-armadilha (vaso 3). Foto: Celso F. Martins.....27
- FIGURA I.12.** *C. flavifrons* posicionada na entrada do ninho com o tórax marcado de verde no lado direito e azul no lado esquerdo. Foto: Marcella Peixoto.28
- FIGURA I.13.** *C. flavifrons* marcada com tinta permanente vermelha no tórax (momento da soltura). Foto: Marcella Peixoto28
- FIGURA I.14.** Tabela das possíveis combinações de cores de tinta e regiões das abelhas utilizadas para a marcação. As combinações assinaladas em cinza ou as que estão em branco foram descartadas; as combinações assinaladas em azul foram possíveis de ser utilizadas30

FIGURA I.15. Ninho 22 (N22) durante o seu processo de escavação (ao lado encontra-se o N32). Observar o montículo de areia com a calha central, característico dos ninhos de <i>C. flavifrons</i> . Foto: Celso F. Martins	31
FIGURA I.16. Ilustração esquemática da maior área do jardim – Jardim Lateral –, situada lateralmente à residência, demonstrando a composição e distribuição dos seus elementos. A ilustração corresponde ao primeiro período de monitoramento da área. Legenda: C – coroa das plantas; J – jarro (armadilhas); * - ninhos estabelecidos na área, com suas respectivas numerações de registro.	33
FIGURA I.17. Ilustração esquemática do jardim da frente e do jardim de trás, situadas anterior e posteriormente à residência, demonstrando a composição e distribuição dos seus elementos. A ilustração corresponde ao primeiro período de monitoramento da área. Legenda: C – coroa das plantas; J – jarro (armadilhas); * - ninhos estabelecidos na área, com suas respectivas numerações de registro.	34
FIGURA I.18. Número acumulado de ninhos fundados na área de estudo ao longo do primeiro período das atividades de nidificação de <i>C. flavifrons</i>	35
FIGURA I.19. Número acumulado de ninhos fundados na área de estudo ao longo do segundo período das atividades de nidificação de <i>C. flavifrons</i>	35
FIGURA I.20. Número de ninhos fundados por dia na área de estudo ao longo do primeiro período das atividades de nidificação de <i>C. flavifrons</i>	35
FIGURA I.21. Número de ninhos fundados por dia na área de estudo ao longo do segundo período das atividades de nidificação de <i>C. flavifrons</i>	35
FIGURA I.22. Tempo de escavação de 12 ninhos de <i>C. flavifrons</i> realizados por fêmeas distintas	36
FIGURA I.23. Tempo de atividade – desde a escavação até a conclusão – dos ninhos de <i>C. flavifrons</i> (n = 141).	36
FIGURA I.24. Molde, em gesso, da estrutura de um ninho fundado no substrato. Foto: Celso F. Martins	38
FIGURA I.25. Escavação do vaso 3. É possível visualizar duas células a, aproximadamente, 40 cm de profundidade. Foto: Celso F. Martins.....	38
FIGURA I.26. Material resultante da escavação do vaso 3. No momento, algumas células encontram-se fechadas, enquanto os materiais das demais já estão depositados em tubos de vidro contendo álcool absoluto. No canto esquerdo superior há uma célula aberta contendo uma larva em fase de pré-pupa. Foto: Marcella Peixoto	39
FIGURA I.27. Escavação do vaso 3. É possível visualizar três células a, aproximadamente, 40 cm de profundidade. Foto: Celso F. Martins.....	39
FIGURA I.28. Células de <i>C. flavifrons</i> . Seta indicando o processo central da cápsula. Foto: Celso F. Martins	39

FIGURA I.29. Célula aberta contendo uma larva (primeiro estágio do desenvolvimento) sobre uma espessa camada de óleo e, logo abaixo dela, na base da célula, encontra-se depositado o pólen. Foto: Celso F. Martins..... 40

FIGURA I.30. Célula aberta contendo uma larva defecante (estágio de pré-pupa) no interior de um casulo. Observar o acúmulo de fezes na base da célula (seta). Foto: Marcella Peixoto 40

FIGURA I.31. Tempo despendido dentro e fora do ninho pela fêmea do N52 - primeira temporada; abelha marcada (A7) - ao longo do período de atividade deste ninho. No primeiro dia, o ninho encontrava-se em fase de escavação (observar que o maior tempo é despendido dentro do ninho). No segundo dia, o ninho estava em fase de aprovisionamento (mais tempo foi despendido fora do ninho), podendo ser observada a ovoposição e conclusão da célula no fial do dia (quando a fêmea passou, novamente, um maior período dentro do ninho. Setas cinzas indicam vôos para coleta de pólen 46

FIGURA I.32. Tempo despendido dentro e fora do ninho pela fêmea do N50 (primeira temporada; abelha marcada (A42)) ao longo do período de atividade deste ninho. O primeiro dia de atividade do ninho, que compreende ao período de escavação, não está apresentado no gráfico. As linhas verticais tracejadas delimitam as atividades por dia. Setas pretas indicam vôos para coleta de óleo, e setas cinzas indicam vôos para coleta de pólen. Estrelas preta indicam o momento em que uma célula foi concluída..... 47

FIGURA I.33. Tempo despendido dentro e fora do ninho pela fêmea do N34 (segunda temporada; abelha não marcada) ao longo do período de atividade deste ninho. O primeiro dia de atividade do ninho, que compreende ao período de escavação, não está apresentado no gráfico. As linhas verticais tracejadas delimitam as atividades por dia. Setas pretas indicam vôos para coleta de óleo, e setas cinzas indicam vôos para coleta de pólen. Estrelas preta indicam o momento em que uma célula foi concluída..... 48

Capítulo II – Variabilidade genética de *Centris (Centris) flavifrons* (FABRICIUS, 1775) (Hymenoptera: Apidae, Centridini)

FIGURA II.1. Mapa representativo com ênfase no estado da Paraíba (PB) e parte do estado de Pernambuco (PE) contendo as áreas onde foram realizadas expedições para coleta de *C. flavifrons*. 1 – Área principal de estudo, Cidade Universitária, João Pessoa-PB; 2 – Sítio Olho D'Água, Alhandra-PB; 3 – Usina São João, Igarassu-PE; 4 – Vale do Catimbau, Buíque-PE; 5 – Granja Antônio, Camaragibe-PE; 6 – Município de Mamanguape-PB; 7 – Fazenda Acerolândia, Paudalho-PE; 8 – Município de Paulista-PE..... 72

FIGURA II.2. Gel de agarose 1% corado com Gel Red™ e visualizado em luz UV mostrando os fragmentos de *cytb* e COI após a purificação. São observadas 50 amostras, porém, duas delas (19 e 22) foram excluídas do seqüenciamento pois não foi obtido resultado positivo para o seqüenciamento. A seta indica a direção da migração no gel. Foto: Kátia Ferreira 77

FIGURA II.3. Alinhamento entre seqüências obtidas para o gene *cytb*. Na legenda, os números precedentes em cada amostra referem-se ao número da extração do material genético; CasaCelso = Área principal de monitoramento, em João Pessoa/PB; SODÁgua = Sítio Olho D'água, em Alhandra/PB; CamaragibePE e IgarassuPE correspondem a amostras provenientes desses municípios, localizados no estado de Pernambuco 79

FIGURA II.4. Alinhamento entre seqüências obtidas para o gene COI. Na legenda, os números precedentes em cada amostra referem-se ao número da extração do material genético; CasaCelso = Área principal de monitoramento, em João Pessoa/PB; SODAgua = Sítio Olho D'água, em Alhandra/PB; CamaragibePE e IgarassuPE correspondem a amostras provenientes desses municípios, localizados no estado de Pernambuco.....81

FIGURA II.5. Rede de haplótipos obtida para o gene *cytb*, representando os 13 haplótipos verificados para a região. Seq(s) = número de seqüências em que o respectivo haplótipo foi encontrado83

FIGURA II.6. Rede de haplótipos obtida para o gene COI, representando os sete haplótipos verificados para a região. Seq(s) = número de seqüências em que o respectivo haplótipo foi encontrado84

Centris (Centris) flavifrons Fabricius, 1775 é uma espécie de abelha solitária de grande porte e de ampla distribuição Neotropical. O presente estudo teve como objetivo conhecer a biologia e a ecologia da nidificação dessa espécie – em uma área urbana da cidade de João Pessoa, Paraíba –, assim como a sua variabilidade genética. O local específico de estudo das atividades de nidificação corresponde a um jardim residencial localizado em área urbanizada. O comportamento das fêmeas nos ninhos foi observado *in loco* e através de filmagens, sendo utilizado o método de marcação nessas fêmeas. O estabelecimento dos ninhos ocorreu em superfícies horizontais ensolaradas de solo arenoso e desnudo, sem grama. Ao longo dos dois anos de estudo (compreendendo, portando, dois períodos de nidificação), foram encontrados 286 ninhos formando um agregado. A densidade de ninhos em toda a área do jardim foi de 0,28 ninhos/m² no primeiro período monitorado e 0,18 ninhos/m² no segundo. As entradas dos ninhos tinham forma circular, geralmente expostas, e típicos montículos de areia localizados lateralmente a elas. O tempo médio que uma fêmea despendeu na escavação de um ninho foi de 3h e 40min (n=12). A média do período de atividade de um ninho foi de 6,9 dias, variando entre dois (n=17) a 19 (n=1) dias. Foram observados casos de reativação e de invasão e posse de ninhos por outras abelhas, que não a sua fundadora. Para 434 vôos observados, a média de vôos diários para coleta de recursos florais foi de sete vôos, sendo que 82,7% deles ocorreram no período da manhã. Desse total, 75% dos vôos foram para a coleta de pólen e 25% para a coleta de óleo. A duração dos vôos, tanto para coleta de pólen quanto para coleta de óleo, aumentavam ao longo do dia. Foi verificada uma média próxima de cinco células por ninho, variando de uma até o máximo de nove células de acordo com a duração do ninho. Houve evidências indiretas de *Mesoplia* sp. parasitando ninhos de *C. flavifrons*. Quanto à sua arquitetura, os ninhos escavados apresentaram um túnel principal com ramificações em sua extremidade, devido à construção de mais de uma célula, as quais podem estar verticalmente alinhadas ou não. Nos “vasos-armadilha”, foram encontradas até seis células de uma mesma fêmea. De forma geral, as dimensões das células variaram pouco, apresentando forma capsular, com base arredondada e uma “tampa” arqueada no ápice, onde se encontra um processo central. Foram encontradas larvas em todos os estádios larvais, porém não foram encontradas pupas. As análises genéticas foram realizadas utilizando sequências de duas regiões de genes mitocondriais como marcadores: *cytb* e COI. A maioria das amostras foi coletada durante o estudo das atividades de nidificação, em João Pessoa (PB), enquanto as demais foram coletadas em outra localidade da Paraíba e em Pernambuco. As redes de haplótipos ajudaram na visualização de que existem vários haplótipos mitocondriais nas amostras da área principal do estudo, em João Pessoa. Alguns haplótipos foram encontrados em mais de uma localidade. Neste estudo, os dados sugerem que o gene *cytb* foi mais informativo que COI. Contudo, alguns dos exemplares não apresentaram bom rendimento nas reações de amplificação e, conseqüentemente, de seqüenciamento, seja para um gene em particular ou para ambos. Dessa forma, para a obtenção de resultados mais embasados, os estudos genéticos precisam ser continuados.

Palavras-chave: Abelhas solitárias, *Centris flavifrons*, ninho, comportamento de nidificação, DNA mitocondrial

ABSTRACT

Centris (Centris) flavifrons Fabricius, 1775 is a large solitary bee species and widely distributed in Neotropical region. The present study aimed to understand the nesting biology and the ecology of this species – in an urban area in João Pessoa city, Paraíba -, as well as its genetic variability. The specific study site of the nesting activities corresponds to a residential garden located in an urbanized area. The female behavior in the nests was observed *in situ* and through films, by using the method of marking these females. The establishment of the nests occurred on horizontal, sunny, sandy and bare surfaces, without grass. Over two years of study (comprising, therefore, two nesting periods) 286 nests were found forming an aggregate. The density of the nests in the whole area of the garden was 0.28 nests/m² monitored in the first period and 0.18 nests/m² in the second. The entrances of the nests had a circular shape, usually exposed, and typical amounts of sand located laterally to them. The average time spent by a female digging a nest was 3h and 40 min (n = 12). The average period of a nest activity was 6.9 days, ranging from two (n = 17) to 19 (n = 1) days. Cases of reactivation of nests, as well as invasion and possession of nests by other bees than its founder were observed. For the 434 observed flights, the average of daily flights for collecting floral resources was seven flights, with 82.7% of them occurred in the morning. Of this total, 75% of the flights were for pollen and 25% for oil collection. The time period of flights, both for pollen and for oil collection, increased throughout the day. It was verified an average of about five cells per nest, ranging from one up to a maximum of nine cells according to the duration of the nest. There was indirect evidence of *Mesoplia* sp. parasitizing nests of *C. flavifrons*. About its architecture, the excavated nests showed a main tunnel with branches at its end, due to the construction of more than one cell, which can be vertically aligned or not. In the "trap-pots" were found up to six cells from the same female. Overall, the dimensions of the cells did not varied much, showing capsular form, with rounded base and a cap arched at the apex, where there is a central process. Larvae were found in all larval instars, but pupae were not found. Genetic analyzes were performed using sequences of two mitochondrial genes regions as markers: *cytb* and COI. Most samples were collected during the study of nesting activities in João Pessoa (PB), while the others were collected in another location of Paraíba and Pernambuco. The haplotypes networks helped to observe that there are several mitochondrial haplotypes in samples from the main area of study in João Pessoa. Some haplotypes were found in more than one location. In this study, the data suggest that *cytb* gene was more informative than COI. However, some of the specimens did not show good performance in amplification reactions and, consequently, sequencing, or for a particular gene or both. Thus, to obtain more grounded results, genetic studies have to be continued.

Keywords: Solitary bees, nest, nesting behavior, *Centris flavifrons*, mitochondrial DNA

1 APRESENTAÇÃO

As abelhas são, sem dúvida, o principal grupo de invertebrados polinizadores (BUCHMANN & NABHAN, 1996; REBÊLO, 2001; KEARNS, 2001), sendo consideradas "espécies-chave": animais de extrema importância no funcionamento do ecossistema de tal forma que sua ausência teria efeitos de longo alcance e mais vastos do que a sua abundância indicaria (KEVAN, 1991; LASALLE & GAULD, 1993; McINTYRE & HOSTETLER, 2001). Devido ao fato de suas espécies serem visitantes florais obrigatórios, tanto de plantas nativas quanto de plantas cultivadas, a importância ecológica e econômica desse grupo é ressaltada (ROUBIK, 1989). Dessa forma, têm sido objeto de estudo nas mais variadas áreas da biologia, como Taxonomia, Etologia, Morfologia, Ecologia e Genética (ROUBIK, 1989; MICHENER, 2007).

No entanto, têm-se constatado um declínio de polinizadores a nível mundial, causado por ações antrópicas e fragmentação de ambientes naturais (DENYS & SCHMIDT, 1998; BUCHMANN E NABHAN, 1996, MATHESON, *et al.*, 1996). Dessa forma, muitos pesquisadores ressaltam a necessidade premente de estudos tendo como objeto de trabalho as abelhas (FRANKIE *et al.*, 1993; BIESMEIJER *et al.*, 2006; KLEIN *et al.*, 2007).

Contudo, em habitats que foram modestamente – às vezes até drasticamente – alterado por atividades humanas, há evidências crescentes de que parte considerável de comunidades de abelhas nativas pode persistir nessas áreas (CANE, 2005; FRANKIE *et al.*, 2005; WILLIAMS *et al.*, 2001). Particularmente em áreas urbanas, apesar dos seus potenciais impactos negativos, muitas espécies de abelhas são comuns nessas áreas, que retêm uma diversidade de habitats e muitas características que são essenciais para a permanência dessas populações, locais para nidificação e recurso florais (CANE, 2001, 2005; OWEN, 1991; CANE *et al.* 2006; SAURE, 1996; FRANKIE *et al.* 2005)

A urbanização pode criar, potencialmente, ricos habitats artificiais, apresentando-se na forma de jardins residenciais (FETRIDGE *et al.* 2008). Os jardins podem oferecer uma grande variedade de recursos alimentares, favorecendo, principalmente, às abelhas poliléticas, que corresponde a quase todas as abelhas sociais e muitas espécies solitárias; além de oferecer uma ampla variedade de materiais e locais para nidificação, tais como cavidades artificiais, solo nu e caules mortos (CANE *et al.* 2006; FRANKIE *et al.* de 2005, FETRIDGE *et al.* 2008).

Devido a este potencial em relação às abelhas e de outros polinizadores secundários, e considerando a crescente expansão da urbanização, é preciso manter, conservar e obter estratégias visando o manejo de jardins enquanto locais remanescentes que permitem a permanência dos polinizadores nessas áreas (SHEPHERD *et al.* 2003).

Devido ao fato da permanência de uma determinada população de abelha em uma área estar diretamente relacionada com os recursos florais e os locais de nidificação disponíveis, é relevante o estudo da biologia e ecologia da nidificação, assim como o comportamento de forrageamento dessas espécies. Além do conhecimento obtido acerca da biologia e ecologia destas abelhas, estudos permitem, muitas vezes, a obtenção de informações sobre as limitações de recursos e habitats utilizados por essas abelhas (FRANKIE *et al.*, 1989; ANTONINI & MARTINS, 2003).

Além da dinâmica do ambiente e das interações ecológicas, a estrutura genética das populações das espécies no ecossistema determina a sobrevivência de populações biológicas em uma determinada área. Desse modo, um estudo sobre a ecologia das espécies pode ser beneficiado quando acompanhado pelo estudo de fluxo gênico nestas populações (FREITAS *et al.*, 2005).

Embora, atualmente, já exista grande preocupação em realizar estudos sobre a biodiversidade e o manejo de ecossistemas naturais e ameaçados, a biologia e ecologia das comunidades de abelhas em áreas urbanizadas ainda são pouco estudadas, incluídas as abelhas da tribo Centridini (FRANKIE *et al.*, 1993).

Neste sentido, enfatizando que observações comportamentais detalhadas, aliadas a análises genéticas da espécie, podem ajudar no reconhecimento de fatores intrínsecos à biologia da mesma, este estudo constitui uma importante contribuição para o conhecimento da biologia e da ecologia da nidificação de uma espécie de abelha solitária – *Centris (Centris) flavifrons* FABRICIUS, 1775 – em uma área urbana, assim como sua variabilidade genética.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Descrever a biologia e a ecologia da nidificação de *Centris (Centris) flavifrons* em uma área urbana da cidade de João Pessoa, Paraíba; assim como a variabilidade genética da espécie.

2.2 Objetivos específicos

i) Descrever o estabelecimento, o processo de construção e a densidade dos ninhos de *C. flavifrons*, assim como as áreas que essas abelhas utilizam no seu processo de nidificação;

ii) Descrever a estrutura dos ninhos e células;

iii) Observar o comportamento das fêmeas nidificantes (tempo que as fêmeas dependem desde o início da construção até a conclusão do ninho, número e tempo despendido em vôos de forrageio para coleta de pólen e óleo, tempo que as fêmeas dependem para a construção de uma célula, as interações entre fêmeas construindo diferentes ninhos e verificar a possibilidade de reutilização e usurpação de ninhos; quantos ninhos uma fêmea pode construir;

iv) Estimar o número de gerações anuais para a espécie;

v) Verificar a existência de parasitismo;

vi) Verificar a variabilidade genética da espécie, assim como o parentesco genético entre os indivíduos na área principal de estudo e inferir os padrões de colonização na espécie a partir de dados genéticos mitocondriais (herança uniparental).

O cumprimento dos objetivos propostos possibilitou a apresentação dos resultados do presente trabalho na forma de dois capítulos. O primeiro capítulo, o qual aborda a biologia e ecologia da nidificação de *Centris (Centris) flavifrons*, está relacionado com os cinco primeiros objetivos. O segundo capítulo, que aborda os estudos acerca da variabilidade genética da espécie, desenvolve o que o último objetivo propõem. Os capítulos que se seguem têm a seguinte intitulação:

Capítulo I – Biologia e ecologia da nidificação de *Centris (Centris) flavifrons* (FABRICIUS, 1775) (Hymenoptera: Apidae, Centridini) em uma área urbana da cidade de João Pessoa – Paraíba;

Capítulo II – Variabilidade genética de *Centris (Centris) flavifrons* (FABRICIUS, 1775) (Hymenoptera: Apidae, Centridini).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONINI, Y. & MARTINS, R.P. 2003. The Value of a Trees Species (*Caryocar brasiliense*) for a Stingless Bee *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*. **J. Insect Conserv.**, **7**:167-174.
- BIESMEIJER, J. C.; ROBERTS, S. P. M.; REEMER, M.; OHLEMÜLLER, R.; EDWARDS, M; PEETERS, T.; SCHAFFERS, A. P.; POTTS, S. G.; KLEUKERS, R.; THOMAS, C. D.; SETTELE, J. & KUNIN, W. E. 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science**, **313** (5785): 351 -354.
- BUCHMANN, S. L. & NABHAN, G. P.. 1996. **The forgotten pollinators**. Island Press, Washington, D.C., USA.
- CANE, J. H. 2001. Habitat fragmentation and native bees: a premature verdict? **Conservation Ecology** **5(1)**: 3. [online] URL: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art3/>
- CANE, J. H. 2005. Bees, pollination, and the challenges of sprawl, p. 109-124. In: JOHNSON, E. A. & M. W. KLEMENS, M. W. (eds.), **Nature in fragments: the legacy of sprawl**. Columbia University Press, New York.
- CANE, J. H.; MINCKLEY, R. L.; KERVIN, L.; ROULSTON, T. H. & WILLIAMS, N. M. 2006. Complex responses within a desert bee guild (Hymenoptera: Apiformes) to urban habitat fragmentation. **Ecol. Appl.** **16**: 632–644.
- DENYS, C. & SCHMIDT, H. 1998. Insect communities on experimental mugwort (*Artemisia vulgaris* L.) plots along an urban gradient. **Oecologia**, **113**: 269-277.
- FETRIDGE, E. D.; ASCHER, J. S. & LANGELLOTTO, G. A. 2008. The Bee Fauna of Residential Gardens in a Suburb of New York City (Hymenoptera: Apoidea). **Entomol. Soc. Am.** **101(6)**: 1067Ð1077
- FRANKIE, G. W.; VINSON, S. B. & WILLIAMS, H. 1989. **Ecology and evolutionary sorting of 12 sympatric species of *Centris* bees in Costa Rican dry forest**. In J. H. Bock and Y. B. Linhart (Eds.). *The evolutionary ecology of plants*. Westview Press, Boulder, Colorado.

- FRANKIE, G. W.; NEWSTROM, L.; VINSON, S. B. & BARTHELL, J. F. 1993. Nesting-habitat preferences of selected *Centris* bee species in Costa Rican dry forest. **Biotropica**, **25** (3): 322-333.
- FRANKIE, G. W.; THORP, R. W.; SCHINDLER, M.; HERNANDEZ, J.; ERTTER, B. & RIZZARDI, M. 2005. Ecological patterns of bees and their host ornamental flowers in two northern California cities. **J. Kans. Entomol. Soc.** **78**: 227-246.
- FREITAS, M. L. M; AUKAR, A. P. de A; SEBBENN, A. M & MORAES, E. G. M. 2005. Variabilidade Genética Intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. Por Marcador AFLP. **Scientia Forestalis**, **68**: 21-28.
- KEARNS, C. A. 2001. North American Dipteran pollinators: assessing their value and conservation status. **Conservation Ecology** **5(1)**: [online] URL: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art5>.
- KEVAN P. G. 1991. Pollination: keystone process in sustain-able global productivity. **Acta Horticulturae**, **288**:103–110.
- KLEIN, A. M.; STEFFAN-DEWENTER, I. & TSCHARNTKE, T. 2007. Foraging trip duration and density of megachilid bees, eumenid wasps and pompilid wasps in tropical agroforestry systems. **J. Anim. Ecol.**, **73**: 517-525.
- LASALLE J. & GAULD I. D. 1993. Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. In: LA SALLE J & GAULD I.D. (eds.) **Hymenoptera and Biodiversity**. C.A.B. International, Wallingford, UK, p 1–26.
- MATHESON, A.; BUCHMANN S. L.; O'TOOLE C.; WESTRICH & WILLIAMs, I. H., (eds). 1996. **The conservation of bees**. Academic Press, London, UK.
- McINTYRE, N. & HOSTETLER, M. E. 2001. Effects of urban land use on pollinator (Hymenoptera: Apoidea) communities in a desert metropolis. **Basic Appl. Ecol.** **2**: 209–218.
- MICHENER, C. 2007. **The bees of the world**. 2nd. ed. Baltimore, Johns Hopkins University Press, 953p.
- OWEN, J. 1991. **The ecology of a garden, the first fifteen years**. Cambridge University Press, Cambridge, MA.

- REBÊLO, J. M. M. 2001. **História Natural das Euglossíneas – As abelhas das orquídeas**. Lithograf Editora, São Luís, Maranhão, Brasil. 152p.
- ROUBIK, D. W. 1989. **Ecology and natural history of tropical bees**. Cambridge, Cambridge University Press, 514p.
- SAURE, C. 1996. Urban habitats for bees: the example of the city of Berlin, pp. 47–53. In MATHESON, A.; BUCHMANN, S. L.; O'TOOLE, C.; WESTRICH, P. & WILLIAMS, I. H. (eds.), **The conservation of bees**. Academic, New York.
- SHEPHERD, M.; BUCHMANN, S. L.; VAUGHAN, M. & BLACK, S. H. 2003. **Pollinator conservation handbook**. Xerces Society, Portland, OR.
- WILLIAMS, N. M., R. L. MINCKLEY, AND F. A. SILVEIRA. 2001. Variation in native bee faunas and its implications for detecting community changes. **Conservation Ecology 5(7)**: [online] URL: www.consecol.org/vol5/iss1/art7

CAPÍTULO I

Biologia e ecologia da nidificação de *Centris (Centris) flavifrons*
(FABRICIUS, 1775) (Hymenoptera: Apidae, Centridini) em uma área
urbana.



1 INTRODUÇÃO

1.1 Biologia e ecologia das abelhas

1.1.1 As abelhas solitárias e os Centridini

As abelhas, himenópteros da superfamília Apoidea (Apiformes) são, ecologicamente, um dos mais importantes grupos de insetos, por serem os principais agentes polinizadores das Angiospermas, contribuindo de forma eficiente na manutenção dos ecossistemas naturais (BUCHMANN & NABHAN, 1996; REBÊLO, 2001). Dessa forma, as abelhas são responsáveis pela maior parte do fluxo gênico (polinização cruzada) entre indivíduos e populações adjacentes dessas plantas. (ROUBIK, 1989, 1993; NEFF & SIMPSON, 1993; PROCTOR *et al.*, 1996).

Existem cerca de 20.000 espécies descritas de abelhas (MICHENER, 2007). Dessas, 85% são solitárias, 10% cleptoparasitas e parasitas sociais (abelhas que utilizam células provisionadas por outras abelhas, normalmente solitárias, para realizar postura ou capturar os estoques alimentares) e apenas 5% apresentam diferentes graus de sociabilidade (BATRA, 1984).

O comportamento solitário é caracterizado pela independência das fêmeas na construção e provisionamento de seus ninhos. Não há cooperação, ou divisão de trabalho, entre as fêmeas de uma mesma geração, ou entre mãe e filhas. Na maioria das vezes, a mãe morre antes de sua prole emergir, sem haver relações entre gerações diferentes (MICHENER, 1974).

De acordo com Roubik (1989), Halictidae, Megachilidae e Apidae são importantes famílias de abelhas solitárias polinizadoras. Muitas espécies, como as pertencentes à família Apidae (ROIG-ALSINA & MICHENER, 1993), podem voar longas distâncias nas matas tropicais em busca de espécies vegetais preferenciais (JANZEN, 1971; FRANKIE, *et al.*, 1983), promovendo a polinização cruzada (ROUBIK, 1993; NEFF & SIMPSON, 1993).

A tribo Centridini, pertencente à família Apidae, reúne aproximadamente 176 espécies de abelhas, incluídas em dois gêneros: *Centris* Fabricius, 1804 (Figura I.1) e *Epicharis* Klug, 1807 (Figura I.2). Essas abelhas se distribuem principalmente nas regiões tropicais das Américas, com representantes presentes, incluindo espécies endêmicas, nas áreas mais secas das regiões subtropicais e temperadas (MICHENER, 2007; SILVEIRA, *et al.*, 2002).

Abelhas da tribo Centridini visitam flores para obter recursos necessários à sua manutenção e atividade reprodutiva, tais como óleos florais, pólen, néctar e resinas

(ROUBIK, 1989; VINSON, *et al.*, 1996). Essas abelhas são conhecidas por serem especializadas na coleta de óleos florais (Figura I.1). Os óleos coletados são utilizados na construção de partes do ninho e para a alimentação das larvas, juntamente com pólen (BUCHMANN, 1987; VOGEL, 1974). O néctar pode não ser utilizado no aprovisionamento de suas células, e sim como fonte de energia dos adultos (FRANKIE *et al.*, 1993).



Figura I.1. *Centris* sp. coletando óleo em flor de Malpighiaceae. Foto: Roe Brasil.



Figura I.2. *Epicharis rustica*. Foto: Giorgio Venturieri.

Dessa forma, muitos estudos têm apontado o importante papel dessas abelhas como polinizadores chave para a manutenção de várias espécies de plantas neotropicais (FRANKIE *et al.*, 1976; GOTTSBERGER *et al.*, 1988; FREITAS, 1997; SCHLINDWEIN, 2000; 2005), incluindo plantas produtoras de óleo, como espécies de Malpighiaceae (destacando-se acerola e murici) (RÊGO & ALBUQUERQUE, 1989; FREITAS *et al.*, 1999), Krameriaceae (BUCHMANN, 1987) e Scrophulariaceae (VOGEL & MACHADO, 1991).

Apesar da ampla distribuição, dos hábitos de nidificação variados e do fato de serem polinizadores essenciais para a manutenção de várias espécies vegetais nos ecossistemas tropicais, dados sobre a bionomia e os hábitos de nidificação das espécies de Centridini ainda são esparsos (JESUS & GARÓFALO, 2000; GARÓFALO *et al.*, 2004; RÊGO, 2006).

1.1.2 O gênero *Centris* e a espécie *Centris (Centris) flavifrons*

As espécies do gênero *Centris* estão distribuídas em 12 subgêneros (SNELLING, 1984; AYALA, 1998). Esse gênero possui grande diversidade de hábitos de nidificação, com as maiores diferenças aparecendo em nível subgenérico (COVILLE *et al.*, 1983). Embora alguns estudos (p.ex., VINSON & FRANKIE, 1988) revelem uma tendência geral das espécies de *Centris* em nidificar em habitats florestados, ninhos de algumas das espécies desse gênero (p.ex., *C. tarsata* Smith) são comumente encontrados em habitats quentes e iluminados (RÊGO, 2006; SILVA *et al.*, 2001; VIANA *et al.*, 2001).

Coville *et al.* (1983) fizeram uma revisão dos hábitos de nidificação do gênero *Centris*. Dentre as espécies que nidificam no solo, existem informações sobre *C. aenea* Lepeletier, 1841 (AGUIAR & GAGLIANONE, 2003), *C. flavifrons* (Fabricius, 1775) (RÊGO *et al.*, 2006), *C. colaris* Lepeletier, 1841 (CAMILLO *et al.*, 1993) e *C. fuscata* Lepeletier, 1841 (CAMILLO *et al.*, 1993).

No Brasil, as espécies mais estudadas foram aquelas que nidificam em cavidades preexistentes, principalmente em ninhos-armadilha, devido à facilidade oferecida pela técnica. As espécies que fazem seus ninhos no solo ou em termiteiros são pouco estudadas devido à dificuldade de se encontrar e observar seus ninhos (AGUIAR & MARTINS, 2002; AGUIAR & GARÓFALO, 2004; AGUIAR *et al.*, 2006; OLIVEIRA & SCHILINDWEIN, 2009).

Centris (Centris) flavifrons (Fabricius, 1775), é uma espécie de abelha solitária de grande porte e de ampla distribuição Neotropical (Figura I.3). Como a maioria dos Centridini, essas abelhas coletam óleos florais com estruturas especializadas, localizadas nos basitarsos das pernas anteriores e médias (VOGEL, 1974; ROBERT & VALLESPER, 1978; NEFF & SIMPSON, 1981), que são misturados ao pólen para provisionamento das células (BUCHMANN, 1987).



Figura I.3. *Centris (Centris) flavifrons*. Foto: Paianiplan. Disponível em <http://www.flickr.com/photos/paianiplam/5783743868>

Albuquerque & Rêgo (1989) ressaltam a eficiência do comportamento de polinização dessa espécie em flores do murici (*Byrsonima crassifolia*). Porém, os poucos estudos sobre a biologia da nidificação de *C. flavifrons* estão restritos às áreas de savana na Costa Rica (VINSON *et al.*, 1996, 1997; VINSON & FRANKIE, 1988) e no estado do Maranhão, no Brasil (RÊGO *et al.*, 2006). Peixoto (2010) deu início ao estudo da biologia e ecologia da nidificação de *C. flavifrons* em área urbanizada da cidade de João Pessoa, Paraíba, Brasil. Resultados preliminares sugerem maior tempo de construção dos ninhos em relação a estudos prévios, reutilização de ninhos, usurpação e/ou competição intraespecífica pelos locais de nidificação e a possibilidade de bivoltinismo.

Estudos sobre a biologia da nidificação também permitem, muitas vezes, a obtenção de informações sobre as limitações de recursos e habitats utilizados por essas abelhas (FRANKIE *et al.*, 1989). Moure (2001) alerta para a perda de biodiversidade e propõe algumas ações importantes para diminuir os danos causados por esta perda e aumentar o conhecimento biológico, tais como: estudo da fauna sobrevivente, incremento das coleções e revisões taxonômicas das espécies descritas.

1.2 A alteração do ambiente e as populações de abelhas

A biologia e o comportamento da flora e da fauna são diretamente influenciados pelas condições ambientais. O habitat de uma determinada espécie deve garantir disponibilidade de alimento, abrigo e boas condições de reprodução. Segundo Potts *et al.* (2005), as características que determinam a permanência e a estrutura das comunidades de abelhas em um ambiente são os caracteres florais e a disponibilidade de locais para a nidificação. Quaisquer fatores que afetem a existência ou abundância desses recursos podem interferir, negativamente, na população desses insetos (RAMBALDI & OLIVEIRA, 2003; ANTONINI & MARTINS, 2003).

A alteração do ambiente natural pode ser ocasionada por fatores tais como desmatamentos, queimadas e urbanização, entre outros, resultante da crescente intervenção humana. Um ambiente degradado pode apresentar alterações na intensidade de luz e no microclima, o que pode afetar o crescimento e a floração das plantas, limitando as condições de permanência de organismos dependentes (RINCON *et al.*, 1999).

As atividades humanas têm afetado diretamente as comunidades de plantas e, do mesmo modo, a comunidade de polinizadores, como as abelhas. A consequente redução e o isolamento da vegetação natural provocam alterações na paisagem, modificando habitats, com implicações danosas para as abelhas nativas (SAMEJIMA *et al.*, 2004).

O desenvolvimento e o aumento da urbanização são conhecidos por causarem séria diminuição na riqueza de espécies silvestres (DENYS & SCHMIDT, 1998). Contudo, mesmo no interior de cidades densamente populosas são encontrados recursos para as populações de abelhas (SAURE, 1996). Por esta razão, apesar da significativa pressão nas cidades, um número considerável de abelhas ainda pode ser ali encontrado (BANASZAK, 1992).

Muitos pesquisadores também têm identificado efeitos diretos e indiretos de impactos ambientais sobre as comunidades de abelhas quando da expansão de áreas utilizadas na agricultura e pecuária, resultando em fragmentação de matas e isolamento de habitats (POTTS *et al.*, 2005). Mais recentemente, tem sido destacado o declínio mundial dos polinizadores, com impacto direto na produtividade agrícola e a necessidade premente de estudos para avaliar parâmetros populacionais das abelhas (*e.g.* BIESMEIJER *et al.*, 2006; KLEIN *et al.*, 2007).

Frankie *et al.* (1993) chamam a atenção para a necessidade de se realizar estudos sobre a biologia reprodutiva de *Centris*, assim como outros aspectos comportamentais e ecológicos deste e de outros grupos, uma vez que as populações tendem a entrar em declínio por influência dos impactos causados ao meio (como a agricultura, queimadas e outros).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Sítio específico do estudo

A área de estudo, onde foram desenvolvidas todas as atividades de campo do presente projeto, está situada em área urbana da cidade de João Pessoa, estado da Paraíba – Brasil (Figura I.4). A altitude média da cidade de João Pessoa em relação ao nível do mar é de 10 metros, predominando terrenos planos em seu sítio urbano. O clima da cidade é quente e úmido, do tipo intertropical (As' segundo Köppen), com temperaturas médias anuais de 26°C. Existem duas estações climáticas definidas: as chuvas ocorrem no período de outono e inverno e durante todo o resto do ano o clima é seco. A pluviosidade média anual da cidade de João Pessoa é de 1780 mm. (SEPLAN-JP, 2009).

A vegetação é de mata latifoliada perenifólia costeira (Mata Atlântica). Embora seja bem urbanizada, a cidade conta com importantes resquícios da Mata Atlântica original preservados, como é o caso da Mata do Buraquinho, com cerca de 500 ha, situada a aproximadamente 1,2 Km de uma da área de estudo.

O local específico de estudo corresponde a um jardim residencial situado no bairro Jardim Cidade Universitária, localizado na Zona Sul da cidade de João Pessoa (Figura I.4) (7°9'11.74"S e 34°50'28.51"O) (Figura I.5). Estudos preliminares já foram realizados com a população de *C. flavifrons* desta área (PEIXOTO, 2010).

A maior área do jardim, posicionada lateralmente à residência, abrange um terreno de, aproximadamente, 15,55 x 33,2 metros. Em frente à residência há uma área menor de jardim, medindo aproximadamente 5 x 14,7 metros. Há ainda uma terceira área, que mede 7 x 8,4 metros, situada atrás da residência. A área externa ao jardim, na vizinhança da residência, apresenta-se consideravelmente pavimentada e urbanizada (Figura I.4). O solo apresenta principalmente uma formação arenosa e, de acordo com Villela *et al.* (2006), este tipo de solo caracteriza-se pela baixa capacidade de retenção de água e pobre em nutrientes, possuindo baixa fertilidade natural.

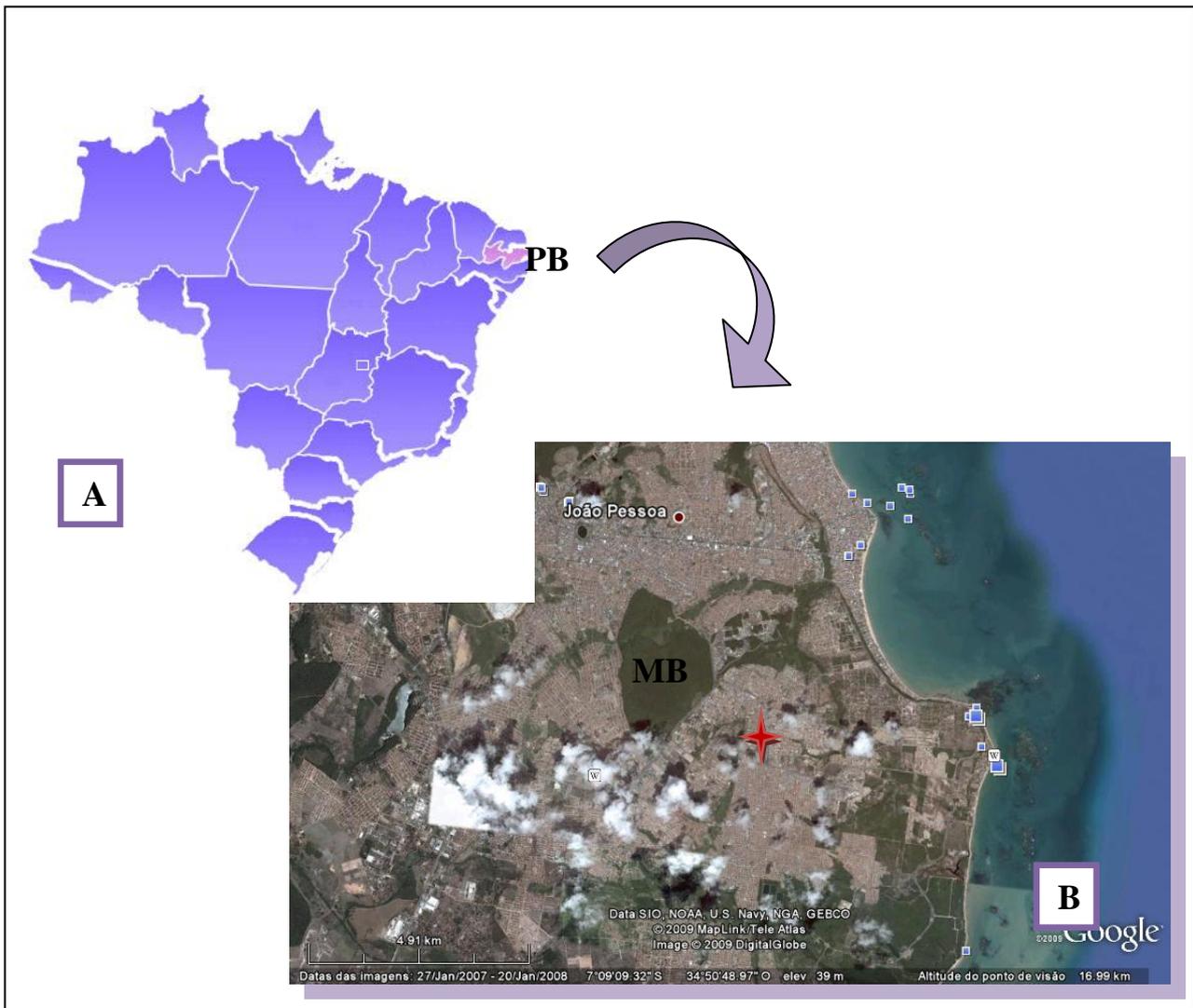


Figura I.4. A – Mapa do Brasil destacando o estado da Paraíba; B – Imagem de satélite de parte da cidade de João Pessoa, capital da Paraíba; MB – Localização da Mata do Buraquinho. A cruz vermelha indica a localização do bairro Jardim Cidade Universitária. **Fontes:** Google Earth; <http://www.paperbox.com.br/imagens/mapa_PB.jpg>.

Seu terreno compreende uma grande área aberta, com insolação direta. Isto ocorre devido à vegetação ser constituída, predominantemente, de gramíneas, possuindo também algumas espécies vegetais frutíferas das famílias Anacardiaceae (*Mangifera indica*, *Anacardium occidentale* e *Spondias purpurea*), Malpighiaceae (*Malpighia emarginata*), Myrtaceae (*Eugenia uniflora*, *Syzygium malaccense* e *Psidium guajava*), Rutaceae (*Citrus limon* e *Citrus sinensis*), Arecaceae (*Cocos nucifera*), Caricaceae (*Carica papaya*) e Moraceae (*Morus* sp.). Tais características do solo, de insolação, da vegetação e da disponibilidade de recursos provavelmente são premissas para que ocorra o estabelecimento dos ninhos de *C. flavifrons*.

O jardim tinha algumas pequenas áreas com solo descoberto, que consiste em 22 círculos ao redor das árvores do pomar, com aproximadamente 1 metro de diâmetro cada, e uma estreita faixa de terra ao longo das paredes do jardim (20 cm X 167,6 m) (Figura I.5)



Figura I.5. Parte do jardim lateral com ênfase em uma coroa de planta, as quais são utilizadas no entorno das espécies vegetais frutíferas. Foto: Marcella Peixoto.

2.2 Monitoramento e coleta de dados

Aspectos da biologia e ecologia da nidificação da espécie *Centris (Centris). flavifrons* foram estudados no campo ao longo de todo seu período de nidificação. Houve dois períodos de nidificação durante o presente estudo: o primeiro período ocorreu de outubro de 2010 até o começo de março de 2011, já os dados sobre o segundo período, o qual começou no final de setembro de 2011, foram interrompidos na metade do mês de janeiro de 2012, quando o prazo para a realização deste trabalho findou. De modo geral, os meses de setembro a março correspondem ao período de estiagem na região, quando, de acordo com os dados climáticos, a pluviosidade diminui e aumenta o índice de insolação e a temperatura. Um total de cerca de 161 dias e 928 horas de observações foram realizadas.

Dez fêmeas e ninhos foram continuamente observados diariamente a partir de 04:30 às 17:30h de 14 a 25 Novembro/2010, e de 11 a 22 de Novembro/2011. Nesses períodos de observações contínuas, foram observados o período de atividade de cada ninho (desde a construção até a sua conclusão); a duração do tempo gasto dentro e fora do ninho por cada fêmea; o número, horário e duração dos voos de forrageio, assim como os recursos florais coletados; e o comportamento de fêmeas nidificantes. A área do jardim também foi

vistoriada à procura de novos ninhos que, quando encontrados, foram imediatamente marcados e registrados.

Nos dias subsequentes às observações contínuas, as fêmeas e os ninhos continuaram a ser monitorados em dias alternados (por, aproximadamente, 4 a 5 horas/dia) para a observação do número de novos ninhos construídos, do comportamento das fêmeas nidificando e do tempo de desenvolvimento dos imaturos até a emergência dos imagos. Essas observações, embora em dias alternados, ainda permitiram inferir o número de ninhos diários fundados na área, levando-se em consideração as características externas do ninho.

Alguns ninhos de *C. flavifrons* eram localizados no momento em que as fêmeas entravam em seus ninhos. Os montículos de areia próximos às entradas dos ninhos, resultantes do seu processo de escavação, também facilitavam a localização dos ninhos. O comportamento das fêmeas nos ninhos foi observado *in loco*, diretamente, com o auxílio de um monóculo Zeiss e/ou através de filmagens em vídeo com câmara digital Sony HDR SR11.

Para marcação dos ninhos, inicialmente foram utilizadas hastes de madeira e, posteriormente, de alumínio, as quais possuíam 15 cm de altura e uma placa na sua extremidade apical, onde eram marcados, com tinta permanente vermelha, os seus respectivos números de registro, de acordo com a ordem que foram encontrados (N1, N2, N3,...). Cada haste foi posicionada próxima à entrada do seu ninho, com o número direcionado para a entrada do mesmo (Figura I.6). Os dados obtidos com o tombamento dos ninhos possibilitaram o cálculo da densidade de ninhos construídos nas áreas de estudo.

Os dados de cada ninho e suas respectivas fêmeas foram registrados em um diário de campo, assim como as fases da nidificação, os horários das atividades realizadas pelas abelhas, o material coletado (pólen/óleo) e outras observações adicionais. Esses dados foram transferidos para planilhas eletrônicas.

Também foram disponibilizados 10 vasos (preenchidos com areia) para a fundação de novos ninhos em locais selecionados, funcionando como “vasos-armadilha”, facilitando a escavação dos possíveis ninhos fundados nos vasos e a obtenção das células de cria. Esses vasos, feitos de cimento e geralmente utilizados para jardinagem, mediam 52 cm de altura, 32 cm de diâmetro interno na base e 52 cm de diâmetro interno na sua abertura. Sete vasos foram enterrados, ficando ao nível do solo, e três foram deixados sobre a superfície do jardim (Figura I.7).



Figura I.6. Ninho 34 (N34) marcado. Observar a marcação posicionada para a entrada do ninho (importante na detecção do ninho quando há muitos próximos). Foto: Marcella Peixoto.



Figura I.7. Vasos disponibilizados como “vasos-armadilha”. A – Vaso exposto; sobre o substrato; B – Vaso enterrado; no nível do substrato. Foto: Marcella Peixoto.

Além disso, foram instaladas 20 gaiolas (feitas de alumínio e tela de náilon) sobre alguns ninhos já concluídos, objetivando-se conhecer o período de emergência e capturar os emergentes para coleta de material biológico para análise genética (ver capítulo II) (Figuras I.8 e I.9).

As gaiolas foram elaboradas em dois tamanhos diferentes: 10 gaiolas medindo 70 cm x 70 cm (Figura I.8), e outras 10 gaiolas medindo 15 cm x 15 cm (Figura I.9); ambas medindo também 15 cm de altura e com “pés” de 15 cm para auxiliar a fixação das mesmas no solo. As 10 gaiolas menores foram dispostas exatamente sobre as antigas entradas de alguns ninhos (ou grupo de ninhos), enquanto as outras 10 gaiolas maiores foram dispostas a cerca de 15 cm das antigas entradas, estando posicionadas em frente a elas, na mesma direção daqueles ninhos. A finalidade dessa disposição das gaiolas foi observar se as abelhas emergentes saem do solo através da entrada/túnel original do ninho ou se escavam uma rota diferente para chegar até a superfície do solo.

Para obtenção de dados sobre a estrutura dos ninhos, número e descrição de células, obtenção de imaturos e coleta de material polínico, foram escavados alguns ninhos (Figuras I.10 e I.11). Os imaturos e o material polínico encontrados nessas células foram coletados visando estudos posteriores à vigência desse trabalho.



Figura I.8. Gaiola maior disposta sobre um ninho fundado no vaso. Foto: Marcella Peixoto.



Figura I.9. Gaiolas menores dispostas sobre ninhos fundados em uma coroa do jardim. Foto: Marcella Peixoto.

Para facilitar as escavações dos ninhos, foi utilizado gesso em consistência líquida, para fazer com que esse material alcançasse o fim dos túneis construídos pelas fêmeas. Para tanto, só foi possível a escavação de um ninho quando se conhecia o período exato do início do seu fechamento, objetivando-se a obtenção dos túneis ainda abertos. Outra premissa para que um ninho fosse escavado era a de que esse tinha que estar isolado, distantes de outros ninhos, para que as células obtidas correspondessem apenas àquele ninho.

As escavações foram realizadas logo após a secagem/endurecimento do gesso, o qual serviu como um molde na descrição da estrutura do ninho e também um facilitador na localização das células. Porém, quando o ninho foi fundado em um vaso-armadilha, foi permitida a conclusão e fechamento do ninho. A escavação desses ninhos foi importante para a obtenção do número total de suas células.



Figura I.10. Escavação de um ninho. Foto: ²⁷ Marcella Peixoto.



Figura I.11. Escavação de ninhos em vaso-armadilha (vaso 3). Foto: Celso F. Martins.

2.2.1 Método de marcação

Para a individualização e um monitoramento acurado do comportamento de nidificação das fêmeas de *C. flavifrons*, incluindo as interações entre fêmeas, a reutilização e usurpação de ninhos, número de ninhos construídos, assim como a movimentação dessas abelhas em áreas urbanizadas, foi utilizado o método de marcação das abelhas (Figuras I.12 e I.13). No entanto, para se ter o “controle” no estudo do comportamento, no segundo período do estudo não foi realizada a marcação e a retirada do flagelo da antena direita das fêmeas.

As abelhas foram capturadas diretamente nos seus ninhos, durante a fase de provisionamento do mesmo, para que haja uma menor interferência nas suas atividades de nidificação. Ao observar a abelha entrando no ninho, um recipiente de vidro era colocado na entrada do mesmo. No momento da saída, a abelha era capturada e levada para refrigeração, em torno de 8 a 10 min. no *freezer*, o que causa sua total imobilidade, tornando possível a marcação. Essa técnica foi testada anteriormente e verificou-se que, após o resfriamento, as abelhas reassumem as atividades de nidificação e forrageio normalmente (PEIXOTO, 2010).



Figura I.12. *C. flavifrons* posicionada na entrada do ninho com o tórax marcado de verde no lado direito e azul no lado esquerdo. Foto: Marcella Peixoto.

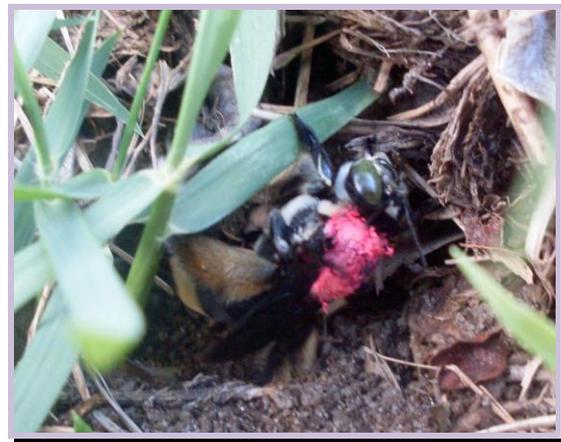


Figura I.13. *C. flavifrons* marcada com tinta permanente vermelha no tórax (momento da soltura). Foto: Marcella Peixoto.

Após a retirada do indivíduo da refrigeração, foi retirado o flagelo da antena direita de cada abelha para análise genética (ver capítulo II). Em seguida, a marcação foi realizada

utilizando-se canetas de tinta permanente *Edding 791*. Devido à disponibilidade restrita de cores destas canetas, foi criado um esquema de combinação de cores e de regiões marcadas nas abelhas (pronoto, escutelo ou todo o tórax), garantindo que cada fêmea tenha uma marcação única (Figura I.14).

A marcação com tinta possibilita uma fácil visualização e distinção dos indivíduos marcados mesmo a certa distância, não provocando injúrias e o estresse causado por uma recaptura. (PEAKALL & SCHIESTL, 2004). Entretanto, também foi realizado o uso de etiquetas numeradas de diferentes cores (utilizadas para marcação de rainhas de *Apis mellifera*), que são úteis para animais recapturados após vários meses, o que permitirá também dados sobre longevidade, quando for o caso. Após a marcação, as abelhas foram colocadas próximas aos locais de captura para a soltura. A abelha capturada em determinado ninho recebeu o mesmo número de designação do ninho, por exemplo, a abelha capturada no ninho 1 (N1) recebeu a designação de abelha 1 (A1).

Em geral, a tinta utilizada na marcação perdurou nas abelhas durante os dias de observação, sendo possível visualizá-las sem a necessidade de recapturá-las e remarcá-las. Apenas em algumas poucas abelhas foram necessários retoques. Entretanto, notou-se que em algumas abelhas com ninhos de longa duração o número das etiquetas foram apagados e os pêlos de grande parte do mesoscuto foram perdidos, provavelmente pelo atrito com as paredes do túnel.

		BRANCO				VERMELHO				VERDE				DOURADO				AZUL			
		Dir.	Esq.	Pron.	Esc.	Dir.	Esq.	Pron.	Esc.	Dir.	Esq.	Pron.	Esc.	Dir.	Esq.	Pron.	Esc.	Dir.	Esq.	Pron.	Esc.
BRANCO	Dir.																				
	Esq.																				
	Pron.																				
	Esc.																				
VERMELHO	Dir.																				
	Esq.																				
	Pron.																				
	Esc.																				
VERDE	Dir.																				
	Esq.																				
	Pron.																				
	Esc.																				
DOURADO	Dir.																				
	Esq.																				
	Pron.																				
	Esc.																				
AZUL	Dir.																				
	Esq.																				
	Pron.																				
	Esc.																				

Figura I.14. Tabela das possíveis combinações de cores de tinta e regiões das abelhas utilizadas para a marcação. As combinações assinaladas em cinza ou as que estão em branco foram descartadas; as combinações assinaladas em azul foram possíveis de ser utilizadas.

2.3 Análise dos dados

Os dados de campo obtidos durante todo o estudo foram digitados em planilhas e processados utilizando o *software Excel for Windows*, possibilitando cálculos de estatística básica, como média e desvio padrão, além da elaboração de gráficos com o desenvolvimento do processo de nidificação.

Para a comparação da duração em minutos dos voos de coleta e/ou da descarga de material forrageado foi utilizado o teste Z através do programa BioEstat v5.

3 RESULTADOS

3.1 Locais de nidificação e ninhos

Na área de estudo, pôde-se observar que o estabelecimento dos ninhos de *C. flavifrons* ocorreu em superfícies horizontais de solo arenoso, as quais permaneciam ensolaradas durante a maior parte do dia. Na agregação, a maioria dos ninhos foi fundada em locais de solo desnudo, sem grama, localizados no interior das coroas em torno das plantas e nas áreas mais próximas do muro do jardim, onde a grama havia sido retirada (Figuras I.15). Em algumas dessas áreas de solo desnudo, os ninhos estavam consideravelmente agrupados (Figuras I.16 e I.17). Alguns ninhos também foram fundados em áreas com pouca grama.

Próximo à entrada de cada ninho, era depositado um montículo de substrato arenoso proveniente do processo de escavação dos ninhos. Tais montículos são característicos por possuírem um canal central, originado pelo comportamento das fêmeas de empurrar o solo para trás com as pernas anteriores e posteriores, enquanto se apóia nas pernas medianas, andando de marcha-ré (Figura I.15). A retirada da areia para fora do ninho foi realizada em sessões cada vez mais demoradas devido ao aumento da profundidade do ninho.



Figura I.15. Ninho 22 (N22) durante o seu processo de escavação (ao lado encontra-se o N32). Observar o montículo de areia com a calha central, característico dos ninhos de *C. flavifrons*. Foto: Celso F. Martins.

As entradas dos ninhos tinham forma circular bem definida. A maioria dos ninhos tinha entradas expostas, bem visíveis. No entanto, alguns ninhos possuíam entradas camufladas pela própria grama do terreno ou por pequenas plantas no seu entorno. Outros ninhos tinham suas entradas embaixo das pedras que formavam as coroas em torno das plantas que se encontravam nestas coroas, ficando camufladas.

Foi encontrado um total de 286 ninhos de *C. flavifrons* em toda a área do jardim. Desse total, 174 ninhos foram registrados na área durante o primeiro período de monitoramento (Figuras I.16, I.17, I.18 e I.20), enquanto os demais 112 ninhos foram registrados no segundo período do estudo (Figuras I.19 e I.21). O número máximo de ninhos fundados em um único dia foi 15, por outro lado, em outros dias, não foi registrado nenhum ninho novo, ou seja, recém-fundado (Figura I.20).

Considerando o número de ninhos fundados diariamente na área de estudo, as atividades de nidificação das *C. flavifrons* apresentaram claramente dois picos durante o primeiro ano. Um dos picos ocorreu aproximadamente no meio do mês de novembro de 2010 (10 a 20 de novembro de 2010), enquanto o segundo pico no número de ninhos recém-fundados ocorreu em torno do meio do mês de janeiro (10 a 20 de janeiro de 2011), cerca de dois meses após o primeiro pico (Figura I.20). Já no segundo ano, o número de ninhos recém-fundados foi mais distribuído ao longo do período, porém, dois picos puderam ser observados (o primeiro sendo na primeira semana de novembro e o segundo no meio/final de dezembro de 2011) (Figura I.21).

No primeiro ano do estudo, na maior área do jardim (lateral), foram encontrados 110 ninhos ($d = 0,23$ ninhos/metro²) (Figura I. 16). Nas áreas menores, nos jardins anteriores e posteriores à residência, foram encontrados 58 ($d = 0,61$ ninhos/metro²) e 6 ninhos ($d = 0,10$ ninhos/metro²), respectivamente (Figura I.17). Dessa forma, a densidade de ninhos em toda a área do jardim foi de $0,28$ ninhos/m². Durante o segundo ano de monitoramento, foram registrados 99 ninhos no jardim lateral ($d = 0,21$ ninhos/m²), 12 no jardim anterior ($d = 0,13$) e 1 no jardim posterior ($d = 0,01$). A densidade total de ninhos na área foi de $0,18$ ninhos/m². No entanto, se considerarmos apenas as áreas sem grama (ao longo do muro, dos vasos e das coroas das plantas; $a = 52,9$ m), a densidade total dos ninhos é de $5,4$ ninhos/m².

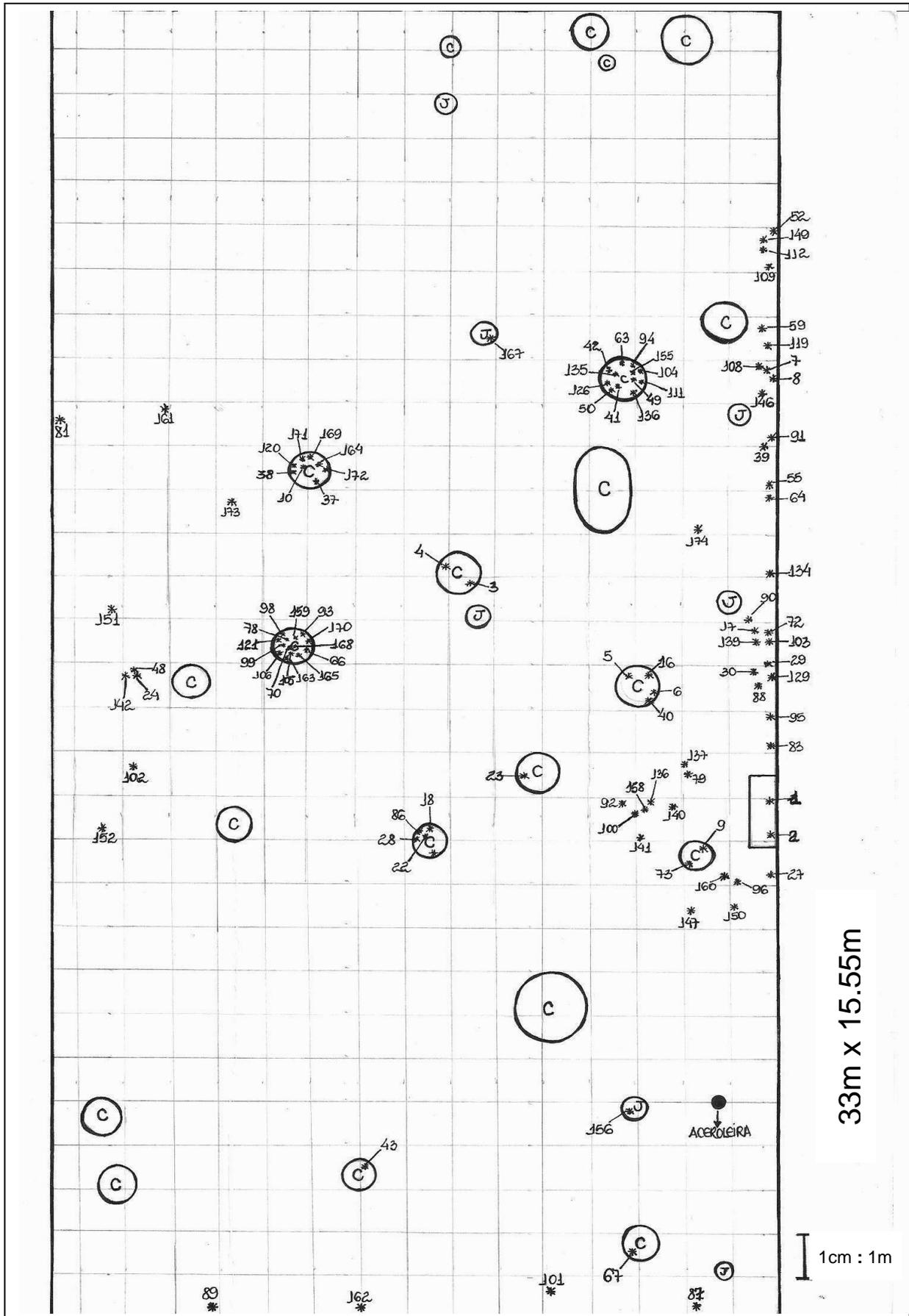


Figura I.16. Ilustração esquemática da maior área do jardim (Jardim Lateral), situada lateralmente à residência, demonstrando a composição e distribuição dos seus elementos. A ilustração corresponde ao primeiro período de monitoramento da área. **Legenda:** C – coroa das plantas; J – jarro (armadilhas); * - ninhos estabelecidos na área, com suas respectivas numerações de registro.

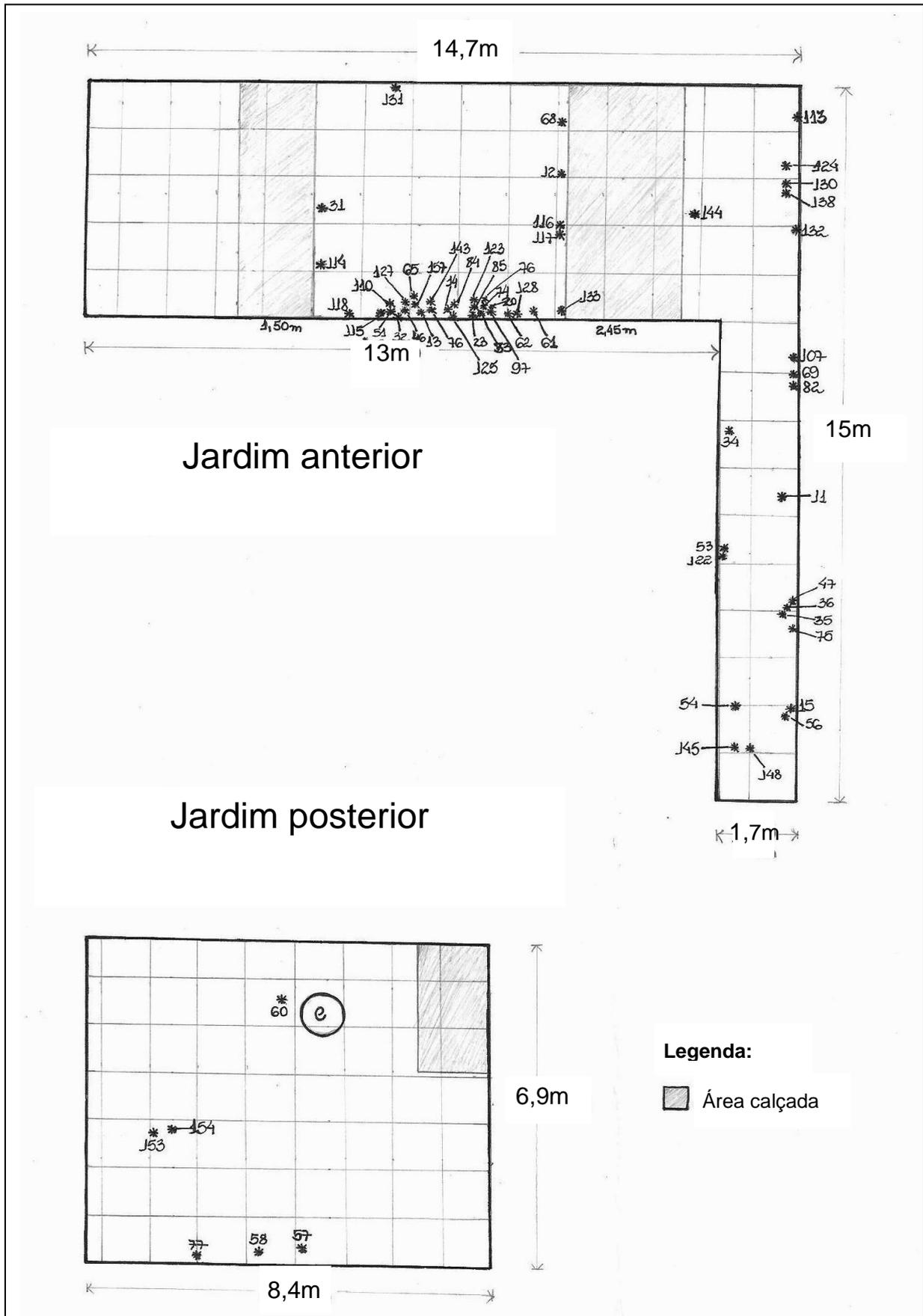


Figura I.17. Ilustração esquemática do jardim da frente e do jardim de trás, situadas anterior e posteriormente à residência, demonstrando a composição e distribuição dos seus elementos. A ilustração corresponde ao primeiro período de monitoramento da área. **Legenda:** C – coroa das plantas; J – jarro (armadilhas); * - ninhos estabelecidos na área, com suas respectivas numerações de registro.

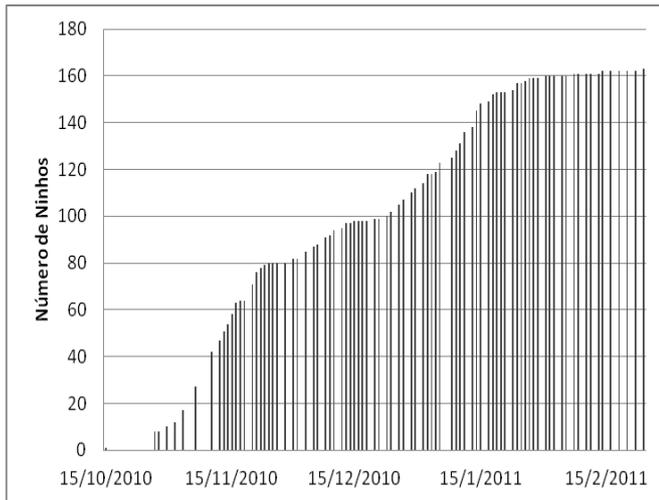


Figura I.18. Número acumulado de ninhos fundados na área de estudo ao longo do primeiro período das atividades de nidificação de *C. flavifrons*.

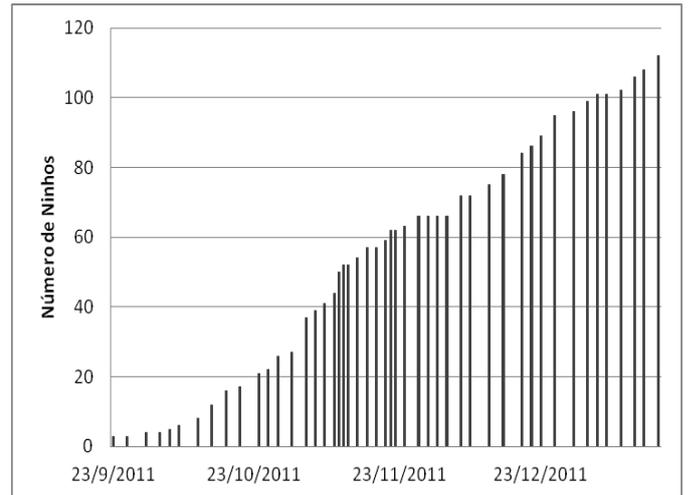


Figura I.19. Número acumulado de ninhos fundados na área de estudo ao longo do segundo período das atividades de nidificação de *C. flavifrons*.

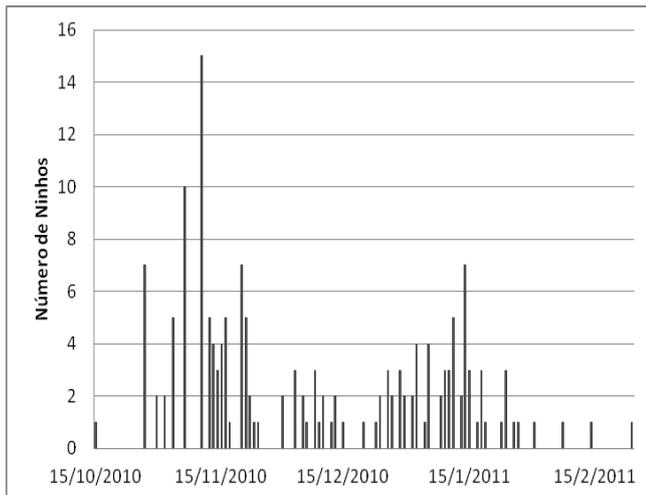


Figura I.20. Número de ninhos fundados por dia na área de estudo ao longo do primeiro período das atividades de nidificação de *C. flavifrons*.

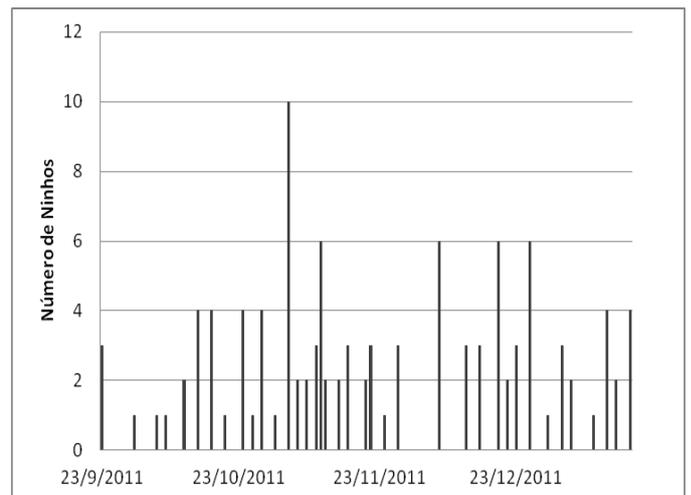


Figura I.21. Número de ninhos fundados por dia na área de estudo ao longo do segundo período das atividades de nidificação de *C. flavifrons*.

O tempo de escavação dos ninhos que estavam sendo fundados foi medido em 12 ninhos (média = 3h e 40min.; d.p.:78,5 min.). Esse tempo compreende desde o momento em que a fêmea pousa no substrato e começa o processo de escavação, jogando areia para trás com as pernas, até o momento em que a atividade de escavação cessa, antes de a fêmea começar a fazer os primeiros voos de forrageio. O menor tempo despendido por uma fêmea para a escavação do seu ninho foi de 1h e 20 min., enquanto que o maior tempo

despendido para escavação levou aproximadamente 5h e 30 min. (330 min.) para escavar o seu ninho. (Figura I.22).

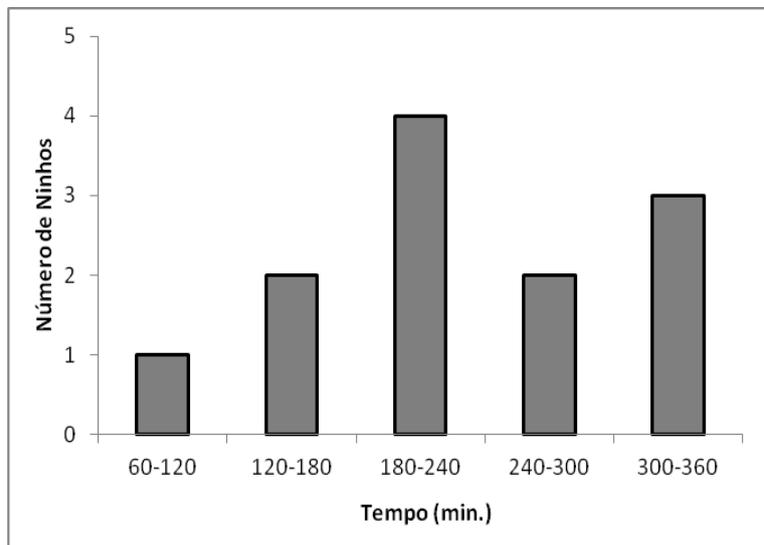


Figura I.22. Tempo de escavação de 12 ninhos de *C. flavifrons* realizados por fêmeas distintas.

Em 141 ninhos, foi observado o tempo total de atividade, desde a data de fundação até a conclusão (média = 6,9 dias; d.p. 4,2). O intervalo mínimo de tempo que cada ninho ficou ativo foi de dois dias (n=17), enquanto o intervalo de tempo máximo que um ninho ficou ativo foi de 19 dias (n=1). Pôde-se, portanto, observar uma grande amplitude no número de dias que um ninho pode permanecer ativo, tendo a maior parte dos ninhos (68,8%) um período de atividade de 2 a 7 dias. (Figura I.23).

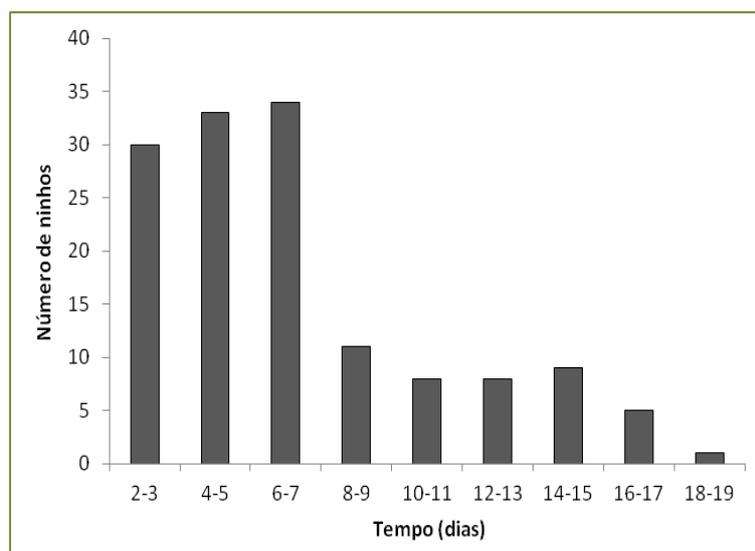


Figura I.23. Tempo de atividade, desde a escavação até a conclusão, dos ninhos de *C. flavifrons* (n=141).

Foram observados casos de reativação de ninhos na primeira temporada. O N11, por exemplo permaneceu ativo por 12 dias. No entanto, cinco dias após a sua conclusão, a mesma abelha, A11 (marcada de verde direito e branco esquerdo, N°14), retornou para esse ninho, mantendo-o ativo (aprovisionando-o) por, no mínimo, mais quatro dias. O N88 também foi reativado, porém não pela abelha fundadora. Após 16 dias de atividade, o N88 foi concluído e a fêmea fundadora (marcada de dourado direito e azul esquerdo, N°32) apareceu morta na frente do seu ninho. Nove dias depois, o ninho foi reativado por outra fêmea. Outra reativação, após 16 dias de sua conclusão, foi observada no N92 da segunda temporada. Porém, por não ter ocorrido a marcação das fêmeas nesse segundo período, não foi possível saber se a reativação foi realizada pela fêmea fundadora ou por outra fêmea. Entretanto, na maioria dos ninhos não foram encontradas fêmeas distintas, apenas a própria fundadora do ninho. Porém, foi observado que fêmeas procurando novos locais para nidificação, ou retornando para seu próprio ninho após um voo de forrageio, às vezes entravam em outros ninhos próximos, mas logo saíam (ver item 3.3).

Os ninhos foram considerados concluídos quando suas atividades cessaram e suas entradas foram fechadas pela fêmea com areia. Porém, alguns ninhos considerados concluídos (sem atividade) não foram fechados com areia até a sua entrada, restando alguns centímetros (em torno de 5 a 10 cm) do túnel aberto. Durante a noite, fêmeas foram observadas utilizando o interior desses ninhos já concluídos (sem atividade durante o dia) para pernoitar. Houve também ninhos aparentemente sem atividade que permaneceram totalmente abertos, mesmo após sua conclusão.

3.1.1 Estrutura dos ninhos e células

Foram escavados seis ninhos de *C. flavifrons*. Em dois desses ninhos escavados foi observada a estrutura dos ninhos, uma vez que foram fundados no substrato e não nos vasos-armadilha, e coletadas algumas células construídas nesses ninhos. Ambos os ninhos apresentaram um túnel principal (com aproximadamente 2 cm de diâmetro) com duas ramificações em suas extremidades. Em um dos ninhos, o túnel principal encontrava-se num ângulo de inclinação de aproximadamente 50° em relação ao substrato. O túnel principal media 30 cm até as duas ramificações na sua extremidade. O ângulo da ramificação em relação ao túnel principal foi de 130°. Os túneis secundários (formados após a bifurcação) tinham 30 cm (em formato de “L”) e 11 cm. O comprimento total do ninho foi de 60 cm (Figura I.24). Foram encontradas duas células nesse ninho. Já o outro ninho apresentou túnel principal de 26 cm, e duas ramificações de 5 e 6 cm. Este curto tamanho pode ter sido

ocasionado por artefato de técnica, pois o gesso pode não ter preenchido todo o comprimento do túnel; ou o ninho havia sido concluído e fechado parcialmente. Os ângulos de inclinação do túnel principal e das suas ramificações em relação a ele foram similares em ambos os ninhos, porém, só foram localizadas células em apenas um deles.

Além desses dois ninhos descritos, os quatro outros ninhos escavados foram fundados em vasos-armadilha, sendo possível a obtenção de dados sobre o número total de células construídas. Na escavação de um dos ninhos fundado em vaso-armadilha, foram encontradas seis células. Os resultados da escavação mostraram que podem ser construídas mais de uma célula no final de cada túnel, ficando uma célula subsequente a outra, posicionadas, considerando a disposição vertical dos túneis, uma acima da outra (Figura I.25).



Figura I.24. Molde, em gesso, da estrutura de um ninho fundado no substrato. Foto: Celso F. Martins.



Figura I.25. Escavação do vaso 3. É possível visualizar duas células a, aproximadamente, 40 cm de profundidade. Foto: Celso F. Martins.

Os outros três ninhos foram fundados simultaneamente por fêmeas distintas em um mesmo vaso-armadilha. No total, para os três ninhos, foram encontradas 16 células nesse vaso, localizadas em profundidades variáveis (29 a 43 cm de profundidade) (Figura I.26 e I.27). As dimensões das células encontram-se na tabela I.1.

De forma geral, observa-se que as dimensões das células apresentaram pouca variação. As células apresentam-se em forma de barril, com base arredondada e com

prolongamentos das paredes laterais acima do opérculo da célula, formando um colar. O opérculo possui um processo central curvo – o *nipple* (Figura I.28).



Figura I.26. Material resultante da escavação do vaso 3. No momento, algumas células encontram-se fechadas, enquanto os materiais das demais já estão depositados em tubos de vidro contendo álcool absoluto. No canto esquerdo superior há uma célula aberta contendo uma larva em fase de pré-pupa. Foto: Marcella Peixoto.



Figura I.27. Escavação do vaso 3. É possível visualizar três células a, aproximadamente, 40 cm de profundidade. Foto: Celso F. Martins.

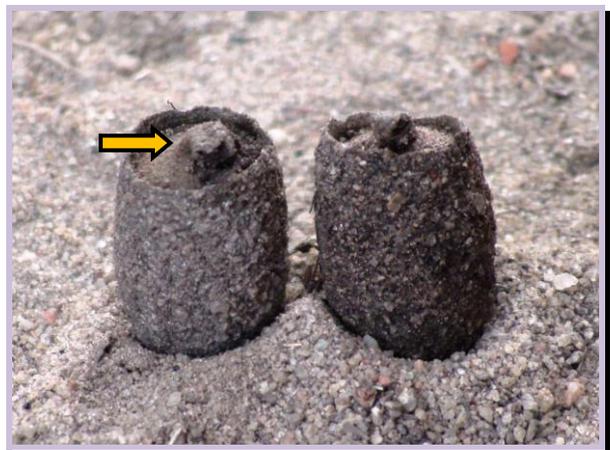


Figura I.28. Células de *C. flavifrons*. Seta indicando o processo central da cápsula – *nipple*. Foto: Celso F. Martin

Um total de 31 células foram obtidas após a escavação dos vasos-armadilha. Deste, 15 células de cria foram mantidas em frascos de vidro para aguardar a emergência dos imagos. Dois machos e duas fêmeas emergiram, aproximadamente, entre 60-75 dias após a conclusão dos ninhos. Os primeiros dados foram obtidos a partir de abelhas que emergiram

no verão, enquanto o segundo é de uma abelha que surgiu no início da estação chuvosa. As 6 células do ninho do vaso menor (vaso do jardim, com planta) foram abertos 11 dias após a fundação e apresentou todos os estágios larvais, incluindo uma pré-pupa (Figuras I.29 e I.30). Todos esses imaturos estavam vivos. Onze dos 31 células (35,5%) apresentaram mortalidade (2 em fase de ovo, 4 larvas, 4 prepupa, e uma pupa) por razões desconhecidas.



Figura I.29. Célula aberta contendo uma larva (primeiro estágio do desenvolvimento) sobre uma espessa camada de óleo e, logo abaixo dela, na base da célula, encontra-se depositado o pólen. Foto: Celso F. Martins.



Figura I.30. Célula aberta contendo uma larva defecante (estágio de pré-pupa) no interior de um casulo. Observar o acúmulo de fezes na base da célula (seta). Foto: Marcella Peixoto.

Tabela I.1. Medidas das 16 células encontradas no vaso 3. Não foi possível realizar as medições nas células 8, 10 e 13, pois estas quebraram durante o processo de medição. Todas as medidas estão em milímetros, exceto a profundidade, que está em centímetros.

CÉLULA	PROFUND. NO VASO (cm)	COMPRIM. TOTAL	COMPRIM. SEM O NIPPLE	DIÂMETRO SUPERIOR	DIÂMETRO MAIOR	DIÂMETRO DO NIPPLE	ESPESSURA DA PAREDE
1	29	28	25	15	18	5	1,8
2	28	28	26	14	18	5	1
3	30	28	25	14	18	5	
4	31,2	29	26	15	18	5	1,5
5	33	29	26	14	23	4	
6	31	30	27	14	19	5	2
7	35	29	25	14	17	5	1,2
8	33	-	-	-	-	-	-
9	36	29	27	14	20	5	
10	37	-	-	-	-	-	-
11	38	28	25	15	18	4	
12	41	27	25	14	16	5	
13	40	-	-	-	-	-	-
14	43	26	24	13	15	4	0,8
15	49	28	25	14	22	4	
16	43	27	25	14	16	4	1
Média	-	28,15	25,46	14,15	18,31	4,62	1,33

Além desses quatro ninhos fundados em vasos-armadilha, mais dois ninhos foram fundados nesses locais. Esses dois ninhos não foram escavados objetivando-se o conhecimento do período de emergência e a obtenção dos emergentes. Porém, nenhum indivíduo emergiu nos vasos até o momento, mesmo sendo, ambos os ninhos, fundados no primeiro período do estudo. Dessa forma, não houveram emergentes nas gaiolas instaladas sobre os vasos-armadilha. Em toda a área de estudo, quatro emergentes foram capturados nas gaiolas. Três desses indivíduos emergiram no início do primeiro ano de estudo, sendo, portanto, resultado de um período de nidificação anterior ao do presente trabalho. Todos os três espécimes foram marcados e soltos após a coleta do flagelo da antena direita. Apenas dois indivíduos (um macho e uma fêmea) emergiram nas gaiolas no segundo ano de monitoramento.

3.2 Marcação das fêmeas

No total, foram capturadas e marcadas 54 abelhas. Na tabela I.2 encontra-se a lista das abelhas marcadas durante o estudo. Foram capturadas e marcadas 50 abelhas em seus respectivos ninhos. Duas abelhas (A6a e A6b) foram capturadas e marcadas no N6. Uma segunda abelha também foi marcada no N88, a A88b. Isto comprova uma segunda ocupação do ninho por outra abelha. Porém, além das abelhas nidificantes, uma fêmea foi capturada enquanto sobrevoava a área com comportamento característico de que estava à procura de local para nidificar. Três abelhas foram marcadas logo após suas emergências (Tabela I.2).

Tabela I.2. Lista das abelhas marcadas durante o estudo (n=54). A designação da combinação realizada para a marcação de cada abelha segue sempre o mesmo padrão (cor e região do corpo, nesta ordem).

Data	Designação da abelha	Marcação (cor/região do corpo)	Número da etiqueta	Cor da etiqueta
27/10/2010	A3	Dourado Todo o Tórax	—	—
28/10/2010	A6a	Azul Dir.; Vermelho Esq.	—	—
28/10/2010	A7	Vermelho Pronoto	—	—
30/10/2010	A6b	Branco Todo o Tórax	—	—
30/10/2010	A9	Azul Dir.; Branco Esq.	—	—
1/10/2010	A1	Branco dir.; Vermelho Esq.	—	—
5/11/2010	emerg.	Branco Dir.; Verde Esq.	—	—
5/11/2010	emerg.	Branco pronoto; Verde escutelo	—	—
9/11/2010	A24	Branco Dir.; Verde Esq.	1	Vermelha
9/11/2010	A20	Branco pronoto; Verde escutelo	2	Vermelha
9/11/2010	A25	Verde Pronoto; Branco Escutelo	3	Vermelha
10/11/2010	A40	Verde Pronoto; Vermelho Escutelo	4	Vermelha
10/11/2010	A27	Branco Dir.; Dourado Esq.	6	Vermelha
10/11/2010	A22	Vermelho Pronoto; Verde Escutelo	8	Vermelha
10/11/2010	A28	Dourado Dir.; Branco Esq.	9	Vermelha
10/11/2010	A33	Branco Pronoto; Vermelho Escutelo	10	Vermelha
12/11/2010	A43	Vermelho Dir.; Branco Esq.	11	Vermelha
12/11/2010	A42	Vermelho pronoto; Branco Escutelo	12	Vermelha
12/11/2010	A11	Verde Dir.; Branco Esq.	14	Vermelha
12/11/2010	A21	Branco Pronoto; Dourado Escutelo	15	Vermelha
12/11/2010	A14	Branco Dir.; Azul Esq.	16	Vermelha
15/11/2010	A19	Vermelho Dir.; Azul Esq.	17	Vermelha
15/11/2010	A57	Vermelho Dir.; Verde Esq.	18	Vermelha
16/11/2010	emerg.	Azul Pronoto; Vermelho Escutelo	19	Vermelha
16/11/2010	voando	Azul Dir.; Verde Esq.	20	Vermelha
17/11/2010	A51	Azul pronoto; Verde Escutelo	21	Vermelha
18/11/2010	A64	Verde Todo o Tórax	22	Vermelha
18/11/2010	A55	Azul Pronoto; Branco Escutelo	23	Vermelha
20/11/2010	A54	Verde Dir.; Azul Esq.	24	Vermelha
20/11/2010	A58	Branco pronoto; Azul Escutelo	25	Vermelha
21/11/2010	A56	Vermelho Pronoto; Azul escutelo	26	Vermelha
24/11/2010	A66	Azul Todo o Tórax	27	Vermelha
30/11/2010	A74	Verde Dir.; Vermelho Esq.	28	Vermelha
30/11/2010	A71	Verde Pronoto; Azul Escutelo	29	Vermelha
30/11/2010	A62	Azul Pronoto; Dourado Escutelo	30	Vermelha
3/12/2010	A81	Verde Pronoto; Dourado Escutelo	31	Vermelha
8/12/2010	A88	Dourado Dir.; Azul Esq.	32	Vermelha
8/12/2010	A83	Azul Dir.; Dourado Esq.	33	Vermelha
8/12/2010	A92	Vermelho Escutelo; Dourado Pronoto	34	Vermelha

Tabela I.2. Continuação.

29/12/2010	A102	Dourado Pronoto; Azul Escutelo	35	Vermelha
29/12/2010	A104	Verde Dir.; Dourado Esq.	36	Vermelha
5/1/2011	A123	Azul Dir.; Branco Esq. REPETIDA	37	Vermelha
11/1/2011	A124	Dourado Pronoto; Verde Escutelo	38	Vermelha
11/1/2011	A132	Vermelho Dir.; Dourado Esq.	39	Vermelha
11/1/2011	A133	Dourado Dir.; Vermelho Esq.	40	Vermelha
15/1/2011	A88b	Vermelho Pronoto; Dourado Escutelo	41	Vermelha
15/1/2011	A137	Dourado Pronoto; Branco Escutelo	42	Vermelha
15/1/2011	A139	Vermelho Todo o Tórax	43	Vermelha
15/1/2011	A141	Branco todo o Tórax REPETIDA	44	Vermelha
21/1/2011	A142	Branco dir.; Vermelho Esq. REPETIDA	45	Vermelha
21/1/2011	A151	Verde Pronoto; Vermelho Escutelo REPETIDA	46	Vermelha
25/1/2011	A153	Vermelho Pronoto; Verde Escutelo REPETIDA	47	Vermelha
26/1/2011	A156	Branco Pronoto; Vermelho Escutelo REPETIDA	1	Amarela
26/1/2011	A158	Dourado Dir.; Branco Esq. REPETIDA	2	Amarela

Essa técnica de marcação foi testada anteriormente e verificou-se que, após o resfriamento, em poucos minutos após a soltura, as abelhas reassumiam as atividades de nidificação e forrageio normalmente (PEIXOTO, 2010). O mesmo fato foi observado neste trabalho (ver item 3.3).

Entre as abelhas marcadas nidificantes na área (n=50) foi observada a construção de 1,34 ninhos por fêmea (Tabela I.3). A maioria das fêmeas marcadas construiu apenas um ninho e apenas uma fêmea observada construiu três ninhos.

Tabela I.3. Número de fêmeas marcadas e seus respectivos ninhos.

N° FÊMEAS	N° DE NINHOS	TOTAL DE NINHOS
34	1	34
15	2	30
1	3	3
Média Ninhos/fêmea		1,34

3.3 Comportamento de nidificação

Foi observado que algumas fêmeas de *C. flavifrons* despendiam tempo considerável, às vezes quase o dia todo, sobrevoando a área do jardim. Os voos foram próximos ao solo

e, muitas vezes, as abelhas chegavam a pousar e andar sobre a grama. Durante os voos, também se aproximavam, e algumas vezes entravam, dos ninhos de outras abelhas. Esse comportamento característico de sobrevoar a área foi apresentado por fêmeas que estavam à procura de um novo local para nidificação, pois, geralmente, a fundação de novos ninhos por essas abelhas acontecia logo após a observação desse comportamento.

Ao sair e antes de entrar no ninho, geralmente, as fêmeas realizavam voos circulares, o que pode indicar um comportamento de “reconhecimento” da área. Porém, outras fêmeas não apresentavam esse comportamento, entrando (ou saindo) diretamente do seu ninho em voos retos.

Algumas fêmeas ficavam sobrevoando a área do jardim tentando entrar em diversos ninhos, porém, a fêmea no interior do ninho geralmente a expulsava. Quando a abelha invasora persistia, ocorria um comportamento aparentemente agonístico, no qual as duas fêmeas sobrevoavam o ninho e se tocavam no ar.

Foi observado que novos ninhos fundados pela mesma abelha eram frequentemente construídos próximos aos ninhos já concluídos por essa fêmea, distando poucos centímetros um do outro. As fêmeas de um “grupo”, em geral, não fundaram novos ninhos perto do agregado de ninhos de outro “grupo”. Os novos ninhos fundados pelas fêmeas de ambos os grupos foram construídos próximos aos seus antigos ninhos, nas imediações do seu respectivo grupo.

Foi observado em campo que o mesmo ninho pode ser reutilizado por uma segunda fêmea sem necessariamente ter sido usurpado. Isso aconteceu no N88, no qual uma segunda abelha o ocupou, após a morte da sua abelha fundadora. A entrada do N88 ainda estava aberta. Esse fato sugere a ocorrência da reutilização do mesmo ninho por duas fêmeas, uma após a outra, ou seja, a presença de células construídas por abelhas distintas em um mesmo ninho. Outro fato que ocorreu foi a expulsão da abelha fundadora (A6a) de um ninho por outra fêmea (A6b). A abelha fundadora, ao voltar de um voo de coleta de pólen, encontrou outra fêmea no interior do seu ninho. Ambas saíram do ninho, sobrevoando-o e tocando-se no ar, em voos agonísticos. No entanto, a fundadora foi expulsa e a segunda fêmea permaneceu no ninho, a provisionando-o. Em até dois dias subsequentes, a fêmea fundadora foi vista sobrevoando a área e algumas vezes tentando entrar no seu antigo ninho, até que, por fim, desistiu.

As fêmeas escavaram seus ninhos, geralmente, no início da manhã e no término da tarde. Em ninhos iniciados pela manhã, após a escavação, as fêmeas já começaram o provisionamento dos seus ninhos. Quando a escavação acontecia já no final da tarde, o provisionamento do ninho iniciava-se na manhã do dia seguinte. Durante o processo de

escavação, as abelhas realizavam voos rápidos, porém permaneciam mais tempo no interior do ninho do que fora dele. O mesmo foi observado no final das atividades de nidificação do ninho, quando ele estava sendo fechado. O contrário ocorreu durante a fase de provisionamento dos ninhos: a fêmea permaneceu mais tempo fora do ninho do que no seu interior (Figuras I.31, I.32 e I.33).

Os dados disponíveis dos ninhos monitorados continuamente permitiram o conhecimento do número de voos realizados pelas fêmeas de *C. flavifrons* em 10 ninhos (sete deles do primeiro período e três deles do segundo período). Para os 10 ninhos citados, foi observada uma média de 7,03 voos diários por abelha (dp = 1,65; amplitude 4 a 11; n=434) (Figuras I.31, I.32 e I.33).

As fêmeas iniciaram as atividades de voo, em média, às 04:36h (dp= 4min; amplitude 4:25h a 4:52h; n=65). O maior número de voos para coleta de recursos florais ocorreu no período da manhã, compreendendo 82,7% dos 434 voos observados. No período da tarde (depois das 12 horas), o número de voos foram reduzidos (um ou dois voos). Os primeiros voos do dia apresentaram menor duração e, ao longo do dia, os voos eram cada vez mais demorados.

Entre os 434 voos, em 272 voos foi observado o tipo de recurso coletado (pólen ou óleo). Desses, aproximadamente 75% foram para a coleta de pólen e 25% para a coleta de óleo. Os voos para coleta de pólen foram significativamente ($Z=11,7762$; $p< 0,0001$) mais demorados (média = 1h e 18 min.; dp. 38 min.; amplitude 8 min. a 3 h e 57 min.; n=204) que os de coleta de óleo (média = 32 min.; dp. 22 min.; amplitude 4 min. a 2 h e 20 min.; n=68). Por outro lado, o tempo que uma fêmea despendeu dentro do ninho para descarregar o pólen (média = 18 min.; dp. 27 min.; amplitude 2 min. a 3 h e 9 min.; n=68) foi significativamente menor ($Z=2,3139$; $p<0,0207$) que o tempo despendido dentro do ninho após o forrageio de óleo (média = 27 min.; dp. 28 min.; amplitude 2 min. a 3 h e 7 min; n=68).

O ninho N52 exemplifica uma nidificação com a mínima duração de atividade observada. Nesse caso, a fêmea despendeu um dia para escavação e outro dia para provisionamento, conclusão de uma única célula e fechamento (Figura I.31). Todavia, a duração média dos ninhos foi de 6,9 dias (item 3.1). Como exemplo de ninhos com tempo de atividade maior, estão os ninhos N50 e N34 que permaneceram ativos durante 13 e 12 dias, respectivamente (Figuras I.32 e I.33).

Foram construídas sete células no N50 e 9 células no N34. Pode-se notar que cada fêmea realizava cerca de dois a três voos de coleta de óleo, seguidos por quatro a seis voos de coleta de pólen e um a três voos de coleta de óleo para concluir uma célula. A fêmea do N52 despendeu dois dias para concluir seu ninho, um dia para escavação e outro dia para

elaborar uma única célula e fechar o ninho. Entretanto, foi observado que, em média, as fêmeas concluíam uma célula em cerca de um a um dia e meio (média = 1,65; dp=0,30; n=13; Tabela I.4). Para certificar a conclusão de cada célula, um aspecto importante foi a observação das fêmeas jogando areia para dentro do túnel principal e em seguida escavando um túnel lateral durante a nidificação. Esse comportamento ocorria no final do dia ou no início do dia seguinte após os voos de coleta de pólen e óleo, demonstrando que a fêmea havia concluído uma célula e estava iniciando a construção de outro túnel/célula (Figuras I.32 e I.33).

É importante salientar que a abelha do ninho N50, do primeiro período de estudo, foi marcada e teve o flagelo da antena retirada, enquanto a abelha do N34 não foi marcada (“controle”). A semelhança observada no comportamento das fêmeas das duas temporadas sugerem que a retirada do flagelo da antena e a metodologia de marcação, aparentemente, não interferiram no padrão de comportamento de nidificação dessas fêmeas. Entretanto, observa-se uma tendência de redução no tempo de construção das células nas fêmeas sem retirada do flagelo antenal (sem flagelo: média = 1,79; dp=0,16; n=8; com flagelo: média = 1,42; dp=0,32; n=5), embora essa diferença não seja estatisticamente significativa (Quiquadrado = 0,0428439; df = 1; p = 0,836020) (Figuras I.32 e I.33; Tabela I.5).

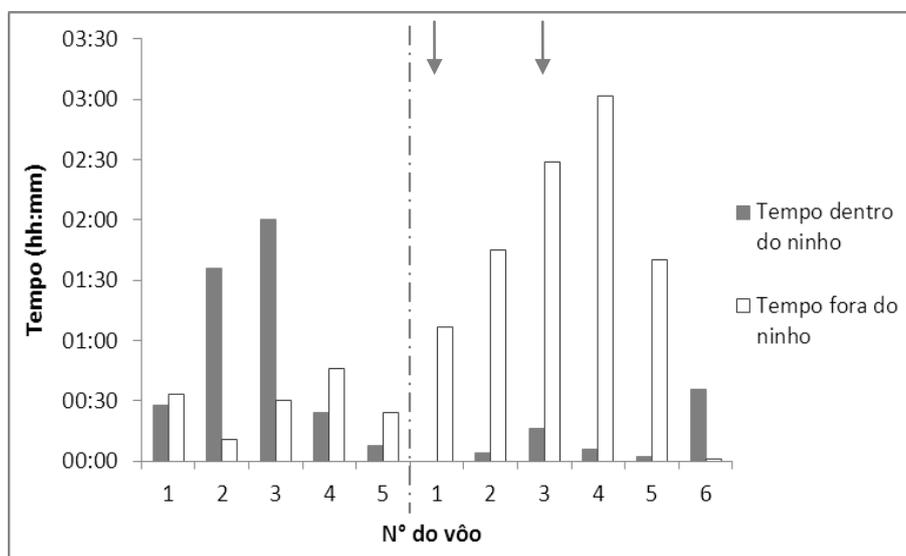


Figura I.31. Tempo despendido dentro e fora do ninho pela fêmea do N52 - primeira temporada; abelha marcada (A7) - ao longo do período de atividade deste ninho. No primeiro dia, o ninho encontrava-se em fase de escavação (observar que o maior tempo é despendido dentro do ninho). No segundo dia, o ninho estava em fase de aprovisionamento (mais tempo foi despendido fora do ninho), podendo ser observada a ovoposição e conclusão da célula no final do dia (quando a fêmea passou, novamente, um maior período dentro do ninho). Setas cinzas indicam voos para coleta de pólen.

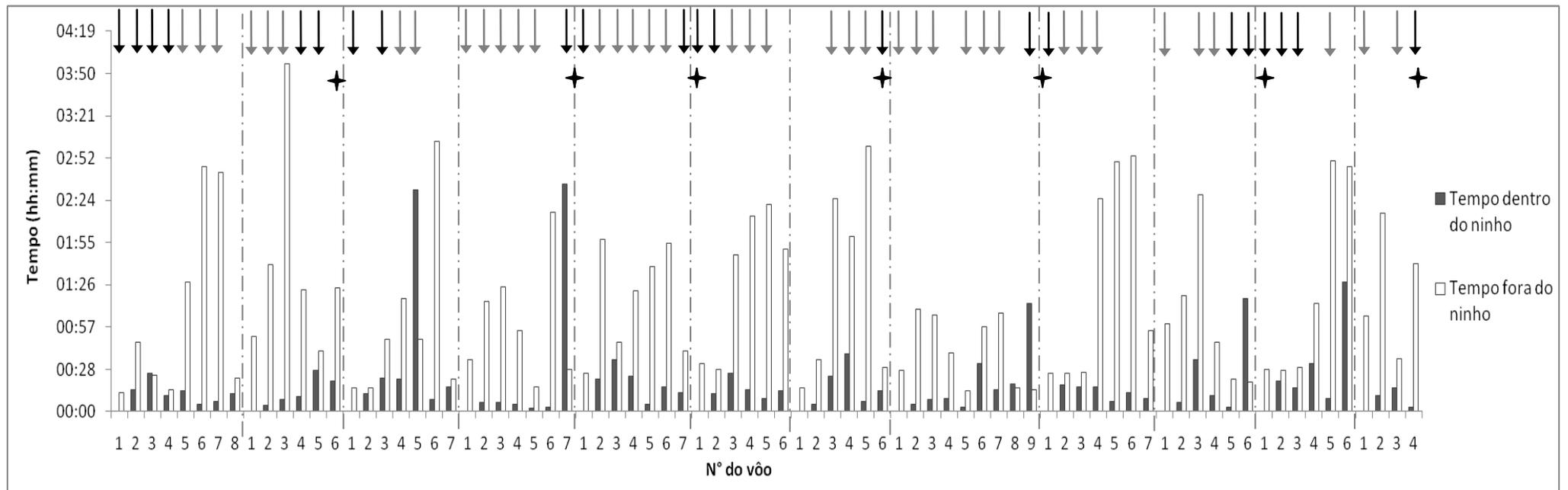


Figura I.32. Tempo despendido dentro e fora do ninho pela fêmea do N50 - primeira temporada; abelha marcada (A42) - ao longo do período de atividade deste ninho. O primeiro dia de atividade do ninho, que compreende ao período de escavação, não está apresentado no gráfico. As linhas verticais tracejadas delimitam as atividades por dia. Setas pretas indicam voos para coleta de óleo, e setas cinzas indicam voos para coleta de pólen. Estrelas pretas indicam o momento em que uma célula foi concluída.

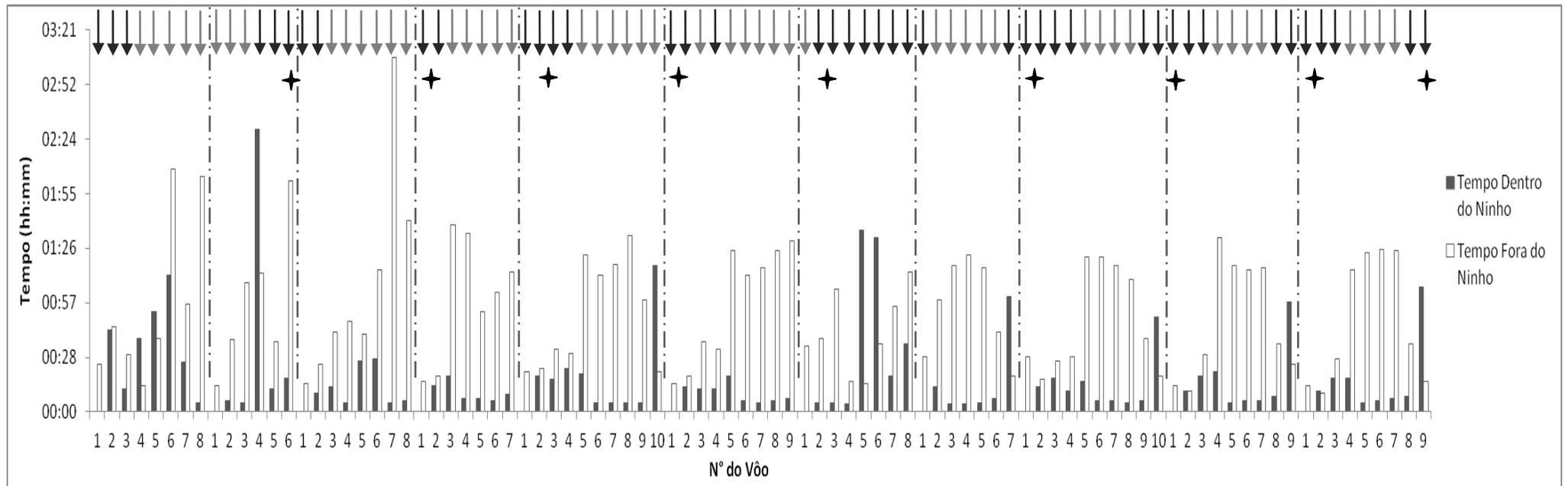


Figura I.33. Tempo despendido dentro e fora do ninho pela fêmea do N34 - segunda temporada; abelha não marcada - ao longo do período de atividade deste ninho. O primeiro dia de atividade do ninho, que compreende ao período de escavação, não está apresentado no gráfico. As linhas verticais tracejadas delimitam as atividades por dia. Setas pretas indicam voos para coleta de óleo, e setas cinzas indicam voos para coleta de pólen. Estrelas pretas indicam o momento em que uma célula foi concluída.

Tabela I.4. Relação entre o número de células e tempo de atividade dos ninhos monitorados intensivamente. Para estes ninhos, foi observado que uma fêmea despende, em média, 1,65 dias para a construção de uma única célula (incluindo o tempo despendido na escavação do ninho).

ANO	NINHO	Nº DE CÉLULAS	Nº DE DIAS ATIVO	Nº DE DIAS/CÉLULA
2010	N40	3	5	1,67
	N49	2	4	2,00
	N50	7	13	1,86
	N52	1	2	2,00
	N55	6	9	1,50
	N63	4	7	1,75
	N64	4	7	1,75
2011	N71	6	11	1,83
	N34	9	12	1,33
	N42	6	8	1,33
	N45	1	2	2,00
	N50	8	10	1,25
	N51	5	6	1,20
	Total		62	96
Média		4,77	7,38	1,65
Dp		2,55	3,57	0,30
Amplitude		1 - 9	2 - 13	1,20 – 2,0

Tabela I.5. Duração da atividade dos ninhos, em dias, construídos por uma mesma fêmea. Notar que em 60% dos segundos ninhos construídos a duração diminuiu (cinza claro); em 33,3% a duração foi semelhante (cinza escuro) e em apenas 6,0% (1 ninho) a duração aumentou.

1º NINHO	2º NINHO	3º NINHO
16	2	2
16	3	
15	3	
14	6	
12	4	
11	4	
10	3	
8	7	
7	6	
7	3	
6	7	
5	13	
5	2	
4	3	
2	2	

No período da noite, as abelhas permaneceram em seus respectivos ninhos com a região anterior do corpo voltada para fora, geralmente próximo da entrada, protegendo o ninho. Por exemplo, a A42 ficava sempre posicionada exatamente na entrada do seu ninho, sendo possível visualizar o tórax e sua marcação. Já a A50 posicionava-se sempre a uns 2 cm da entrada. Frequentemente, as fêmeas emitiam sons com a aproximação do observador. Com relação à produção de sons, aparentemente os mesmos eram produzidos pela contração dos músculos do voo e asas durante as atividades de escavação, fechamento do ninho e também por volta das 04:30h da manhã, pouco antes do primeiro voo.

Ao chegar próximo do término das atividades de um ninho, as abelhas diminuía suas atividades. No dia em que a fêmea terminava suas atividades, caso isto acontecesse durante a manhã, em geral, ela dava início aos voos característicos de busca de um novo local para construir o próximo ninho. Quando uma fêmea concluía o seu ninho no período da tarde ou no começo da noite, ela permanecia o restante do dia no ninho e pernoitava nele, fechando-o no início da manhã do dia seguinte e posteriormente saindo à procura de um novo local para nidificar.

Frequentemente foi possível a visualização de cavidades ao redor da entrada dos ninhos que acabaram de ser concluídos, resultante da retirada de areia utilizada pela abelha para fechá-lo. Entretanto, nem todos os ninhos eram fechados pelas fêmeas.

O horário da última entrada no ninho foi bastante variado. Em geral, a última entrada aconteceu no meio da tarde, entre 14:30h e 15:30h. Porém, foi observado que a última entrada de algumas fêmeas ocorreu ainda no final da manhã/comoço de tarde, entre 11:14h e 14:30h. Após esta última entrada, as abelhas permaneceram no interior do ninho até o dia seguinte. Às vezes, principalmente no início da escavação do ninho, as fêmeas realizavam atividades de escavação no início da noite (até próximo das 20:00h), mas depois apresentavam o comportamento de ficar na entrada do ninho, como salientado anteriormente.

Dois espécimes de *Mesoplia* sp. foram coletados no momento em que saíam do ninho das *C. flavifrons*. Como os referidos ninhos estavam sendo monitorados continuamente, foi possível visualizar o momento exato da entrada da abelha parasita no ninho, após sobrevoar próximo à entrada, em voo rápido. Em ambos os casos, isto aconteceu enquanto a abelha fundadora do ninho estava forrageando e, aproximadamente dois minutos depois, as parasitas saíram dos ninhos. Para a captura dessas abelhas, recipientes de vidro foram postos na entrada dos ninhos. Os espécimes foram armazenados em álcool absoluto.

4 DISCUSSÃO

Os únicos estudos sobre a biologia da nidificação de *C. flavifrons* são os de Neff & Simpson (1981), Vinson *et al.* (1996; 1997) e Vinson & Frankie (1988) em áreas de savana, na América Central e o de Rêgo *et al.* (2006) no estado do Maranhão, Brasil. Esses autores observaram apenas uma célula nos ninhos, o que corresponderia, segundo Coville *et al.* (1983), a uma condição primitiva das abelhas da tribo Centridini. Embora Vinson & Frankie (1988) descrevam a existência de túneis laterais preenchidos com areia e tenham encontrado um único ninho com duas células, os autores desconsideraram esta célula, provavelmente por estar incompleta, e citam a existência de apenas uma célula na discussão e em estudos posteriores. No presente estudo, foi verificada uma média próxima de 5 células por ninho, variando de uma até o máximo de nove células de acordo com a duração do ninho. Além disso, devido à ocorrência de ninhos com 19 dias de duração e a média de 1,65 dias para a conclusão de uma célula, é possível estimar a construção de até 11 células por ninho.

O maior tempo de duração dos ninhos observados neste estudo, naturalmente está relacionado ao maior número de células construídas, comparado com outros estudos dessa espécie.

É importante notar a grande variação no tempo de duração de ninhos, tanto construídos por uma mesma fêmea quanto por fêmeas diferentes. De modo geral, os ninhos de Centridini estudados apresentam padrões de construção mais homogêneos (*C. flavifrons*, 1 célula, 3 a 5 dias de construção, VINSON & FRANKIE, 1988, RÊGO *et al.* 2006; *C. aethiocesta*, 1 célula, 1 dia de construção, VINSON & FRANKIE, 1988; *C. flavofasciata*, 1 célula, 1,5 dias de construção, VINSON *et al.* 1986; *C. aenea*, 2 a 4 células, 2 a 3 dias de construção, AGUIAR & GAGLIANONE, 2003). O período de quatro a cinco dias observado por Rêgo *et al.* (2006) para a finalização de um ninho é próximo do tempo médio de atividade observado neste estudo (6,9 dias).

A grande variação encontrada em *C. flavifrons* neste estudo sugere maior plasticidade na estratégia reprodutiva da espécie. Uma fêmea observada construiu um ninho com 16 dias de duração e, em seguida, dois ninhos de dois dias de duração cada. Essa fêmea foi monitorada intensivamente e não observamos qualquer perturbação que causasse a conclusão dos ninhos. Inclusive, os três ninhos foram completamente fechados com areia seguindo o padrão típico de fechamento da espécie. Uma possibilidade, é que as fêmeas respondam a variações na disponibilidade de recursos no ambiente. Por outro lado, a construção de ninhos mais duradouros deve otimizar a

elaboração de várias células em um mesmo ninho com um único túnel principal e outros laterais.

Foi observada atividade de nidificação de *C. flavifrons* de setembro a fevereiro, embora em três anos consecutivos tenha sido observada uma fêmea nidificando no mês de maio, início do período chuvoso. O período de atividade de nidificação corresponde ao período de estiagem na região, como também foi observado por outros autores (VINSON & FRANKIE, 1988; RÉGO *et al.*, 2006).

O'Toole & Raw (1991) enfatizam que nos trópicos a maior parte das espécies de abelhas solitárias emergem no final da alta estação de pluviosidade, coincidindo com o período de maior floração e, por conseqüência, de recursos florais (néctar, óleo e pólen). De modo geral, na região litorânea do estado da Paraíba, as diversas espécies de abelhas solitárias apresentam maior atividade e abundância nesse período (AGUIAR & MARTINS 2002, 2003; MARTINS & SOUZA, 2005; FARIAS *et al.*, 2008).

A duração do período de nidificação (cerca de seis meses), combinada com o período de desenvolvimento de ninhada (cerca de 60 dias) da espécie sugere a existência de duas a três gerações por ano. O desenvolvimento dos imaturos é relativamente rápido, foram encontrados indivíduos na fase de pré-pupa em cerca de 11 dias após o encerramento do ninho. A cessação quase completa da atividade de fêmeas entre março e agosto e a retomada das atividades de nidificação em setembro, em anos consecutivos, nos permite supor que a última geração produzida (fevereiro) na época reprodutiva tem tempo de desenvolvimento muito mais tempo (ou diapausa) do que as gerações produzidos no início do período de acasalamento. O registro, em três anos consecutivos, de que há uma nidificação tardia (maio) por fêmeas isolados (uma fêmea em cada ano) na área do assentamento é uma indicação de que pelo menos parte da descendência de ninhos provisionados em fevereiro surge no início do outono (início da estação chuvosa), mas a maioria deles provavelmente permanecerá como prepupa nas células de cria até a primavera seguinte.

Considerando que uma fêmea demora em média 6,9 dias para a construção de um ninho e que o período de nidificação anual tem cerca de 180 dias, uma única fêmea poderia teoricamente, em condições ótimas e alta longevidade, construir 26 ninhos e 109 células. Entretanto, os dados revelam que cada fêmea constrói 1,34 ninhos em média, sugerindo 10 dias de nidificação e a construção de 6 células, em média, por fêmea, durante seu período de vida. Esses dados podem estar subestimados, pois foram observadas algumas fêmeas com pelo menos 20 dias de atividade. Além disso, apenas 32% das fêmeas marcadas foram observadas construindo outros ninhos e foram encontradas poucas fêmeas mortas. É importante o fato de que freqüentemente as fêmeas procurando locais para nidificar sobrevoavam os muros e inspecionavam as

áreas vizinhas. Inclusive foram encontrados alguns ninhos em terrenos a cerca de 100 metros de distância. Essas observações sugerem que a área de nidificação pode ser mais ampla e o comportamento de filopatria (ver cap. II) está associado à áreas maiores. Da mesma forma, fêmeas não marcadas nidificantes poderiam ser indivíduos vindos de outras áreas ou fêmeas recém-emergidas no próprio local. Desse modo, são necessários estudos futuros para a obtenção de dados sobre as taxas de mortalidade e a longevidade das fêmeas.

De forma geral, as dimensões e forma das células, assim como a profundidade dos ninhos, um montículo de areia na entrada e um túnel principal, com ramificações foram semelhantes às observadas por outros autores (VINSON & FRANKIE, 1988; RÊGO *et al.*, 2006).

Segundo Vinson & Frankie (1988) os túneis longos e ramificados, fechados com areia seriam estratégias de defesa contra o ataque de cleptoparasitas, principalmente espécies de *Mesoplia*, (Hymenoptera, Apidae, Ericrocidini) (Vinson *et al.*, 1986), frequentemente vistas entrando em ninhos de *C. flavifrons* e *C. aethioscesta*. Todavia, como observado neste estudo, as ramificações servem para a construção de novas células. Embora, espécies de *Mesoplia* sejam comumente registradas parasitando ninhos de *Centris* (MORATO *et al.*, 1999; AGUIAR & GAGLIANONE, 2003; RÊGO *et al.*, 2006), no presente estudo raramente foram observados indivíduos desta espécie.

Os ninhos formam uma agregação e, além disso, estavam mais concentrados em locais mais apropriados do jardim, ou seja, geralmente em áreas com solo desnudo ao redor de muros e árvores. A construção de ninhos de forma agregada é comum em muitos grupos de abelhas que nidificam no solo (MICHENER, 2007). As agregações de ninhos de abelhas são resultantes da tendência que essas abelhas têm de retornarem aos seus locais de emergência também denominado filopatria, uma vez que outras áreas aparentemente apresentando as mesmas condições não possuem ninhos (MICHENER, *et al.*, 1958; MICHENER, 1974).

As entradas dos ninhos, de forma circular bem definida, eram expostas na maioria dos casos, porém, alguns ninhos possuíam entradas camufladas pela grama, por outras plantas, por pedras ou por objetos do chão do jardim. Rêgo *et al.* (2006), também descrevem as entradas dos ninhos como circulares, porém, na maioria das vezes, camufladas e protegidas de chuvas entre rizomas secos de gramíneas. Por outro lado, Vinson e Frankie (1988) observaram que as entradas geralmente eram localizadas nas paredes laterais de depressões no solo feitas por lagartos ou tatus. Desse modo, as fêmeas de *C. flavifrons* nidificam em áreas abertas, em solo arenoso e sob forte influência da luz solar.

Além de fatores como a constituição do solo e a exposição solar (MICHENER *et al.*, 1958), o acesso a diferentes fontes de recursos florais e de água (LINSLEY, 1958) é, dentre outros fatores, fundamental para o estabelecimento dos ninhos. O sítio de estudo desse trabalho, apesar de se encontrar em área urbanizada, possui espécies de plantas frutíferas e proximidade com fragmentos de Mata Atlântica (cerca de 1,2 km de distância) que contribuem com a disponibilidade de recursos florais.

Espécies de Centridini, nidificantes no solo, geralmente alimentam suas larvas com uma mistura de óleos florais e pólen (BUCHMANN, 1987; FRANKIE *et al.* 1989, VINSON *et al.*, 1997). A adição de óleo certamente é uma adaptação para aumentar a impermeabilidade das células e provisões, evitando a contaminação por microorganismos (VINSON *et al.*, 1997; AGUIAR & GAGLIANONE, 2003). Voos para coleta de óleo foram mais curtos que aqueles para coleta de pólen, sugerindo a menor disponibilidade e/ou dificuldade de coletar pólen. Além disso, o curto período de tempo para forrageio de óleo, frequentemente observado, sugere que a fonte de recurso estava próxima do local de estudo.

Fatores como o tamanho corporal (HERRERA, 1990) e a temperatura corporal (WILLMER, 1983) também influenciam no padrão temporal das atividades das abelhas. Outros fatores relacionados com as estratégias de forrageamento e de disponibilidade de recursos florais também podem estar envolvidos. Alcock (1979) aponta alguns fatores que possivelmente podem influenciar no comportamento de provisionamento das fêmeas: distribuição de ninhos de outras fêmeas, tamanho e idade da fêmea, abundância de recursos e a probabilidade de fracasso daquele ninho.

A média do número de voos observados no presente estudo está de acordo com os dados relatados por Rêgo *et al.* 2006, embora estes autores tenham monitorado apenas dois ninhos. O maior número de voos durante a fase de provisionamento foi durante o período da manhã, concordando com as observações de outros autores (RÊGO *et al.*, 2006; AGUIAR, 2002; GOTTSBERGER *et al.* 1988; ALBUQUERQUE & RÊGO, 1989; ALBUQUERQUE & MENDONÇA, 1996; FREITAS *et al.* 1999) para outras espécies de *Centris*, as quais indicaram que as visitas às flores por estas abelhas ocorrem, em geral, antes do meio dia em habitats tropicais quentes e ensolarados do Nordeste do Brasil. Além do maior número de saídas ocorrerem pela manhã, a duração dos voos é menor nesse período, o que seria justificado pelo fato de haver maior disponibilidade de recursos durante o período matutino.

A Marcação das abelhas pareceu não afetar suas atividades, pois em poucos minutos após a soltura estas continuavam a trabalhar normalmente, provisionando o ninho. Além disso, a semelhança observada no comportamento das fêmeas das duas temporadas sugerem que a retirada do flagelo da antena e a metodologia de marcação,

aparentemente, não interferiram no padrão de comportamento de nidificação dessas fêmeas. Entretanto, observa-se uma tendência de redução no tempo de construção das células nas fêmeas sem retirada do flagelo antenal, sugerindo a necessidade de estudos mais aprofundados.

As fêmeas geralmente realizavam voos circulares ao sair e antes de entrar no ninho, o que pode indicar um comportamento de reconhecimento da área. Vinson & Frankie (1999) relatam que, durante a construção do túnel, as fêmeas de *C. flavofasciata* também realizam voos circulares característicos e, após o reconhecimento da área, realizam voos em linha reta.

Freqüentemente, uma fêmea nidificante levantava voo e tocava outras fêmeas próximas no ar, aparentemente tentando afastá-la. Duas fêmeas em voo também podiam apresentar esse comportamento. Esse comportamento, aparentemente agonístico, também foi observado entre fêmeas que pareciam procurar um local para fundar novos ninhos, o que sugere a existência de um comportamento competitivo por locais de nidificação. O comportamento competitivo entre abelhas que pareciam procurar um novo local para nidificar também pode ser embasado no fato de as fêmeas aparentemente preferirem fundar um novo ninho nas proximidades de seu antigo ninho. Dessa forma, o comportamento observado entre essas abelhas indica uma defesa de território.

Vinson & Frankie (1988) afirmam que após cessar o provisionamento de pólen e óleo, os ninhos de *C. flavifrons* são fechados com areia pelas fêmeas, que os abandonam logo em seguida. Esses autores também observaram esse comportamento em fêmeas de *C. flavofasciata* e *C. aethiocesta*. No entanto, alguns dos ninhos observados neste estudo não foram fechados, e outros foram fechados apenas parcialmente.

Foi verificado que alguns ninhos concluídos que possuíam o início do túnel aberto serviram de dormitório para fêmeas de *C. flavifrons*. Chiappa e Toro (1994) observaram que ramificações laterais ou células abertas em ninhos de *C. mixta* também serviam de dormitório para os adultos ou ainda para evadir parasitas.

A permanência da entrada aberta de alguns ninhos de *C. flavifrons* após a sua conclusão pode ter sido um fator importante na reutilização de ninhos observada nesse estudo. As fêmeas nidificantes à procura de novo local para fundação do ninho, que muitas vezes inicialmente apresentam o comportamento de entrar e sair em outros ninhos, podem utilizar a entrada de um antigo ninho para construir o seu.

Esse comportamento de entrar e sair no ninho de outras fêmeas pode, também, favorecer a usurpação de um ninho por uma fêmea, conforme foi observado no estudo presente estudo. Vinson & Frankie (1988) também descrevem um caso muito similar de usurpação de ninho em *C. flavifrons*, no qual a fêmea fundadora foi expulsa do seu ninho por outra fêmea que se apropriou dele, enquanto sua fundadora estava em um voo para

aprovisionamento. Em ambos os estudos, as fêmeas fundadoras observadas traziam recursos florais em suas escopas, quando tiveram que abandonar seus ninhos, retornando à área pouco tempo depois com as escopas limpas. De forma também similar, a fêmea fundadora retornou à área sobrevoando o antigo ninho por mais dois dias, não obtendo sucesso na retomada do seu antigo ninho, até não voltar mais.

Rêgo *et al.* (2006) observaram atividade de construção em três ninhos de *C. flavifrons* durante todo o dia, relatando também atividade noturna, até as 21:00h. Neste estudo, as fêmeas escavaram seus ninhos principalmente no início da manhã ou no término da tarde e início da noite (em torno das 17:30h). Em ninhos iniciados já no final da tarde, o provisionamento do ninho foi iniciado na manhã do dia seguinte.

Neste estudo, surpreendentemente, não foi observada a presença de machos de *C. flavifrons* na área. Vinson *et al.* (1996) relataram que os machos de *C. flavifrons* marcam e defendem territórios em árvores, floridas ou não, como *Byrsonima crassifolia*. C. F. Martins (comunicação pessoal), observou em área urbana de João Pessoa machos no telhado a cerca de 3 metros de altura acima de uma agregação de ninhos, interceptando as fêmeas durante o voo,

Um aspecto interessante foi a dificuldade de encontrar células durante a escavação dos ninhos, devido ao fato das fêmeas fecharem os túneis laterais após a conclusão de cada célula. Por isso foram utilizados os vasos-armadilha que propiciaram o conhecimento do total de células e a observação do comportamento e características da estrutura dos ninhos. Essa técnica revelou-se potencialmente promissora para futuros estudos, assim como para o manejo de ninhos e células em programas de polinização.

I REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, C. M. L. **Ecologia e comportamento de nidificação de abelhas solitárias (Hymenoptera, Apoidea) em áreas de caatinga e floresta estacional semi-decídua (Bahia, Brasil), com ênfase em espécies do gênero *Centris* Fabricius, 1804 (Apidae, Centridini)**. Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- AGUIAR, A. J. C. & MARTINS, C. F. 2002. Abelhas e vespas solitárias em ninhos-armadilha na Reserva Biológica Guaribas (Mamanguape, Paraíba, Brasil). **Revta. bras. Zool.**, **19** (Supl.):101-116.
- AGUIAR, C. M. L. & GAGLIANONE, M. C. 2003. Nesting biology of *Centris* (*Centris*) *aenea* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Centridini). **Rev. Bras. Zool.**, **20** (4): 601-606.
- AGUIAR, C. M. L. & GARÓFALO, C. A. 2004. Nesting biology of *Centris* (*Hemisiella*) *tarsata* Smith (Hymenoptera, Apidae, Centridini). **Rev. Bras. Zool.**, **21**: 477-486.
- AGUIAR, A. J. C. & MARTINS, C. F. 2003. **The bee diversity of the Tabuleiro vegetation in the Guaribas Biological Reserve (Mamanguape, Paraíba, Brazil)**. p. 209-216. In: Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure. G. A. R. Melo & Alves-dos-Santos, I. (Eds.). Criciúma, Editora UNESC. ISBN 8588390183
- AGUIAR, C. M. L.; GARÓFALO, C. A. & ALMEIDA, G. F. 2006. Biologia de nidificação de *Centris* (*Hemisiella*) *trigonoides* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Centridini). **Rev. Bras. Zool.**, **23** (2): 323-330.
- ALBUQUERQUE, P. M. C. & MENDONÇA, J. A. C. 1996. Anthophoridae (Hymenoptera: Apoidea) e flora associada em uma formação de cerrado no município de Barreirinhas, MA, Brasil. **Acta Amazonica** **26**: 45 - 54.
- ALBUQUERQUE, P. M. C. & RÊGO, M. M. C. 1989. Fenologia das abelhas visitantes de murici (*Byrsonima crassifolia*, Malpighiaceae). **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, sér. Zool.**, **5** (2): 163-178.

- ALCOCK, J. 1979. The relation between females body size and provisioning behavior in the bee *Centris pallid* Fox (Hymenoptera: Anthophoridae). **Journal of the Kansas Entomological Society** **52** (3) 623 - 632.
- ANTONINI, Y. & MARTINS, R.P. 2003. The Value of a Trees Species (*Caryocar brasiliense*) for a Stingless Bee *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*. **J. Insect Conserv.**, **7**:167-174.
- AYALA, R. B. 1998. **Sistematica de los taxos supraespecificos de las abejas de la tribu Centridini (Hymenoptera: Anthophoridae)**. Tesis, Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 280p.
- BANASZAK, J. 1992. Bees of urban environments in Poland. 101-111 p. In: Banaszak, J. (Edt.). **Natural resources of wild bees in Poland**. Pedagogical University, Bydgoszcz. 174 p.
- BATRA, S. W. 1984. Solitary bees, **Sci. Amer.**, **250** (2): 86-93.
- BIESMEIJER, J. C.; ROBERTS, S. P. M.; REEMER, M.; OHLEMÜLLER, R.; EDWARDS, M.; PEETERS, T.; SCHAFFERS, A. P.; POTTS, S. G.; KLEUKERS, R.; THOMAS, C. D.; SETTELE, J. & KUNIN, W. E. 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science**, **313** (5785): 351 -354.
- BUCHMANN., L. 1987. THE ECOLOGY OF OIL FLOWERS AND THEIR BEES. **ANNU. REV. ECOL. SYST.** **18**: 343 - 369.
- BUCHMANN, S. L. & G. P. NABHAN. 1996. **The Forgotten Pollinators**. Island Press, Washington D. C. 292p.
- CAMILLO, E.; GARÓFALO, C. A. & SERRANO, J. C. 1993. Hábitos de nidificação de *Melitoma segmentaria*, *Centris collaris*, *Centris fuscata* e *Paratetrapedia gigantea* (Hymenoptera, Anthophoridae). **Rev. Bras. Entomol.**, **37**: 145-156.
- CHIAPPA, E. & TORO, H. 1994. Comportamiento reproductivo de *Centris mixta tamarugalis* (Hymenoptera: Anthophoridae). II Parte: Nidificacion y estados inmaduros. **Rev. Chilena Entomol.** **21**: 99 - 115.
- COVILLE, R. E.; FRANKIE, G. W. & VINSON, S. B. 1983. Nests of *Centris segregata*. (Hymenoptera: Anthophoridae) with a review of the nesting habitats of the genus. **J. Kansas Entomol. Soc.**, **56**: 109-122.

- DENYS, C. & SCHMIDT, H. 1998. Insect communities on experimental mugwort (*Artemisia vulgaris* L.) plots along an urban gradient. **Oecologia**, **113**: 269-277.
- FARIAS, R. C. A. P.; MADEIRA-DA-SILVA, M. C.; PEREIRA-PEIXOTO, M. H. & MARTINS, C. F. 2008. Composição e sazonalidade de espécies de Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em Mata e Duna na área de proteção ambiental da Barra do Rio Mamanguape, Rio Tinto, PB. **Neotropical Entomology** **37** (3): 253 - 258.
- FRANKIE, G. W.; OPLER, P. A. & BAWA, K. S. 1976. Foraging behaviour of solitary bees: implications for outcrossing of a neotropical forest tree species. **J. Ecol.**, **64**: 1049-1057.
- FRANKIE, G. W.; HABER, W. W.; OPLER, P. A. & BAWA, K. S. 1983. Characteristics and organization of the large bee pollination system in the Costa Rican dry forest, p. 441-448. In C. E. Jones & R. J. Little (eds.), **Handbook of experimental pollination biology**. New York, Scientific and Academic Editions, 558p.
- FRANKIE, G. W.; VINSON, S. B. & WILLIAMS, H. 1989. **Ecology and evolutionary sorting of 12 sympatric species of *Centris* bees in Costa Rican dry forest**. In J. H. Bock and Y. B. Linhart (Eds.). *The evolutionary ecology of plants*. Westview Press, Boulder, Colorado.
- FRANKIE, G. W.; NEWSTROM, L; VINSON, S. B. & BARTHELL, J. F. 1993. Nesting-habitat preferences of selected *Centris* bee species in Costa Rican dry forest. **Biotropica**, **25** (3): 322-333.
- FREITAS, B. M. 1997. Number and distribution of cashew (*Anacardium occidentale*) pollen grains on the bodies of its pollinators, *Apis mellifera* and *Centris tarsata*. **J. Apicult. Res.**, **36**: 15-22.
- FREITAS, B. M.; ALVES, J. E.; BRANDÃO, G. F. & ARAÚJO, Z. B. 1999. Pollination requirements of West Indian cherry (*Malpighia emarginata*) and its putative pollinators, *Centris* bees, in NE Brazil. **J. Agric. Sci.**, **133**: 303-311.
- GARÓFALO, C.A.; MARTINS, C.F. & ALVES-DOS-SANTOS, I. 2004. The brazilian solitary bee species caught in trap nests. 77-84. In: Freitas, B. M. & Pereira, J.O.P. (eds.). *Solitary Bees: Conservation, Rearing and Management for Pollination*. Fortaleza, Imprensa Universitária UFC. 286p. ISBN: 85-7485-049-7.

- GOTTSBERGER, G; CAMARGO, J. M. F. & SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. 1988. A bee-pollinated tropical community: the beach dune vegetation of Ilha de São Luís, Maranhão, **Brazil. Bot. Jahrb. Syst.**, **109** (4): 469-500.
- HERRERA, C. M. 1990. Daily pattern of pollinator activity, differential pollinating effectiveness, and floral resource availability, in a summer-flowering Mediterranean shrub. **Oikos** **58**: 277 - 288.
- JANZEN, D. H. 1971. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. **Science**, **171**: 203-205.
- JESUS, B. M. V. & GARÓFALO, C. A. 2000. Nesting behaviour of *Centris* (*Heterocentris*) *analis* (Fabricius) in southeastern Brazil (Hymenoptera, Apidae, Centridini). **Apidologie**, **31**: 503-515.
- KLEIN, A. M.; STEFFAN-DEWENTER, I. & TSCHARNTKE, T. 2007. Foraging trip duration and density of megachilid bees, eumenid wasps and pompilid wasps in tropical agroforestry systems. **J. Anim. Ecol.**, **73**: 517-525.
- LINSLEY, E. G. 1958. The ecology of solitary bees. **Hilgardia** **27**: 543 - 599.
- MARTINS, C. F.; SOUZA, A. K. P. 2005. Estratificação vertical de abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em uma área de Mata Atlântica, Paraíba, Brasil. **Revta. bras. Zool.**, **22** (4): 913 - 918.
- MICHENER, C. D.; LANGE, R. B.; BIGARELLA, J. J. & SALAMUNI, R. 1958. Factors influencing the distribution of bees in earth banks. **Ecology** **39**: 207 - 217.
- MICHENER, C. 1974. **The social behavior of the bees**: A comparative study. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press, 404p.
- MICHENER, C. 2007. **The bees of the world**. 2nd. ed. Baltimore, Johns Hopkins University Press, 953p.
- MORATO, E.; GARCIA, M. V. B. & CAMPOS, L. A. O. 1999. Biologia de *Centris Fabricius* (Hymenoptera, Anthophoridae, Centridini) em matas contínuas e fragmentos na Amazônia Central. **Revta. Bras. Zool.** **16**: 1213 – 1222.
- MOURE, J. S. & CASTRO, M. S. 2001. Uma nova espécie de *Centris* Fabricius (Hymenoptera, Apoidea, Anthophoridae) do Nordeste do Brasil. **Rev. Bras. Zool.**, **18**: 329-333.

- NEFF, J. L. & SIMPSON, B. B. 1981. Oil-collecting structures in the Anthophoridae (Hymenoptera): Morphology, function and use in systematics. **J. Kansas Entomol. Soc.**, **54**: 95-123.
- NEFF, J. L. & SIMPSON, B. 1993. Bees, pollination systems and plant diversity, p. 143-167. In J. Lasalle & J. D. Gauld (ed.), **Hymenoptera and biodiversity**, Cab International (The Natural History Museum), 348p.
- OLIVEIRA, R. & SCHLINDWEIN, C. 2009. Searching for a manageable pollinator for acerola orchards: the solitary flower constant-bees *Centris analis* (Hymenoptera, Apidae, Centridini). **J. Econ. Entomol.**, **102**: 265-273.
- O'TOOLE, C. & RAW, A. 1991. **Bees of the World**. London, Blandford, 192p.
- PEAKALL, R. & SCHIESTL, F. P. 2004. A mark-recapture study of male *Colletes cunicularius* bees: implications for pollination by sexual deception. **Behav Ecol Sociobiol.** **56**:579 - 584.
- PEIXOTO, M. P. 2010. **Biologia e ecologia da nidificação de *Centris (Centris) flavifrons* Fabricius (Hymenoptera: Apidae, Centridini) em área urbana da cidade de João Pessoa, PB**. Trabalho de Monografia. Universidade Federal da Paraíba. Departamento de Sistemática e Ecologia.
- POTTS, S. G.; VULLIAMY, B.; ROBERTS, S.; O' TOOLE, C.; DAFNI, A.; NE'EMAN, G. & WILLMER, P. 2005. Role of Nesting,Resources in Organizing Diverse Bee Communities in a Mediterranean Landscape. **Ecol. Entomol.**, **30**: 78-85.
- PROCTOR, M.; YEO, P. & LACK, A. 1996. **The natural history of pollination**. London, Harper Collins Publishers, 479p.
- RAMBALDI, D. M. & OLIVEIRA, D. A. S (orgs.). 2003. **Fragmentação de Ecossistemas: Causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas**. Brasília: MMA/SBF.510 p.
- REBÊLO, J. M. M. 2001. **História Natural das Euglossíneas – As abelhas das orquídeas**. Lithograf Editora, São Luís, Maranhão, Brasil. 152p.
- RÊGO, M. M. C. & ALBUQUERQUE, P. M. C. 1989. Comportamento das abelhas visitantes de murici, *Byrsonima crassifolia* (L.). Kunth, Malpighiaceae. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, sér. Zool.** **5**: 179-193.

- RÊGO, M. C. M.; ALBUQUERQUE, P. M. C.; RAMOS, M. C. & CARREIRA, L. M. 2006. Aspectos da biologia de nidificação de *Centris flavifrons* (Fries) (Hymenoptera: Apidae, Centridini), um dos principais polinizadores do murici (*Byrsonima crassifolia* L. Kunth, Malpighiaceae), no Maranhão. **Neotrop. Entomol.**, **35** (5): 579-587.
- RINCON, M.; D. W. ROUBIK; B. FINEGAN; D. DELGADO, & N. ZAMORA. 1999. Understory bees and floral resources in logged and silviculturally treated Costa Rican rainforest plots. **J. Kansas Entomol. Soc.**, **72**: 379-393.
- ROBERT, R. B. & VALLESPER, S. R. 1978. Specialization of hair bearing pollen and oil on the legs of bees (Apoidea: Hymenoptera). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, **71**: 619-627.
- ROIG-ALSINA, A. & MICHENER, C. D. 1993. Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea) **Univ. Kansas Bull.**, **55**: 124-162.
- ROUBIK, D. W. 1989. **Ecology and natural history of tropical bees**. Cambridge, Cambridge University Press, 514p.
- ROUBIK, D. W. 1993. Tropical pollinators in the canopy and understory: field data and theory for stratum preferences. **J. Ins. Behav.**, **6**: 659-673.
- SAMEJIMA, H.; MARZUKI, M.; NAGAMITSU, T. & NAKASIZUKA, T. 2004. The Effects of Human Disturbance on a Stingless Bee Community in a Tropical Rainforest. **Biol. Cons.**, **120**: 527-587.
- SAURE, C. 1996. Urban habitats for bees: the example of the city of Berlin. 47-53 p. In: Matheson, A.; Buchmann, S.L.; O'Toole, C.; Westrich, P. & Williams, I.H. (Eds.). **The conservation of bees**. London: Linnean Society of London and the International Bee Research Association. 253 p.
- SCHLINDWEIN, C. 2000. **A importância de abelhas especializadas na polinização de plantas nativas e conservação do meio ambiente**. p. 131 - 141. In Anais IV Encontro Abelhas, Ribeirão Preto, USP.
- SCHLINDWEIN, C.; WITTMANN, D.; MARTINS, C. F.; HAMM, A.; SIQUEIRA, J. A.; SCHIFFLER, D. & MACHADO, I. C. 2005. Pollination of *Campanula rapunculus* L. (Campanulaceae): How much pollen flows into pollination and into reproduction of oligolectic pollinators? **Plant Syst. Evol.**, **250**: 147-156.

SEPLAN/JP – Secretaria de Planejamento da Prefeitura Municipal de João Pessoa, disponível em:<http://www.joaopessoa.pb.gov.br/secretarias/seplan/perfil/nossageografia/> acessado em 12/11/2011.

SILVA, F. O.; VIANA, B. F. & NEVES, E. L. 2001. Biologia e arquitetura de ninhos de *Centris (Hemisiella) tarsata* Smith (Hymenoptera: Apidae: Centridini). **Neotrop. Entomol.**, **30**: 541-545.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. 2002. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte. 1ª ed. 253 p.

SNELLING, R. R. 1984. Studies on the taxonomy and distribution American Centridine bees (Hymenoptera: Anthophoridae). **Contrib. Sci. (Los Angel.)**, **347**: 1-69.

VIANA, B. F., SILVA, F. O. & KLEINERT, A. M. P. 2001. Diversidade e sazonalidade de abelhas solitárias (Hymenoptera: Apoidea) em dunas litorâneas no Nordeste do Brasil. **Neotrop. Entomol.**, **30**: 245-251.

VILLELA, D. M.; NASCIMENTO, M. T.; ARAGÃO, L. E. O. C. & GAMA, D. M. 2006. Effect of selective logging on forest structure and nutrient cycling in a seasonally dry Brazilian Atlantic Forest. **J. Biogeography**, **33**: 506-516.

VINSON, S.B.; FRANKIE, G. W.; WILLIAMS, H. J. & COVILLE, R. E. 1986. Nesting habitats of *Centris flavofasciata* Friese (Hymenoptera: Apoidea: Anthophoridae) in Costa Rica. **J. Kansas Entomol. Soc.** **60**: 249 - 263.

VINSON, S. B. & FRANKIE, G. W. 1988. A comparative study of the ground nests of *Centris flavifrons* and *Centris aethiocesta* (Hymenoptera: Anthophoridae). **Entomol. Exp. Appl.**, **49**: 181-187.

VINSON, S. B.; FRANKIE, G. W. & BARTHELL, J. 1993. **Threats to the diversity of solitary bees in a Neotropical dry forest in Central America**, p.53-81. In J. LaSalle & I.D. Gauld (eds.), Hymenoptera and biodiversity. London, C.A.B. International, 348p.

VINSON, S. B.; FRANKIE, G. W. & WILLIAMS, H. J. 1996. Chemical ecology of the genus *Centris* (Hymenoptera: Apidae). **Fla. Entomol.**, **79**: 109-129.

- VINSON, S. B.; WILLIAM, H. J.; FRANKIE, G. W. & SHRUM, G. 1997. Floral lipid chemistry of *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae) and a use of floral lipids by *Centris* bees (Hymenoptera: Apidae) **Biotropica**, **29**: 76-83.
- VINSON, S. B. & FRANKIE, G. W. 1999. Nesting behavior of *Centris flavofasciata* (Hymenoptera: Apidae) with respect to the source of the cell wall. **Journal of the Kansas Entomological Society** **72** (1): 46 - 59.
- VOGEL, S. 1974. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. **Tropische und Subtropische Pflanzenwelt**, **7**: 285-369.
- VOGEL, S. & MACHADO, I. C. S. 1991. Pollination of four sympatric species of *Angelonia* (Scrophulariaceae) by oil-collecting bees in NE, Brasil. **Pl. Syst. Evol.**, **178**: 153-178.
- WILLMER, P. G. 1983. Thermal constraints on activity patterns in nectar-feeding insects. **Ecological Entomology** **8**: 455 – 469.

CAPÍTULO II

Extração de DNA e variabilidade genética de *Centris* (*Centris*)
flavifrons (FABRICIUS, 1775) (Hymenoptera: Apidae, Centridini)



1 INTRODUÇÃO

1.1 O habitat e a variabilidade genética

O habitat adequado para uma espécie de abelha deve oferecer, ao menos, duas premissas básicas que favorecem a presença de uma população de abelha em uma determinada área, que são a disponibilidade de recursos florais e a oferta de materiais e locais para a sua nidificação (CANE, 2001; FRANKIE *et al.*, 1989; ANTONINI & MARTINS, 2003). No entanto, a perda e o isolamento de habitats naturais, em consequência da crescente expansão da população humana e seus impactos decorrentes, têm efeito deletério em comunidades de invertebrados polinizadores e na reprodução sexual das plantas (CANE, 2001).

Essa redução da área total de um habitat natural pode implicar em diversos efeitos negativos, como no caso da depressão por endogamia, causando a perda de variabilidade genética devida à redução do tamanho das populações, diminuição das taxas reprodutivas e de sobrevivência e menor resistência a doenças (BOUZAT *et al.*, 1998); ou podem ter efeitos a longo prazo, tais como impedindo a adaptação às alterações ambientais (LANDE, R. & BARROWCLOUGH, G. 1987). Desse modo, populações anteriormente contínuas são subdivididas em conjuntos de pequenas populações locais, isoladas entre si em maior ou menor grau, apresentando taxas mais baixas de dispersão e migração, dependendo da distribuição espacial dos fragmentos e do poder de dispersão inerente às espécies (LACY, 1992; AVISE, 2004; ANTONINI & MARTINS, 2003; RAMBALDI & OLIVEIRA, 2003; LAURENCE *et al.*, 2002).

A importância da variabilidade genética está relacionada à adaptação das populações a um ambiente em constante transformação, conferindo aos indivíduos, ao longo do tempo, as características necessárias para a sua sobrevivência em novas situações a partir da presença de determinados alelos ou da combinação deles (PRIMACK & RODRIGUES, 2001). No entanto, populações pequenas sujeitas à deriva genética e mais suscetíveis a efeitos genéticos deletérios (depressão endogâmica e exogâmica, flutuações demográficas devidas a variações ao acaso, nas taxas de nascimento e mortalidade; ação predatória; incidência de doenças e perda da flexibilidade evolucionária) acabam tendo um declínio ainda mais acentuado no tamanho da população e uma maior chance de extinção (PRIMACK & RODRIGUES, 2001). Esta redução mais drástica no tamanho da população comumente ocorre em populações que já são pequenas e fragmentadas, ou em populações introduzidas,

em que a diversidade de alelos no loco de determinação sexual é baixa (ZAYED, 2004; ZAYED & PACKER, 2002).

No entanto, apesar do efeito negativo atribuído ao processo de urbanização, principalmente relacionados à diminuição das populações e ao declínio da biodiversidade, em especial dos polinizadores, vários estudos sobre ecologia urbana consideram a importância dos ambientes urbanos funcionando como corredores e/ou “albergues” de muitas espécies de insetos (FETRIDGE *et al.* 2008; ZANETTE *et al.*, 2005; CANE *et al.* 2005; FRANKIE *et al.* de 2005). Dessa forma, além de se ressaltar a importância da preservação de habitats naturais, é necessário que haja também a conservação dos fragmentos remanescentes desses habitats, assim como a manutenção e/ou construção de jardins e parques, o que favoreceria o aumento da biodiversidade em ambientes urbanos (MATTESON *et al.*, 2008; FETRIDGE *et al.*, 2008).

Alguns estudos evidenciam a utilização dos recursos em área urbana, principalmente com relação ao processo de colonização e permanência nessas áreas por essas populações (McINTYRE, 2001; CANE *et al.* 2005). Segundo Cane *et al.* (2005), há uma grande dificuldade de se encontrar, nessas áreas, ninhos de abelhas que nidificam no solo, por exemplo. Nesse sentido, é fundamental conhecer em detalhes a biologia dessas espécies de abelhas para propor estratégias de manejo, visando à conservação e até mesmo a utilização sustentável dessas abelhas no desenvolvimento de técnicas de manejo de polinizadores de culturas, uma das etapas para a implementação de programas de polinização. Todavia, há muito para ser estudado, pois aspectos da biologia reprodutiva, tais como a capacidade reprodutiva das fêmeas e os fatores genéticos e ecológicos que viabilizam o sucesso de colonização de uma área por uma espécie de abelha, são ainda completamente desconhecidos, tanto em habitats naturais quanto em agroecossistemas e/ou nos ambientes urbanos.

1.2 Estudos genéticos com abelhas

Levando em consideração que a sobrevivência de populações biológicas em um determinado ecossistema é determinada pela dinâmica do ambiente, das interações ecológicas e pela estrutura genética dessas populações, um estudo sobre a ecologia das espécies pode apresentar resultados mais completos quando acompanhado pelo estudo de fluxo gênico nestas populações (FREITAS *et al.*, 2005). Os marcadores moleculares constituem poderosas ferramentas para estudos da genética populacional (FREITAS *et al.*, 2005). Dentre os marcadores moleculares, os genes mitocondriais (DNAmt), as alozimas e

locos microssatélites (ambos marcadores nucleares) nucleares têm sido os mais efetivamente utilizados nesses trabalhos.

Um marcador molecular é um fenótipo molecular, resultado da expressão de um gene, como as isoenzimas, ou um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma) (MURPHY, *et al.*, 1990). Frequentemente, estudos populacionais utilizando o DNA mitocondrial como marcador envolvem a caracterização desse genoma por enzimas de restrição. A análise do número de sítios gerados por enzima e a posição relativa destes no mapa de restrição, são os parâmetros utilizados para a determinação do que chamamos de haplótipos mitocondriais (ARIAS, *et al.* 2003).

É grande o potencial desses marcadores em gerar informações relevantes a respeito da genética e evolução em insetos contribuindo para a construção de um cenário mais completo sobre a biologia das abelhas, demonstrando os efeitos da alteração ambiental na estrutura genética das populações e, conseqüentemente, nas suas relações ecológicas (WALDSCHMIDT *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, a utilização de metodologias moleculares em estudos sobre abelhas tem permitido a investigação de questões relacionadas à evolução e diversificação dos grupos, biologia reprodutiva e aspectos ecológicos, especialmente aqueles relacionados ao forrageamento (CHAPMAN *et al.*, 2003; DARVILL *et al.*, 2004; KNIGHT *et al.*, 2005). Relações filogenéticas em alguns grupos de abelhas sociais têm sido estabelecidas por meio destas ferramentas moleculares (COSTA *et al.*, 2003; CAMERON & MARDULYN, 2003; CAMERON & WILLIAMS, 2003; MICHEL-SALZAT *et al.*, 2004), assim como a história biogeográfica destas espécies (DICK *et al.*, 2004).

Além disso, aspectos da reprodução de espécies de abelhas não sociais, como a estrutura de acasalamento e o grau de parentesco entre fêmeas de espécies com hábitos distintos de nidificação, vêm sendo investigados com a utilização de marcadores moleculares (KUKUK & SAGE, 1994; PAXTON, 2000; PAXTON *et al.*, 1996; KRAUS *et al.*, 2008). Estas ferramentas têm permitido ainda a investigação de questões como o efeito da fragmentação de habitats sobre as populações de diferentes grupos de insetos (JOHANNESSEN *et al.*, 1996; KRAUSS *et al.*, 2004; BROUAT *et al.*, 2004).

Além do conhecimento sobre a biologia, ecologia da nidificação e estrutura genética das populações, o presente estudo, através do uso de marcadores moleculares mitocondriais, permitiu a verificação dos mecanismos de colonização em *C. flavifrons* e inferir hipóteses sobre uma possível tendência filopátrica apresentada pela espécie.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material e Locais de Coleta

As análises genéticas mitocondriais realizadas neste trabalho tiveram como objeto de estudo a espécie *Centris (Centris) flavifrons* Fabricius, 1775. Grande parte do material biológico utilizado nas análises genéticas foi coletada durante o primeiro ano dos estudos de campo sobre a biologia e ecologia da nidificação de *C. flavifrons*, mais especificamente de setembro/2010 a fevereiro/2011, que corresponde ao período seco na região do estudo (Nordeste do Brasil) quando cessam as chuvas e as atividades de nidificação dessa e de outras espécies de abelhas são intensas (MORATO *et. al.*, 1999; JESUS & GARÓFALO 2000; AGUIAR *et. al.*, 2002; MADEIRA-DA-SILVA *et. al.*, 2002; MARTINS & VIANA, 2002; GAZOLA & GARÓFALO, 2002).

A área principal de amostragem, onde ocorreu grande parte da coleta de material e a realização dos estudos ecológicos e comportamentais sobre a nidificação da espécie, compreende um jardim residencial, situado em área urbana, no bairro Jardim Cidade Universitária, na cidade de João Pessoa, Paraíba (ver item 2.1 no capítulo I) (Figuras I.4, I.5 e II.1; Tabela II.1).

No momento em que as fêmeas eram capturadas para serem marcadas, objetivando-se a individualização e um monitoramento acurado do comportamento de nidificação dessas abelhas (ver capítulo I), foi retirado, com o auxílio de pinças entomológicas, o flagelo da antena direita destes indivíduos para estudos genéticos. Além disso, indivíduos mortos, comumente encontrados na área de estudo, também foram coletados para tais análises.

Os 10 vasos disponibilizados como “locais armadilha” para estudos sobre a ecologia da nidificação, também serviram como ferramenta para a obtenção do material das células cria para análise genética. Com as 20 gaiolas instaladas sobre alguns ninhos já concluídos, objetivou-se a captura dos emergentes para coleta de material biológico (flagelo da antena) para análise genética e posterior marcação da abelha, a qual seria solta. (Sobre os “vasos armadilha” e as gaiolas, ver item 2.2 no capítulo I).

As peças e/ou indivíduos coletados foram dispostos em tubos de vidro, devidamente identificados, contendo álcool absoluto. Quando o material tratava-se do flagelo das antenas dos indivíduos, a etiqueta de identificação dos tubos continha também o número do respectivo ninho em que a fêmea foi coletada.

Quando as atividades de nidificação do primeiro ano de estudo tornaram-se menos freqüentes (apenas poucos e esporádicos ninhos ativos, porém ainda sendo monitorados), o que corresponde ao início do período chuvoso, só então, foi possível voltar os esforços para a

coleta de espécimes de *C. flavifrons* em outras localidades, objetivando estudos genéticos interpopulacionais (detecção de fluxo gênico e diferenciação genética entre as populações).

Foram coletas *C. flavifrons* no município de Mamanguape, Paraíba, onde essas abelhas já haviam sido amostradas anteriormente, conforme constam os espécimes testemunhos na Coleção Entomológica do Laboratório de Entomologia da Universidade Federal da Paraíba. Outra expedição de coleta foi realizada para o município de Alhandra (Sítio Olho D'Água), também no estado da Paraíba; outras foram realizadas em vários municípios do estado de Pernambuco, como Itamaracá, Igarassu, Tamandaré, Paudalho (Fazenda Acerolândia), Paulista, dentre outras localidades (Figura II.1; Tabelas II.1). As buscas se davam de forma ativa em plantas produtoras de óleos comumente visitadas por essas abelhas, representadas nas famílias Malpighiaceae (RÊGO & ALBUQUERQUE, 1989; FREITAS, *et al.* 1999), Krameriaceae (BUCHMANN, 1987) e Scrophulariaceae (VOGEL & MACHADO, 1991).

Alguns espécimes (n=13) da coleção do Laboratório Plebéia, da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, foram doados pelo Prof. Dr. Clemens Schlindwein. Esses indivíduos (10 machos e três fêmeas) foram coletados em expedições de campo realizadas pela equipe desse laboratório em três diferentes localidades: Granja de Antônio, no município de Camaragibe-PE; Vale do Catimbau, em Buíque-PE e na Usina São José, em Igarassu-PE (Figuras II.1; Tabela II.1). As distâncias entre todas as localidades onde houve coleta de *C. flavifrons* estão disponíveis na tabela II.2).

Posteriormente, todo o material coletado foi levado para o Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros, do Departamento de Genética e Evolução, da Universidade de São Carlos - São Paulo (LGEH-UFSCar), para a realização das análises genéticas conduzidas pela mestrandia junto ao grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama. *Vouchers* e amostras de DNA de todo o material coletado foram depositados no LGEH da UFSCar.

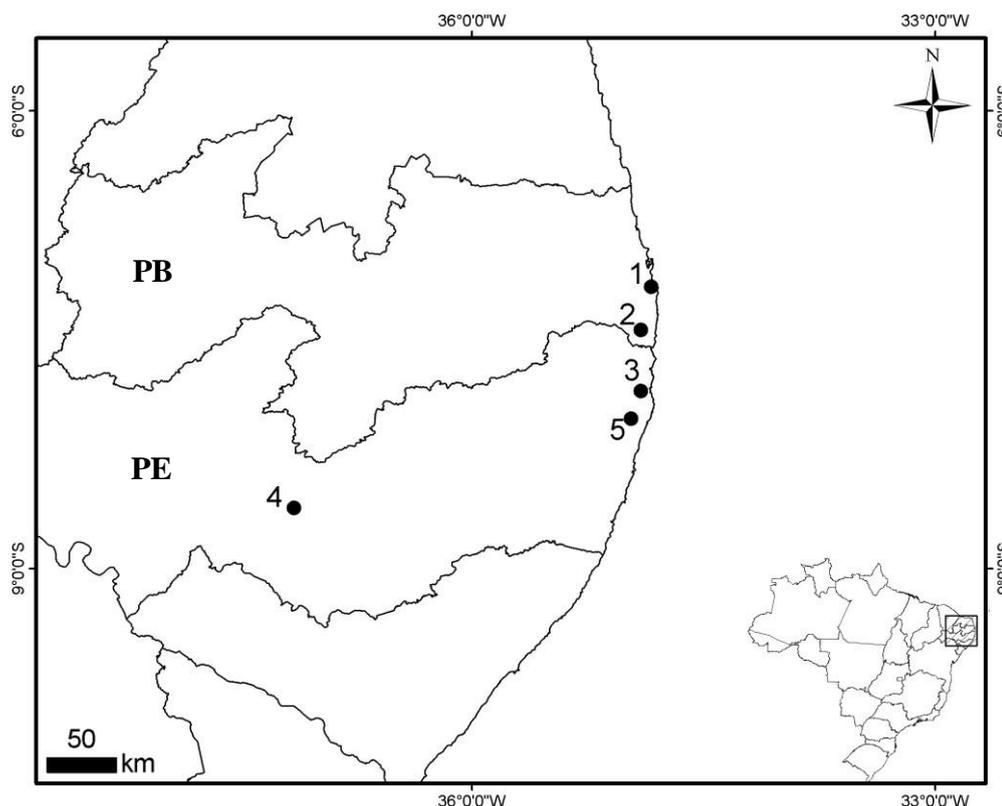


Figura II.1. Mapa representativo com ênfase no estado da Paraíba (PB) e parte do estado de Pernambuco (PE) contendo as áreas onde foram realizadas expedições para coleta de *C. flavifrons*. 1 – Área principal de estudo, Cidade Universitária, João Pessoa-PB; 2 – Sítio Olho D'Água, Alhandra-PB; 3 – Usina São João, Igarassu-PE; 4 – Vale do Catimbau, Buíque-PE; 5 – Granja Antônio, Camaragibe-PE.

Tabela II.1. Áreas onde houve amostragens de *C. flavifrons* e suas respectivas coordenadas geográficas. Para essas áreas, foram atribuídos números de identificação e abreviaturas das localidades amostradas, os quais são utilizados ao longo do presente estudo

ÁREA	LOCALIDADE	CÓDIGO	COORDENADAS
1	Jardim Cidade Universitária, João Pessoa – Paraíba	JoaoPessoaPB	7° 9'11.74"S 34°50'28.51"O
2	Sítio Olho D'Água, Alhandra – Paraíba	AlhandraPB	7°27'19.78"S 34°54'2.23"O
3	Usina São José, Igarassu – Pernambuco	IgarassuPE	7°50'57.81"S 34°54'56.00"O
4	Vale do Catimbau, Buíque – Pernambuco	BuíquePE	8°36'40.02"S 37°10'17.37"O
5	Granja Antônio, Camaragibe – Pernambuco	CamaragibePE	8° 1'14.87"S 34°58'59.51"O

Tabela II.2. Distância (em Km) entre as áreas onde houve amostragens de *C. flavifrons*

ÁREAS	DISTÂNCIA (Km)
1 - 2	34
1 - 3	75
1 - 5	97
2 - 3	44
2 - 5	63
3 - 5	20

2.2 Extração do DNA

Nas análises genéticas foram estudadas regiões de dois genes mitocondriais como marcadores: citocromo B (*cytb*) e subunidade I do complexo citocromo oxidase c (COI). Para isso, a extração do DNA total das fêmeas foi feita a partir do flagelo das antenas ou pernas (anteriores e medianas) das fêmeas. Os flagelos das antenas, contidos em álcool absoluto, foram lavados em água purificada e em seguida enxugadas em papel absorvente para posterior processo de maceração que acontecia em tubos de 1,5 mL, com bastões de vidro e com o auxílio de nitrogênio líquido. Quando o material a ser extraído eram as pernas das fêmeas, estas foram separadas do restante do corpo, com auxílio de pinças entomológicas, apenas no momento da extração.

As amostras que pertenciam a fêmeas nidificantes na área principal de estudo (João Pessoa-PB), o que corresponde à grande maioria do material coletado, foram utilizadas unicamente o flagelo de suas antenas. O uso das pernas como material para a extração do DNA aconteceu apenas quando os indivíduos eram encontrados mortos na área de estudo ou para os indivíduos secos (doados) provenientes do estado de Pernambuco.

As amostras analisadas neste trabalho tiveram o DNA total extraído através do protocolo padrão de extração por fenol-clorofórmio proposto por Sheppard & McPherson (1991) para algumas amostras e pelo protocolo de extração CHELEX® 100 (WALSH *et al.*, 1991) para outras amostras.

A opção de se utilizar ambas as metodologias se deu com o objetivo de maximizar as reações de amplificações, testando qual o melhor procedimento para extração de DNA uma vez que a quantidade de material biológico coletado por indivíduo era pequena (flagelos de antenas) e visando evitar a perda de material biológico pelo uso de uma metodologia inadequada.

2.3 Amplificação e Purificação do DNA mitocondrial

A partir do DNA total extraído, foram amplificados via PCR (reação em cadeia da polimerase) os genes mitocondriais *cytb* e COI. Ambas as reações ocorreram em 40 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação; 50°C por 20 segundos para anelamento dos primers e 72°C por 1 minuto para a extensão da fita de DNA. Cada PCR foi preparada com 2,5µL de dNTPs 100 mM; 2,5 µL de tampão 10x; 1,25 µL de MgCl₂ 50 mM; 1 µM de cada primer, 0,2 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen, 5 U/µL), 3 µL de DNA extraído e água esterilizada para completar o volume final de 25 µL.

O primer utilizado para a amplificação da região do DNA mitocondrial *cytb* foi o mesmo proposto para amplificar essa região homóloga em *Apis mellifera*, CB-N-11367 5'-ATT ACA CCT CCT AAT TTA TTA GGA AT-3' (Simon *et al.* 1994). Esse primer já foi utilizado em trabalhos anteriores com sucesso em *Centris inermis* (CAMERON & MARDULYN, 2001). Já a amplificação da região do DNA mitocondrial COI foi possível com a utilização do seguinte par de oligos iniciadores: primer *forward* de *Apis mellifera* 5'-GGA GAT CCA ATT CTT TAT CAA C-3' e primer *reverse* de *Eulaema nigrita* 5'-GAT ATT AAT CCT AAA AAA TGT TGA GG-3'. O primeiro primer para COI foi desenvolvido no laboratório LEGH da UFSCar-SP e o segundo foi descrito por Dick *et al.*, 2004).

Para verificar se a região de interesse foi amplificada, os fragmentos obtidos foram submetidos a eletroforese em géis de agarose 1% corados com 1µL de Gel Red™ e visualizados em luz UV. Os produtos de amplificação destas regiões foram posteriormente purificados utilizando-se 1U de SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, GE) e 10U de Exoll (Exonuclease I, GE) para cada 8µL de produto de PCR, sendo incubados a 37° C por uma hora e a 80° C por 15 minutos. Os produtos purificados também foram visualizados em géis de agarose 1%.

2.4 Sequenciamento do DNA mitocondrial

O seqüenciamento foi feito diretamente a partir dos produtos purificados da PCR. A reação de seqüenciamento foi realizada em volume final de 10 µL, incluindo 3,5 µL de Tampão Save Money 2,5x, 0,5 µL de Big Dye (Applied Biosystems), 1 µM de primer *Forward* ou *Reverse* e 1 µL de DNA purificado.

Foram seqüenciadas 24 amostras para o gene mitocondrial *cytb* e 24 amostras para o gene mitocondrial COI. As seqüências foram obtidas em seqüenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems) do Laboratório de Biotecnologia da FCAV – UNESP de Jaboticabal, SP.

2.5 Análise dos dados

Os eletroferogramas gerados foram editados no programa Codon Code versão 3.7.1 (CodonCode, Dedham, Massachusetts, United States) e, a partir do mesmo programa, as seqüências obtidas com os primers R (reverse) e F (forward) foram montadas. Após correções, as seqüências F e R de cada amostra foram, então, alinhadas no programa

MultAlin© (disponível em: disponível em <<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>>) para verificação de possíveis alterações nucleotídicas.

Após a edição das sequências foram construídas e analisadas redes de haplótipos para os genes mitocondriais *cytb* e COI através do software TCS versão 1.21 com $\alpha = 0,05$ (CLEMENT, POSADA & CRANDALL, 2000). Os diferentes padrões para estas regiões do genoma mitocondrial foram averiguados quanto à sua distribuição geográfica.

3 RESULTADOS

O material genético de 84 indivíduos foi analisado no presente estudo (Tabela II.3). Destes, 66 amostras pertenciam a fêmeas que estavam nidificando na área principal de amostragem (área 1 – João Pessoa-PB) e tiveram o flagelo de sua antena direita coletada durante a captura para marcação. Mais duas amostras do flagelo de antenas analisadas pertenciam a duas abelhas que emergiram na área de estudo dentro das “gaiolas” usadas como armadilhas. Apenas essas duas amostras foram obtidas com a utilização dos vasos disponibilizados como “locais armadilhas” e cobertos com telas, formando “gaiolas”, fato que ocorreu no primeiro ano de estudo.

Três espécimes (amostras) foram coletados no município de Alhandra-PB (área 2 - Sítio Olho D'Água). No entanto, nenhum espécime a mais foi coletado em todas as demais expedições para coleta de *C. flavifrons* para as demais localidades. O único material conseguido de outro estado foram os 13 espécimes doados pelo Prof. Dr. Clemens Schlindwein, da UFPE. Estes espécimes, provenientes do estado de Pernambuco (Usina São José, no município de Igarassu (área 3; n=7); Vale do Catimbau, em Buíque (área 4; n=3) e Granja de Antônio, em Camaragibe (área 5; n=3)) tiveram um papel importante neste estudo atuando também como controle, para fins comparativos (Tabela II.3).

Tabela II.3. Número de amostras de *C. flavifrons* obtidas em cada área. As especificações de cada área estão na Tabela II.2. F = fêmea; M = macho

ÁREA	AMOSTRAS
1	68 (F)
2	3 (F)
3	7 (M)
4	3 (2F; 1M)
5	3 (2F; 1M)
Total	84

3.1 Extração e amplificação do DNA mitocondrial

Apenas um processo de extração do DNA total através do protocolo padrão de extração por fenol-clorofórmio (SHEPPARD & MCPHERON, 1991) foi realizado, extraindo o material genético de 20 amostras. Em seguida, foi realizada, experimentalmente, a extração do DNA total de outras 14 amostras pelo protocolo de extração CHELEX® 100 (WALSH *et al.*,

1991). O resultado da extração por CHELEX® foi testado via PCR e respondeu de forma relativamente positiva. Assim, as extrações realizadas para as 50 demais amostras se deram através deste processo.

Contudo, alguns dos exemplares não apresentaram bom rendimento nas reações de amplificação e, conseqüentemente, de seqüenciamento, seja para um gene em particular ou para ambos. Foram realizadas diversas alterações no protocolo de amplificação (mudanças nos ciclos de amplificação, nas concentrações das reações, de *primer*, entre outros), assim como várias tentativas de reamplificação do material de algumas amostras, na busca de resultados mais homogêneos, mas em muitos casos as tentativas não obtiveram sucesso. Nestes casos, os espécimes não foram considerados na amostragem, objetivando-se evitar resultados equivocados que prejudicariam a consistência dos resultados finais do presente estudo. Foi obtido sucesso na amplificação de 24 amostras para a região *cytb* e de 24 amostras para a região COI (Figura II.2).

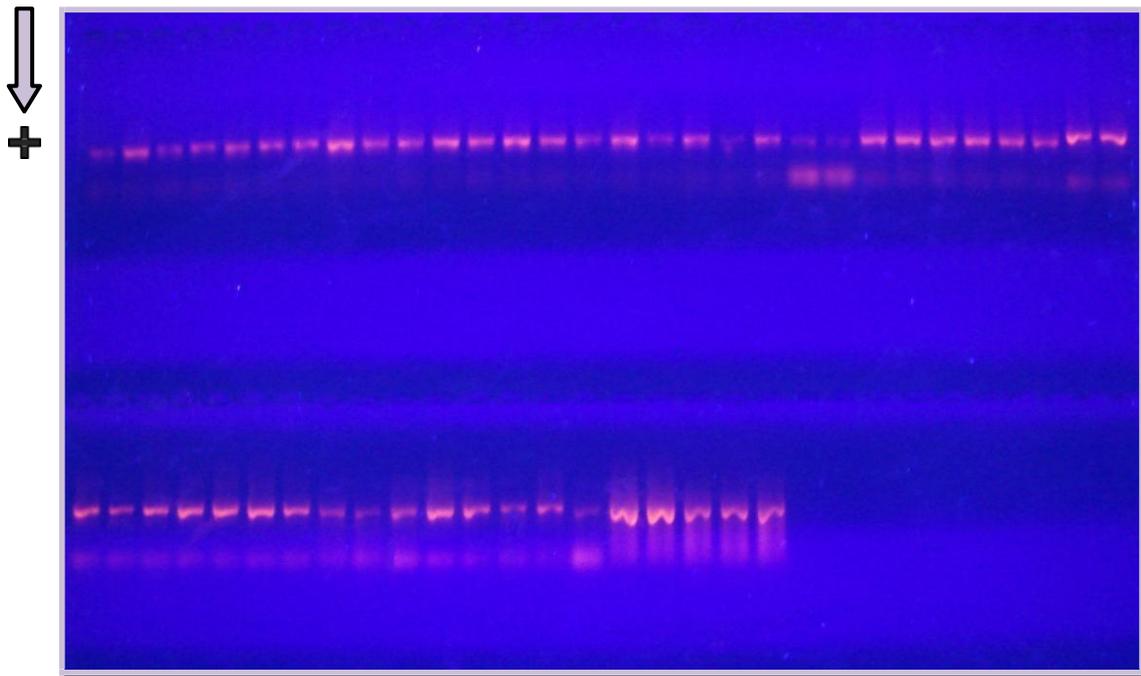


Figura II.2. Gel de agarose 1% corado com Gel Red™ e visualizado em luz UV mostrando os fragmentos de *cytb* e COI após a purificação. São observadas 50 amostras, porém, duas delas (19 e 22) foram excluídas do seqüenciamento pois não foi obtido resultado positivo para o seqüenciamento. A seta indica a direção da migração no gel. Foto: Kátia Ferreira.

3.2 Características das sequências do DNA mitocondrial para o gene *cytb*

Os fragmentos obtidos para o gene *cytb* do DNA mitocondrial de 20 indivíduos de *C. flavifrons*, para os quais foi obtido um resultado positivo no seqüenciamento, possuíam, em geral, 485 pares de base (Figura II.3). Foram identificados 13 haplótipos (Figura II.5 e tabela II.4). Os haplótipos detectados para a região *cytb* do DNA mitocondrial e suas respectivas localidades em que as amostras foram coletadas podem ser observados na tabela II.4.

Com o alinhamento para o gene *cytb* podemos verificar que existem vários haplótipos mitocondriais nas amostras que foram coletadas na área principal do estudo, em João Pessoa (identificadas com JoaoPessoaPB). Algumas amostras controle, provenientes do estado de Pernambuco (Igarassu; área 3), apresentaram muitas substituições nucleotídicas - com relação às do consenso - em comparação com as demais (Figuras II.3 e II.5).

Uma das amostras (12556JoaoPessoaPB) apresentou alguns "N" em sua sequência para o gene *cytb*, os quais foram mantidos pois não foi possível a identificação da base correta nas suas respectivas posições.

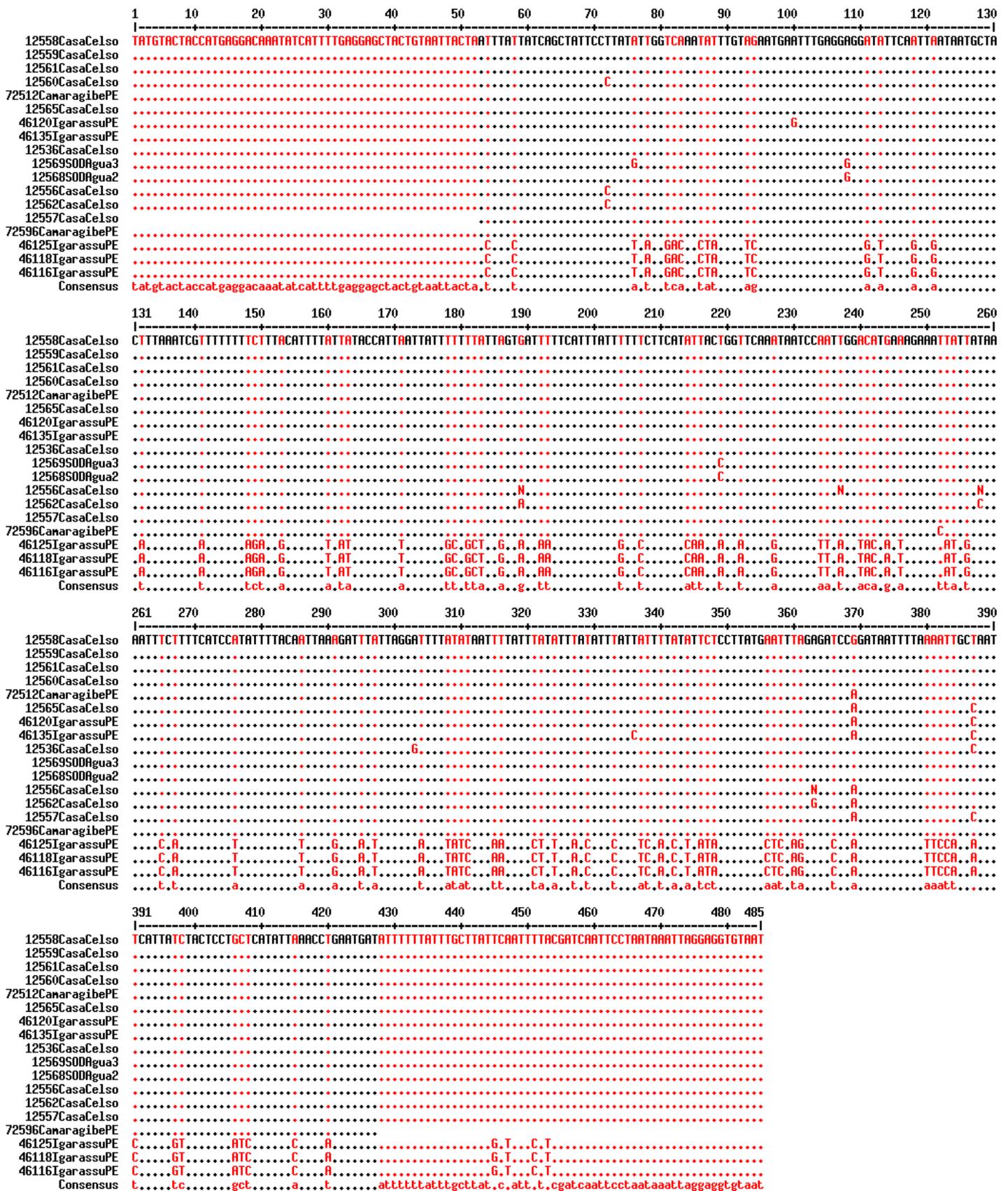


Figura II.3. Alinhamento entre seqüências obtidas para o gene *cytb*. Na legenda, os números precedentes em cada amostra referem-se ao número da extração do material genético; JoaoPessoaPB = Área principal de monitoramento, em João Pessoa/PB; AlhandraPB = Sítio Olho D'água, em Alhandra/PB; CamaragibePE e IgarassuPE correspondem a amostras provenientes desses municípios, localizados no estado de Pernambuco.

3.3 Características das sequências do DNA mitocondrial para o gene COI

Para as 13 amostras de *C. flavifrons* analisadas, nas quais foi obtido sucesso no seqüenciamento, os fragmentos obtidos para o gene COI do DNA mitocondrial possuíam, em geral, 629 pares de base (Figura II.4). Foram identificados sete haplótipos para essa região (Figura II.6 e tabela II.5). Os haplótipos detectados para a região COI do DNA mitocondrial e suas respectivas localidades em que as amostras foram coletadas podem ser observados na tabela II.5.

Da mesma forma que foi observado no alinhamento para o gene *cytb*, podemos verificar que para COI existem vários haplótipos mitocondriais nas amostras que foram coletadas na área principal do estudo, em João Pessoa (área 1) (Figuras II.4 e II.6). Podemos observar também que alguns haplótipos foram encontrados em mais de uma localidade. As análises para o loco COI, embora com o menor número de amostras, uniu amostras de localidades separadas por longas distâncias (haplótipos 1, 4 e 5). Desta forma, os resultados indicam que parte da variação nucleotídica ocorre entre amostras da mesma localidade e parte entre amostras de localidades distantes. Uma estimativa mais consistente (F_{st} , por exemplo) não foi apresentada dado que os dados não são suficientes para tal.

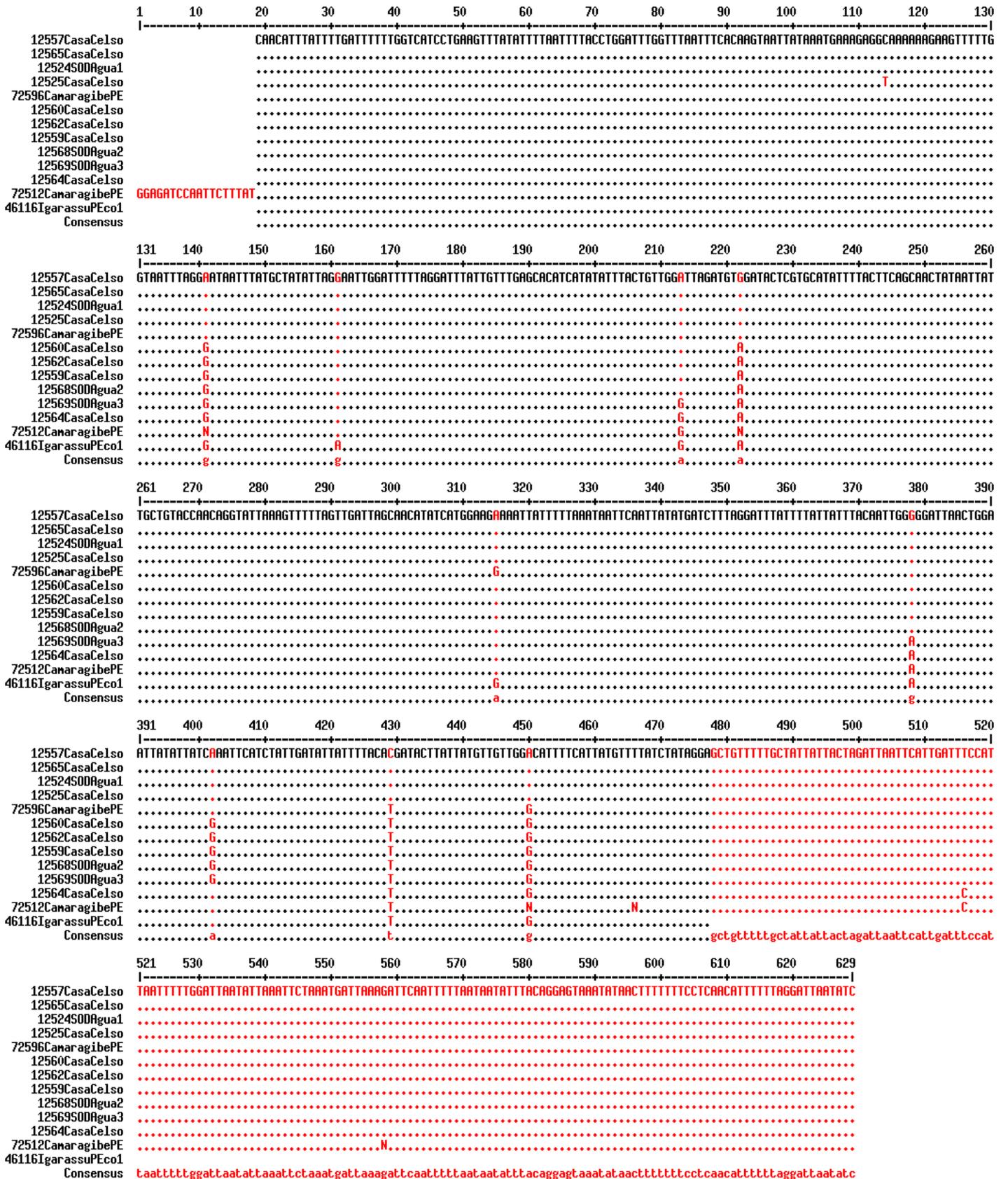


Figura II.4. Alinhamento entre seqüências obtidas para o gene COI. Na legenda, os números precedentes em cada amostra referem-se ao número da extração do material genético; JoaoPessoaPB = Área principal de monitoramento, em João Pessoa/PB; AlhandraPB = Sítio Olho D'água, em Alhandra/PB; CamaragibePE e IgarassuPE correspondem a amostras provenientes desses municípios, localizados no estado de Pernambuco.

3.4 Redes de haplótipos

Para cada uma das regiões de DNA mitocondrial analisadas (*cytb* e COI) foi construída uma rede de haplótipos utilizando todas as sequências analisadas para esse gene a fim de estimar as relações entre estas sequências.

Considerando que o caminho evolutivo que apresenta menor número de passos mutacionais é o mais provável de ocorrer, a rede de haplótipos mitocondriais mais parcimoniosa para cada um dos dois genes estudados foi obtida considerando: i) o haplótipo mais freqüente e de maior distribuição tem maior chance de ter originado outro do que um menos representado; ii) é mais provável que um haplótipo seja gerado por um evento de transição do que por evento de transversão.

Com os dados dos sítios polimórficos de 48 sequências das quatro localidades amostradas, foi investigada a distribuição em rede dos 13 haplótipos identificados para o gene mitocondrial *cytb*, a fim de verificar as relações entre eles. O mesmo foi feito para os sete haplótipos identificados para COI, utilizando-se dados das quatro localidades amostradas (Figuras II.5 e II.6).

Para facilitar a visualização dos resultados em ambas as redes de haplótipos, foram inferidos nomes aos haplótipos (Haplótipo 1, Haplótipo 2 e assim por diante). Ao lado do nome do haplótipo, entre parênteses, encontra-se o número de sequências (seq.) que apresentaram o referido haplótipo (Tabelas II.4 e II.5 e Figuras II.5 e II.6).

As redes de haplótipos ajudaram na visualização de que existem vários haplótipos mitocondriais, tanto para *cytb* quanto para COI, nas amostras que foram coletadas na área principal de estudo (área 1), ou seja, algumas amostras se agrupam, porém todas elas não correspondem a uma mesma unidade genética, conforme observado anteriormente no alinhamento dessas sequências. Algumas amostras de Pernambuco (as três amostras de Igarassu-PE), analisadas como “controle” neste estudo, apresentaram muitas substituições nucleotídicas em comparação com as demais, não se agrupando na rede de haplótipos para *cytb*.

Foi possível observar também que algumas amostras coletadas na área principal de estudo (área 1) apresentaram o mesmo haplótipo. Para a região *cytb*, os haplótipos 1, 7 e 11 foram compartilhados pelas amostras da área 1. Para a região COI, as amostras da área 1 também compartilharam haplótipos (haplótipo 1, 4 e 5). Contudo, esses haplótipos também foram detectados em amostras provenientes de outras duas localidades: área 2 (Alhandra-PB) e área 5 (Camaragibe-PE), as quais distam, respectivamente, 34Km e 97Km da área 1 (Tabela II.2).

Tabela II.4. Lista de haplótipos observados para o gene mitocondrial *cytb* e as suas respectivas localidades. Os números precedentes em cada amostra referem-se ao número da extração do material genético; JoaoPessoaPB = Área principal de monitoramento, em João Pessoa/PB; AlhandraPB = Sítio Olho D'água, em Alhandra/PB; CamaragibePE e IgarassuPE correspondem a amostras provenientes desses municípios, localizados no estado de Pernambuco.

HAPLÓTIPOS	AMOSTRA/LOCALIDADE
1	12565JoaoPessoaPB, 12525JoaoPessoaPB e 12557JoaoPessoaPB
2	46120IgarassuPE
3	46135IgarassuPE
4	12524AlhandraPB
5	12536 JoaoPessoaPB
6	72512CamaragibePE
7	12558JoaoPessoaPB, 12559JoaoPessoaPB e 12561JoaoPessoaPB
8	72596CamaragibePE
9	12568AlhandraPB
10	12569AlhandraPB
11	12556JoaoPessoaPB e 12562JoaoPessoaPB
12	12560JoaoPessoaPB
13	46125IgarassuPE, 46118IgarassuPE e 46116IgarassuPE

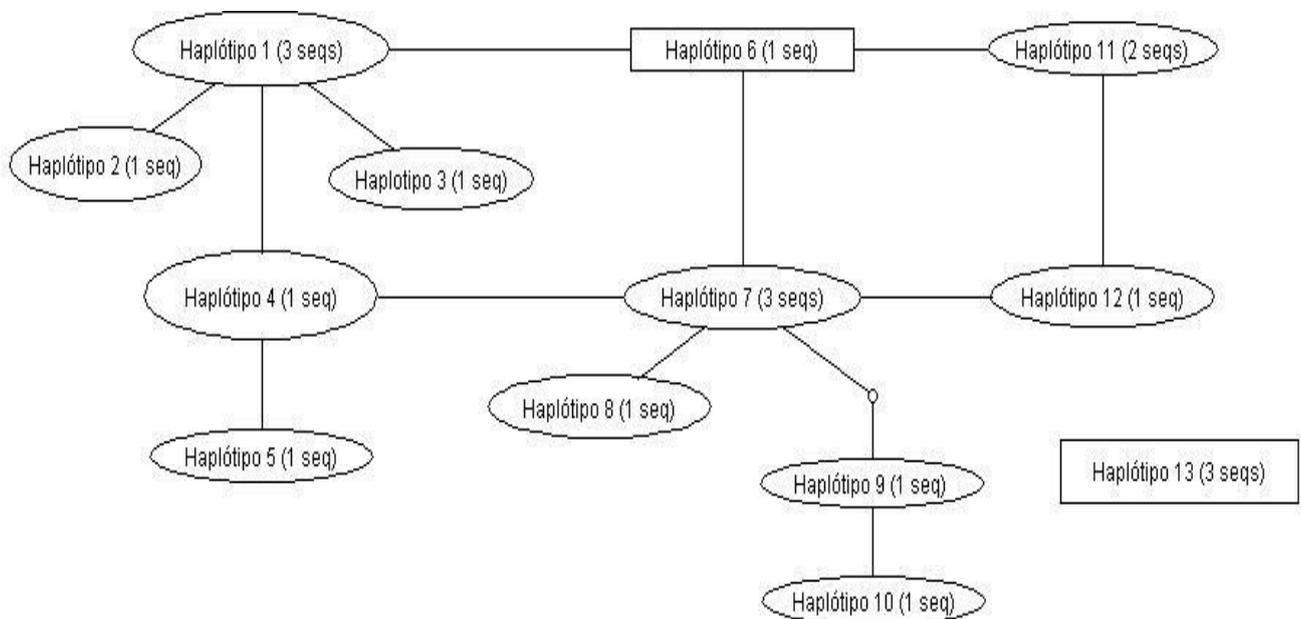


Figura II.5. Rede de haplótipos representando as relações entre os 13 haplótipos verificadas para o fragmento do gene *cytb* de *C flavifrons*. Entre parênteses se encontram o número de sequências verificadas para cada haplótipo. “Seq” indica seqüência.

Tabela II.5. Lista de haplótipos observados para o gene mitocondrial COI e as suas respectivas localidades. Os números precedentes em cada amostra referem-se ao número da extração do material genético; JoaoPessoaPB = Área principal de monitoramento, em João Pessoa/PB; AlhandraPB = Sítio Olho D'água, em Alhandra/PB; CamaragibePE e IgarassuPE correspondem a amostras provenientes desses municípios, localizados no estado de Pernambuco.

HAPLÓTIPOS	AMOSTRA/LOCALIDADE
1	12560JoaoPessoaPB, 12562JoaoPessoaPB, 12559JoaoPessoaPB e 12568AlhandraPB
2	12569AlhandraPB
3	72596CamaragibePE
4	12564JoaoPessoaPB e 72512CamaragibePE
5	12557JoaoPessoaPB, 12565JoaoPessoaPB e 12524AlhandraPB
6	12525JoaoPessoaPB
7	46116IgarassuPE

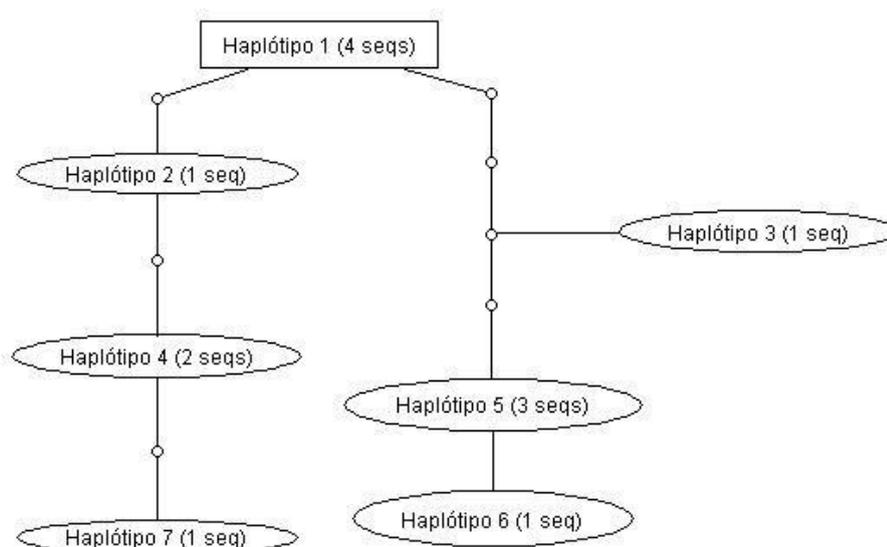


Figura II.6. Rede de haplótipos representando as relações entre os sete haplótipos verificadas para o fragmento do gene COI de *C flavifrons*. Entre parênteses se encontram o número de sequências verificadas para cada haplótipo. “Seq” indica seqüência.

4 DISCUSSÃO

As limitações dos estudos ecológicos comportamentais, através de observações diretas, não permitem que inúmeras questões sobre a biologia de uma espécie sejam respondidas, como a abrangência da área de nidificação utilizada pela espécie, seu processo de colonização e dispersão, por exemplo. Assim, os estudos moleculares, aliados aos comportamentais, podem ser promissores na tentativa de melhor compreender um determinado táxon.

Os únicos estudos acerca da espécie *C. flavifrons* são os de Vinson *et al.* (1997), Vinson & Frankie (1988) e Rêgo *et al.* (2006), os quais abordam aspectos sobre a biologia da nidificação da espécie; Vinson *et al.* (1996), abordando a ecologia química desta e de outras espécies; e o trabalho de Albuquerque & Rêgo (1989), ressaltando a eficiência do comportamento de polinização dessa espécie em flores do murici (*Byrsonima crassifolia*). Desta forma, estes são os primeiros dados acerca de características genéticas da espécie.

4.1 Material e período de coleta para *C. flavifrons*

Grande parte do material analisado neste trabalho foi coletada na área principal de estudo (área 1) ao longo do primeiro período de estudo de campo sobre o a biologia e comportamento de nidificação da espécie estudada. Isto aconteceu por quê as expedições de coleta para outras localidades ocorreram somente após o término desse período, o que corresponde ao início do período chuvoso na região, e, desta forma, os resultados dessas coletas não foram positivos.

Na expedição de coleta realizada à Granja Acerolândia, em Paudalho-PE, por exemplo, embora se tratando de uma grande área de plantação exclusiva de aceroleiras (*Malpighia emarginata*, as quais são bastante visitadas por *C. flavifrons* quanto à coleta de óleo), nenhum espécime foi avistado (registrado) na área pois nesse período não ocorreu a floração da aceroleira.

A inviabilidade de coleta após o período seco observada no presente trabalho constata que as atividades de *C. flavifrons* tornam-se bastante reduzidas após este período. Alguns trabalhos relacionados à biologia de nidificação de abelhas do gênero *Centris* também demonstram que esses organismos possuem maior atividade nos períodos secos, principalmente no segundo semestre do ano (AGUIAR *et. al.*, 2002; GAZOLA & GARÓFALO, 2002; JESUS & GARÓFALO, 2000; MADEIRA-DA-SILVA *et. al.*, 2002; MARTINS & VIANA,

2002). É nesse período que ocorrem os picos de floração de algumas espécies vegetais visitadas por Centridini (KRANZ & PASSINI, 1997).

Os 16 demais espécimes analisados, provenientes de outras áreas, apenas puderam ser tratados como referência ao longo deste trabalho, não sendo possível, portanto, efetuar estudos genéticos de caráter interpopulacional.

Como muitos dados sobre o a biologia e comportamento de nidificação da espécie foram obtidos no primeiro período de estudo, simultaneamente ao segundo período de nidificação (outubro/2011 a janeiro/2012), além da coleta de espécimes na área amostral principal, os esforços foram novamente voltados para a coleta de espécimes em outras localidades, nas quais foi obtido sucesso de coleta justamente por se tratar do período em que as abelhas ainda encontravam-se em atividade de nidificação. Três espécimes emergentes nas “gaiolas” utilizadas como armadilha, resultantes do primeiro período de nidificação na área principal. Todo esse material biológico encontra-se devidamente armazenado para que os estudos genéticos sejam continuados após o término do presente trabalho de Mestrado.

4.2 Extração e amplificação do DNA mitocondrial

As amplificações de amostras obtidas através dos dois protocolos de extração utilizados neste trabalho, por fenol-clorofórmio (SHEPPARD & MCPHERON, 1991) e por CHELEX® 100 (WALSH *et al.*, 1991), apresentaram bom rendimento para algumas amostras enquanto que para outras não foi obtido sucesso, em ambas as regiões de DNA mitocondrial analisadas (*cytb* e *COI*). Embora tenham sido realizadas diversas alterações no protocolo de extração e amplificação do DNA mitocondrial na tentativa de se obter uma metodologia padrão eficaz para o estudo de *C. flavifrons*, reduzindo a perda de amostras e, por conseqüência, de informações, as dificuldades técnicas ainda não foram identificadas.

Outro fato importante de ser mencionado aconteceu durante a realização deste estudo. Para algumas amostras que foram utilizadas o flagelo da antena, extraída em campo, com a abelha ainda viva, e conservada em álcool absoluto, como material para a extração de DNA, os resultados das amplificações via PCR mostraram-se negativos. No entanto, para outras amostras em que o material a ser extraído também foi o flagelo da antena conservada em álcool absoluto, porém extraída da abelha morta, em laboratório, os resultados das reações de amplificação foram positivos. Este fato sugere que alguma interferência ocorre quando parte da antena é retirada do espécime ainda vivo, o que implica reavaliar qual

metodologia de coleta deva ser a mais adequada para que os resultados desejados sejam obtidos.

Gould *et. al.* (2011) realizaram um estudo objetivando encontrar a melhor metodologia para a extração de DNA de abelhas, que resultassem em material com qualidade suficiente para se realizar as amplificações via PCR, também utilizando pouco material genético (pedaços das asas). Contudo, o material utilizado nestas metodologias foi proveniente de abelhas mortas, conservadas a – 80°C. Não foi especificado se estas metodologias teriam a mesma eficiência se empregadas em abelhas vivas e, por conseqüência, o grau de interferência que a mesma teria nas atividades dessas abelhas.

A importância de se ter uma metodologia padrão de coleta é evidente em estudos que associam comportamento, ecologia e genética, quando o material biológico a ser utilizado nas análises genéticas possível de ser coletado é escasso, de forma a manter o espécime vivo e sem prejudicar suas atividades, respeitando os outros objetivos do estudo. Ainda não foi chegada a alguma conclusão sobre a metodologia mais adequada, porém as experimentações continuarão a ser realizadas após o término deste trabalho.

4.3 DNA mitocondrial

Os alinhamentos e as redes de haplótipos construídas para os genes mitocondriais *cytb* e COI demonstraram a existência de vários haplótipos mitocondriais nas amostras que foram coletadas na área principal do estudo (área 1), em João Pessoa (JoaoPessoaPB). Esses dados sugerem que a colonização (fundações dos ninhos) nessa área foi realizada por diferentes linhagens maternas.

Estes dados permitem dizer que a colonização da área foi realizada por diferentes linhagens maternas, ou seja, um grupo de fêmeas não aparentadas, contradizendo assim a hipótese deste trabalho. Esta hipótese, de que a colonização de uma área é feita por um número reduzido de fêmeas, está sendo confirmada em várias espécies de abelhas da tribo Meliponini (FERREIRA, 2011; FERNANDES *et al.*, 2011). Contudo, as espécies estudadas por Ferreira (2011) e Fernandes *et al.* (2011) (*Partamona helleri* e *Partamona seridoensis*, respectivamente) são abelhas de pequeno tamanho corpóreo e que formam colônias com cerca de 1000 a 1500 indivíduos, o que pode estar relacionado com a forte tendência filopátrica observada nesses estudos, diferentemente do que foi observado para *C. flavifrons*, que possui tamanho corpóreo consideravelmente maior e comportamento solitário.

No entanto, vale ressaltar que dados preliminares produzidos no LGEH- UFSCar indicaram que a colonização de uma área do Campus USP de Ribeirão Preto foi realizada por

uma única linhagem materna de *Centris analis* (SILVA, 2010), ao contrário do que os resultados para *C. flavifrons* demonstraram. Ao estudar o gene COI dessa espécie, Silva (2010) não observou diferença entre as amostras estudadas, contudo, de acordo com o presente estudo sobre *C. flavifrons*, pôde-se observar que apenas o gene COI talvez não seja um marcador muito informativo, quando comparado com o gene *cytb*, apesar do menor número de amostras seqüenciadas para COI, pois algumas amostras seqüenciadas para ambos os genes foram agrupadas ou apresentaram o mesmo haplótipo na rede construída para COI, enquanto que, para *cytb*, elas foram agrupadas separadamente ou apresentaram substituições nucleotídicas que as diferenciaram. Portanto, os dados obtidos neste trabalho parecem indicar que a colonização de áreas por espécies de *Centris* pode ocorrer por mecanismos diversos.

Os dados de campo sobre a biologia e o comportamento de nidificação de *C. flavifrons* obtidos neste estudo sugerem uma tendência filopátrica na espécie, uma vez que, na área de estudo, os seus ninhos formam uma agregação. Este fato também foi observado nos estudos de Rêgo *et al.* (2006). A construção de ninhos de forma agregada é comum em muitos grupos de abelhas que nidificam no solo e sendo resultante da tendência filopátrica (MICHENER, 1974, 2007)

Outros dados de campo do presente estudo também reforçam a existência da filopatria: muitas fêmeas marcadas na área de estudo foram reavistadas fazendo mais de um ninho na mesma área; muitas abelhas fundaram seus novos ninhos próximos aos seus ninhos antigos; comportamento de “disputa do território”, caracterizados por vôos agonísticos entre fêmeas que nidificavam próximas umas das outras.

Além disso, são duas as características principais que determinam a permanência e a estrutura das comunidades de abelhas em um ambiente: os caracteres florais e a disponibilidade de locais para a nidificação (POTTS *et al.*, 2005). A diminuição de ambientes naturais, em consequência do contínuo crescimento da população humana, tem levado inúmeras espécies a habitar áreas urbanizadas. López-Urbe *et al.* (2008), ao estudar abelhas da tribo Euglossini, demonstraram que muitas espécies são ainda mais abundantes nas cidades do que em ambientes conservados, devido a maior disponibilidade de recursos o ano inteiro (devido ao cultivo de muitas espécies vegetais) e substrato para nidificação. É possível que a permanência dessas abelhas e, neste caso, de *C. flavifrons*, em ambientes urbanizados também se deva a uma possível tendência filopátrica.

Contudo, os dados aqui apresentados não são conclusivos sobre filopatria para a *C. flavifrons*, uma vez que os dados genéticos afirmam a colonização de uma área por várias linhagens maternas, enquanto os dados comportamentais sugerem a filopatria. É preciso considerar a filopatria sob uma questão conceitual, uma vez que a área de nidificação da

espécie pode ser mais ampla do que se tenha inferido, pois, mesmo tendo sido amostrada uma agregação de fêmeas não aparentadas que se agregam, essas podem ter algum comportamento filopátrico embutido nisto. A filopatria acentuada observada por Ferreira (2011) e Fernandes *et al.* (2011) resulta em uma dispersão sexo-assimétrica para essas espécies de *Partamona*, uma vez que as fêmeas apenas colonizam a área, enquanto os machos promovem o fluxo gênico entre essas colônias. Se considerarmos a filopatria em um sentido mais amplo, abrangendo uma área maior de nidificação maior, é possível levantar a hipótese de que a dispersão sexo-assimétrica pode não ocorrer em *C. flavifrons*.

No entanto, para a elucidação dessas questões, estudos de campo associados a estudos genéticos utilizando-se marcadores mitocondriais, e também nucleares (herança biparental), necessitam ser continuados.

Pudemos observar também que alguns haplótipos foram obtidos em amostras de mais de uma localidade. As análises para o loco COI uniram amostras de localidades separadas por longas distâncias (até 97Km de distância), porém, o mesmo não ocorreu para *cytb* com relação às mesmas amostras. Dessa forma, considerando a estrutura do DNA mitocondrial e de que ambos são herdados juntos, as amostras não são aparentadas.

Algumas amostras controle, provenientes do estado de Pernambuco (as três amostras de Igarassu), apresentaram muitas substituições nucleotídicas em comparação com as demais e não se agruparam na rede de haplótipos para *cytb*. Para este gene, este fato sugere um novo padrão de DNA mitocondrial, levando à suposição destas três amostras pertencerem a outra espécie. Vale salientar que muitas revisões taxonômicas ao nível de espécie têm incluído análises de divergência do DNA mitocondrial. (AVISE & ZINK, 1988; BANKS *et al.* 2003). No entanto, para verificação desta hipótese, obviamente, serão necessários estudos adicionais.

II REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, C. M. L. **Ecologia e comportamento de nidificação de abelhas solitárias (Hymenoptera, Apoidea) em áreas de caatinga e floresta estacional semi-decídua (Bahia, Brasil), com ênfase em espécies do gênero *Centris* Fabricius, 1804 (Apidae, Centridini)**. Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- AGUIAR, A. J. C. & MARTINS, C. F. 2002. Abelhas e vespas solitárias em ninhos-armadilha na Reserva Biológica Guaribas (Mamanguape, Paraíba, Brasil). **Revta. bras. Zool.**, **19** (Supl.):101-116.
- ALBUQUERQUE, P. M. C. & REGO, M. M. C. 1989. Fenologia das abelhas visitantes de murici (*Byrsonima crassifolia*, Malpighiaceae). **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, sér. Zool.**, **5** (2): 163-178.
- ALVES D. A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; FRANCOY, T. M.; SANTOS-FILHO, P. S.; NOGUEIRA-NETO, P.; BILLEN, J. & WENSELEERS, T. 2009. **Mol. Ecol.**, **18**: 4102-4111.
- ANTONINI, Y. & MARTINS, R.P. 2003. The Value of a Trees Species (*Caryocar brasiliense*) for a Stingless Bee *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*. **J. Insect Conserv.**, **7**:167-174.
- ARIAS, M. C.; FRANCISCO F. O. & SILVESTRE, D. O. 2003. DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos; In G. A. R. Melo & I. Alves-dos-Santos, **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Editora UNESC, Criciúma.
- AVISE, J. C. 2004. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. 2nd Edition. Sinauer, Sunderland.
- AVISE, J. C. & ZINK, R. M. 1988. Molecular genetic divergence between avian sibling species: King and Clapper rails, Long-billed and Short-billed dowitchers, Boated-tailed and Great-tailed grackles, and Tufted and Black-crested titmice. **The Auk**, **105**: 516–528.
- BANKS, R. C.; CICERO, C.; DUNN, J. L.; KRATTER, A. W.; RASMUSSEN, P. C.; REMSEN, J. V. Jr.; RISING, J. D. & STOTZ, D. F. 2003. Forty-fourth Supplement to the American Ornithologists' Union Check-list of North American Birds. **The Auk**, **120**: 923-931.

- BOUZAT, J. L.; CHENG, H. H.; LEWIN, H. A.; WESTEMEIER, R. L.; BRAWN, J. D. & PAIGE, A. K. N. 1998. Genetic Evaluation of a Demographic Bottleneck in the Greater Prairie Chicken. **Conserv. Biol.**, **12** (4): 836-843.
- BROUAT, C.; CHEVALLIER, H.; MEUSNIER, S; NOBLECOURT, T. & RASPLUS, J. Y. 2004. Specialization and Habitat: Spatial and Environmental Effects on Abundance and Genetic Diversity of Forest Generalist and Specialist *Carabus* Species. **Mol. Ecol.**, **13**: 1815-1826.
- BUCHMANN., L. 1987. The ecology of oil flowers and their bees. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, **18**: 343-369.
- CAMERON, S. A.; MARDULYN, P. 2001. Multiple molecular data sets suggest independent origins of highly eusocial behavior in bees (Hymenoptera: Apinae). **Systematic Biology**, **50**(2): 194–214.
- CAMERON, S. A. & MARDULYN, P. 2003. The major opsin gene is useful for inferring higher level phylogenetic relationships of the corbiculate bees. **Mol. Phylogenet. Evol.**, **28**: 610-613.
- CAMERON, S. A. & WILLIAMS, P. H. 2003. Phylogeny of bumble bees in the New World subgenus *Fervidobombus* (Hymenoptera: Apidae): congruence of molecular and morphological data. **Mol. Phylogenet. Evol.**, **28**: 552-563.
- CANE, J. H. 2001. Habitat fragmentation and native bees: a premature verdict? **Conservation Ecology** **5**(1): 3. [online] URL: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art3/>
- CANE, J.H.; MINCKLEY, R.L.; KERVIN L.J.; ROULSTON T. H. & WILLIAMS N. M. 2005. Complex responses within a desert bee guild (Hymenoptera: Apiformes) to urban habitat fragmentation. **Ecological Applications** **16** (2): 632-644. 2005.
- CHAPMAN, R. E.; WANG, J. & BOURKE, A. F. G. 2003. Genetic analysis of spatial foraging patterns and resource sharing in bumble bee pollinators. **Mol. Ecol.**, **12**: 2801-2808.
- CLEMENT, M.; POSADA, D. & CRANDALL, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies (version 1.21). **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1657-1659.
- COSTA, M. A.; DEL LAMA, M. A.; MELO, G. A. R. & SHEPPARD, W. S. 2003. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. **Apidologie**, **34**: 73-84.

- DANFORTH, B. N.; NEFF, J. L. & BARRETO-KO, P. 1996. Nestmate relatedness in a communal bee, *Perdita texana* (Hymenoptera: Andrenidae), based on DNA fingerprinting. **Evolution**, **50**: 276-284.
- DARVILL, B.; PEAT, J; ELLIS, J & GOULSON, D. 2004. Effects of climate on intra- and interspecific size variation in bumble-bees. **Functional Ecol.**, **19**: 145-151.
- DICK, C. W.; ROUBIK, D. W.; GRUBER, K. F. & BERMINGHAM, A. 2004. Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. **Mol. Ecol.**, **13**: 3375-3785.
- FERNANDES, C. R. M.; MARTINS, C. F.; FERREIRA, K. M.; LAMA, M. A. 2011. Gene Variation, Population Differentiation, and Sociogenetic Structure of Nests of *Partamona seridoensis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Biochemical Genetics**, **49**: 001-009.
- FERNANDES-SALOMÃO, T. M; ROCHA, R. B; CAMPOS, L. A. O & ARAÚJO, E. F. 2004. The First Internal Transcribed Spacer (ITS-1) of *Melipona* Species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Characterization and Phylogenetic Analysis. **Insect. Soc.**, **52**: 11-18.
- FERREIRA, K. M. 2011. **A colonização de uma área por espécies de abelhas sem ferrão.** Um Estudo de Caso: a ocupação do Campus da Ufscar (São Carlos, SP) por *Partamona helleri* Friese, 1990 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.
- FRANKIE, G. W.; VINSON, S. B. & WILLIAMS, H. 1989. **Ecology and evolutionary sorting of 12 sympatric species of *Centris* bees in Costa Rican dry forest.** In J. H. Bock and Y. B. Linhart (Eds.). The evolutionary ecology of plants. Westview Press, Boulder, Colorado.
- FRANKIE, G. W.; THORP, R. W.; SCHINDLER, M.; HERNANDEZ, J.; ERTTER, B. & RIZZARDI, M. 2005. Ecological patterns of bees and their host ornamental flowers in two northern California cities. **J. Kans. Entomol. Soc.** **78**: 227-246.
- FREITAS, M. L. M; AUKAR, A. P. A; SEBBENN, A. M & MORAES, E. G. M. 2005. Variabilidade Genética Intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. Por Marcador AFLP. **Scientia Forestalis**, **68**: 21-28.
- FETRIDGE, E. D.; ASCHER, J. S. & LANGELLOTTO, G. A. 2008. The Bee Fauna of Residential Gardens in a Suburb of New York City (Hymenoptera: Apoidea). **Entomol. Soc. Am.** **101(6)**: 1067-1077

- GAZOLA, A. L.; GARÓFALO, C. A. Mortalidade e razão sexual em *Centris (Heterocentris) analis* (Hymenoptera, Apidae, Centridini). In: Encontro Sobre Abelhas, 5., 2002, Ribeirão Preto. **Anais do V Encontro Sobre Abelhas**. Ribeirão Preto: 2002. p. 265.
- GOULD, E. M.; TAYLOR, M. A. HOLMES, S. J. 2011. A more consistent method for extracting and amplifying DNA from bee wings. **Apidologie**. * INRA, DIB-AGIB and Springer Science+Business Media B.V. DOI: 10.1007/s13592-011-0077-x
- GOUDET, J. 1995. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). **J. Heredity**, **86** (6):485-486.
- 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.
- HALL, H. G. & SMITH, D. R. 1991. Distinguishing African and European honeybee matrillines using amplified mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: 4548-4552.
- HAMILTON, M. B.; PINCUS, E. L.; DI FIORE, A. & FLEISCHER R. C. 1999. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. **BioTechniques**, **27**: 500-507.
- HARTL, D. L. 2008. **Princípios de Genética de População**. Editora FUNPEC, São Paulo. 217p.
- HUTCHINSON, D. W. & TEMPLETON, A. R. 1999. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. **Evol.**, **53**: 1898-1914.
- JESUS, B. M. V.; GARÓFALO, C. A. Nesting behaviour of *Centris (Heterocentris) analis* (Fabricius) in southeastern Brazil (Hymenoptera, Apidae, Centridini). **Apidologie**, v. 31, p. 503-515. 2000.
- JOHANNSEN, J.; VEITH J. M.; NICKLAS-GÖRGEN, B.; SCHMELLER, D.; SCHWING, U. & SEITZ, A. 1996. Genetics of insect populations in fragmented landscapes - A comparison of species and habitats. In: Settele J., Margules Ch., Poschlod P. and Henle K.: **Species survival in fragmented landscapes**. Kluwer Academic Publishers, 344-355.
- KNIGHT, M. E.; MARTIN, A. P.; BISHOP, S.; OSBORNE, J. L. HALE, R. J.; SANDERSON R. A. & GOULSON, D. 2005. An interspecific comparison of foraging range and nest density of four bumblebee (*Bombus*) species. **Mol. Ecol.**, **14**:1811-1820.

- KRANZ, W. M.; PASSINI, T. **Amarelinho**: biologia e controle. Instituto Agronômico do Paraná. 1997.
- KRAUSS, J.; SCHMITT, T.; SEITZ, A. STEFFAN-DEWENTER, I & TSCHARNTKE, T. 2004. Effects of habitat fragmentation on the genetic structure of the monophagous butterfly *Polyommatus coridon* along its northern range margin. **Mol. Ecol.**, **13**: 311-320.
- KRAUS, F. B.; WEINHOLD, S. & MORITZ, R. F. A. 2008. Genetic structure of drone congregations of the stingless bee *Scaptotrigona mexicana*. **Insect. Soc.**, **55**: 22-27.
- KUKUK, P. F. & SAGE, G. K. 1994. Reproductivity and relatedness in a communal lalictine bee *Lasioglossum (Chilalictus) hemechalceum*. **Insect. Soc.**, **41**(4): 443-455.
- LACY, R. C. 1992. The effects of inbreeding on isolated populations: are minimum viable population sizes predictable? pp. 277 - 296. *In*: P. L. Fiedler & S. K. Jain (eds.), **Conservation Biology**. The Theory and Practice of Conservation. Preservation and Management. Chapman and Hall, NY.
- LANDE, R. & BARROWCLOUGH, G. 1987. Effective Population Size, Genetic Variation, and their Use in Population Management. Viable Populations for Conservation. Edited by Michael E. Soulé. **Cambridge University Press**. 87-123.
- LAURANCE, W. F.; LOVEJOY, T. E.; VASCONCELOS, H. C.; BRUNA, E. M.; DIDHAM, R. K.; STOUFFER, P. C.; GASCON, C.; BIERREGAARD, R. O.; LAURANCE, G. S & SAMPAIO, E. 2002. Ecosystem Decay of Amazon Forests Fragmentation: a 22 Year Investigation. **Conservation Biology**, 16(3):605-618.
- LÓPEZ-UBIBE, 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, São Carlos.
- MADEIRA-DA-SILVA, M. C.; CAMAROTTI-DE-LIMA, M. F.; MARTINS, C. F.; AGUIAR, A. J. C. Agregação de ninhos de *Centris flavifrons* (Fabricius, 1775) (Hymenoptera: Apidae) em área urbana de João Pessoa, Paraíba. *In*: Encontro Sobre Abelhas, 5., 2002, Ribeirão Preto. **Anais do V Encontro Sobre Abelhas**. Ribeirão Preto: 2000. p. 303.
- MARTIS, P. D. D.; VIANA, B. F. Nidificação de *Centris (Heterocentris) analis* (Hymenoptera, Anthophoridae) em ninhos-armadilhas, em fragmentos de mata secundária, Salvador,

- Bahia. In: Encontro Sobre Abelhas, 5., 2002, Ribeirão Preto. **Anais do V Encontro Sobre Abelhas**. Ribeirão Preto: 2002. p. 304.
- MATTESON, K. C.; ASCHER, J. S.; LANGELLOTTO, G. A. 2008. Bee richness and abundance in New York City urban gardens. **Annals of the Entomological Society of America** **101 (1)**: 140-150.
- McINTYRE, N. & HOSTETLER, M. E. 2001. Effects of urban land use on pollinator (Hymenoptera: Apoidea) communities in a desert metropolis. **Basic Appl. Ecol.** **2**: 209–218.
- MICHEL-SALZAT, A.; CAMERON, S. A. & OLIVEIRA, M. 2004. Phylogeny of the orchid bees. **Mol. Phylogenet. Evol.**, **32**: 309-323.
- MICHENER, C. 1974. **The social behavior of the bees**: A comparative study. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press, 404p.
- MICHENER, C. 2007. **The bees of the world**. 2nd. ed. Baltimore, Johns Hopkins University Press, 953p.
- MORATO, E.; GARCIA, M. V. B. & CAMPOS, L. A. O. 1999. Biologia de *Centris Fabricius* (Hymenoptera, Anthophoridae, Centridini) em matas contínuas e fragmentos na Amazônia Central. **Revta. Bras. Zool.** **16**: 1213 – 1222.
- MURPHY, R. W.; SITES, J. W.; BUTH, Jr., D. G. & HAUFLER, C. H. 1990. Proteins I: isozym electrophoresis In: HILLIS, D. M. & MORITZ, C. 1990. **Molecular systematics**. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- OLIVEIRA, F. F. 2002. **Diversidade Genética de Populações da Abelha Sem Ferrão *Plebeia remota*: Análise do DNA Mitocondrial e Microsatélites**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Biologia.
- PAXTON, R. J. 2000. Genetic structure of colonies and a male aggregation in the stingless bee *Scaptotrigona postica*, as revealed by microsatellite analysis. **Insect. Soc.**, **47**: 63-69.
- PAXTON, R. J.; THORÉN, P. A.; TENGÖ, T. J., ESTOUP, A. & PAMILO, P. 1996. Mating structure and nestmate relatedness in a communal bee, *Andrena jacobi* (Hymenoptera, Andrenidae), using microsatellites. **Mol. Ecol.**, **5**: 511-519.

- POTTS, S. G.; VULLIAMY, B.; ROBERTS, S.; O' TOOLE, C.; DAFNI, A.; NE'EMAN, G. & WILLMER, P. 2005. Role of Nesting, Resources in Organizing Diverse Bee Communities in a Mediterranean Landscape. **Ecol. Entomol.**, **30**: 78-85.
- PRIMACK, R. B. & RODRIGUES, E. 2001. Biologia da conservação. Ed. Planta, Londrina. 328 p.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M. & DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, **155**: 945–959.
- QUELLER, D. C. & GOODNIGHT, K. F. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. **Evol.**, **43**: 258-275.
- RAND, D. M.; DORFSMAN, M. & KANN, L. M. Neutral and nonneutral evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. **Genetics**, **138**: 741–756.
- RAMBALDI, D. M. & OLIVEIRA, D. A. S (orgs.). 2003. **Fragmentação de Ecossistemas: Causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas**. Brasília: MMA/SBF. 510 p.
- RASMUSSEN, C. & CAMERON, S. A. 2010. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance and long distance dispersal. **Biol. J. Linn. Soc.**, **99**: 206-232.
- RAYMOND, M.; & ROUSSET, F. 1995. Genepop (version 3.4), population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J. Heredity**, **86**: 248-249.
- RÊGO, M. M. C. & ALBUQUERQUE, P. M. C. 1989. Comportamento das abelhas visitantes de murici, *Byrsonima crassifolia* (L.). Kunth, Malpighiaceae. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, sér. Zool.** **5**: 179-193.
- RÊGO, M. C. M.; ALBUQUERQUE, P. M. C.; RAMOS, M. C. & CARREIRA, L. M. 2006. Aspectos da biologia de nidificação de *Centris flavifrons* (Friese) (Hymenoptera: Apidae, Centridini), um dos principais polinizadores do murici (*Byrsonima crassifolia* L. Kunth, Malpighiaceae), no Maranhão. **Neotrop. Entomol.**, **35** (5): 579-587.
- SHEPPARD, W. S.; MCPHERON, B. A. 1991. Ribosomal DNA diversity in Apidae. In: Smith DR (ed.) **Diversity in the genus Apis**. Westview Press, Boulder: 89-102.
- SILVA, C.H. 2010. Estrutura sociogenética intranidal e estrutura populacional de *Centris* (*Heterocentris*) *analis* Fabricius 1804 e *Centris* (*Hemisiela*) *tarsata* Smith 1874

(Hymenoptera: Apidae). Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Entomologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP.

- VINSON, S. B. & FRANKIE, G. W. 1977. Nest of *Centris aethyctera* (Hymenoptera: Apoidea: Anthophoridae) in the dry forest of Costa Rica. **J. Kansas Entomol. Soc.** **50**: 310 - 311.
- VINSON, S. B. & FRANKIE, G. W. 1988. A comparative study of the ground nests of *Centris flavifrons* and *Centris aethiocesta* (Hymenoptera: Anthophoridae). **Entomol. Exp. Appl.**, **49**: 181-187.
- VINSON, S. B.; FRANKIE, G. W. & WILLIAMS, H. J. 1996. Chemical ecology of the genus *Centris* (Hymenoptera: Apidae). **Fla. Entomol.**, **79**: 109-129.
- VINSON, S. B.; WILLIAM, H. J.; FRANKIE, G. W. & SHRUM, G. 1997. Floral lipid chemistry of *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae) and a use of floral lipids by *Centris* bees (Hymenoptera: Apidae) **Biotropica**, **29**: 76-83.
- VOGEL, S. & MACHADO, I. C. S. 1991. Pollination of four sympatric species of *Angelonia* (Scrophulariaceae) by oil-collecting bees in NE, Brasil. **Pl. Syst. Evol.**, **178**: 153-178.
- WALDSCHMIDT, A. M; LOPES, L. A; MARCO JR, P. & CAMPOS, L. A. O. 2005. Genetics of Euglossini Bees (Hymenoptera) In Fragments of the Atlantic Forest In the Region of Viçosa, MG. **Braz. J. Biol.**, **65 (3)**: 541-549.
- WALSH P. S., METZGER D. A. & HIGUCHI R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Bio.Tech.**, **10**: 506–513.
- ZANETTE, L. R. S.; MARTINS, R.P. & RIBEIRO, S.P. Effects of urbanization on Neotropical wasp and bee assemblages in a Brazilian metropolis. **Landscape and Urban Planning** **71**: 105-121. 2005.
- ZAYED, A. 2004. Effective population size in Hymenoptera with complementary sex determination. **Heredity** **93**: 627-630.
- ZAYED, A. & PACKER, L. 2002. Genetic differentiation across a behavioural in a primitively eusocial bee, *Halictus poeyi* Lepelletier (Hymenoptera, Halictidae). **Insect. Soc.**, **49**: 282-288.

ZIMMERMANN, Y.; ROUBIK, D. W.; QUEZADA-EUÁN, J. J. G.; PAXTON, R. J.; ELTZ, T.
2009. Single mating in orchid bees (Euglossa, Apinae): implications for mate choice and social evolution. **Insect. Soc.**, **56**: 241-249.