

INTERAÇÕES COM PLANTAS E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Epicharis nigrata (Friese) (Hymenoptera: Apidae) EM AREAS DE RESTINGAS

ULLI BARROS OLIVEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO DE 2018

INTERAÇÕES COM PLANTAS E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Epicharis nigrita (Friesse) (Hymenoptera: Apidae) EM ÁREAS DE RESTINGA

ULLI BARROS OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Dra. Maria Cristina Gaglianone

Coorientadora: Dra. Silvia Helena Sofia

Campos dos Goytacazes – RJ

Fevereiro de 2018

INTERAÇÕES COM PLANTAS E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Epicharis nigrita (Friesse) (Hymenoptera: Apidae) EM ÁREAS DE RESTINGA

ULLI BARROS OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos e Naturais.

Aprovado em 30/10/19

Comissão Examinadora:




Solange Cristina Augusto (Doutora em Entomologia) - UFU



Ana Maria Matoso Viana Bailez (Doutora em Biologia do Comportamento) - UENF



Maura da Cunha (Doutora em Ciências Biológicas (Biofísica)) - UENF



Sílvia Helena Sofia (Doutora em Ciências Biológicas (Zoologia)) - UEL (Coorientadora)



Maria Cristina Gaglianone (Doutora em Entomologia) - UENF (Orientadora)

Dedico à minha mãe Helena.

“A razão é um apoio fundamental à minha crença, é um imenso suporte à minha fé. Como cientista, examino os fatos e, baseado neles, formulo raciocínios, alguns testáveis, outros não, pois nem tudo é Ciência” (Paulo Nogueira Neto).

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Laboratório de Ciências Ambientais (LCA) pelo apoio logístico para a realização deste trabalho.

À Prof^a. Dra. Maria Cristina Gaglianone pela orientação, confiança, paciência, ajuda nos campos, a concessão de amostras e grande oportunidade para a realização deste trabalho.

À Prof^a. Dra. Silvia Helena Sofia pela coorientação e por me receber tão bem no Laboratório de Genética e Ecologia Aniamal (LAGEA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) para a realização das análises genéticas.

À Dra. Lenice Shibatta do LAGEA por toda ajuda, ensinamento e paciência durante a realização das análises genéticas.

Aos demais integrantes do LAGEA pelo apoio durante os dias que estive na UEL.

Às Profas. Dra. Vânia Esteves e Dra. Cláudia Barbieri do Museu Nacional/UFRJ pela confirmação da identificação dos tipos polínicos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao ICMBIO pela autorização de estudo e coleta na área de restinga do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba.

Ao IEMA-ES pela autorização de estudo e coleta nas áreas de restinga do Parque Estadual de Itaúnas e Parque Estadual Paulo César Vinha.

A Prumo Logística pela autorização de estudo e coleta na Reserva Particular do Patrimônio Natural Caruara.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo financiamento do projeto à orientadora.

Aos membros da banca Dra. Solange Cristina Augusto, Dra. Maura da Cunha e Dra. Ana Maria Matoso Viana Bailez por aceitarem o convite e pelas contribuições.

Ao técnico Gerson Rocha pelo auxílio no campo.

À minha família pelo amor incondicional e por acreditar que seria capaz de chegar até aqui.

Às minhas amigas de longa data Elizabeth Rabelo, Driely Carvalho e Thamires Pain pelas amizade verdadeira e consolo durante os momentos difíceis.

Aos meus amigos Cássio Ferreira e Thalyta Nogueira por serem os melhores amigos que alguém poderia ter.

Aos amigos da república Mansão Foster Carlos Henrique, Denner Freire, Gabriel Boaventura, Gabriel Cyrino, Gabriel Marone, Gabriel Oliveira, Marcelo Ferreira, Marcos Vinícius, Matheus Vidal, Pedro Folgosi, Rafael Sanches, Ramírez Acruche, Raphael Félix e Thauan Barbosa por tornarem os meus dias mais felizes.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Ecologia de Abelhas e Polinização Anna Pazini, Carolina Rabelo, Caique Barcelos, Ellen Lima, Fernanda Werneck, Fernanda Del-Penho, Maira Coelho, Mariana Scaramussa, Marcelita França e Sônia Guimarães pelos ensinamentos e palavras de incentivo.

Agradeço à Deus, pois minha fé me manteve firme e me fez acreditar que seria capaz de realizar este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1 - Recursos polínicos utilizados por <i>Epicharis nigrita</i> (Friese, 1900) em áreas de restinga.....	9
1.1- INTRODUÇÃO.....	9
1.2- OBJETIVO.....	11
1.3- METODOLOGIA.....	11
1.3.1- Área de estudo.....	11
1.3.2- Coleta de dados.....	14
1.3.2.1- Amostragem das abelhas.....	14
1.3.2.2- Obtenção das amostras do conteúdo polínico.....	16
1.3.3- Análises de dados.....	17
1.4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
1.4.1- Principais fontes polínicas utilizadas por <i>Epicharis nigrita</i>	18
1.4.2- Uso de recursos florais ao longo de um gradiente de restinga.....	22
CAPÍTULO 2- Diversidade genética de <i>Epicharis nigrita</i> (Friese, 1900) em áreas de restinga.....	31
2.1- INTRODUÇÃO.....	31
2.2- OBJETIVO.....	32
2.3- METODOLOGIA.....	32
2.3.1- Área de estudo.....	32
2.3.2- Obtenção de amostras para análises genéticas.....	32
2.3.3- Extração de DNA.....	33
2.3.4- Amplificação e sequenciamento.....	33
2.3.5- Análises de dados.....	35
2.4- RESULTADOS	35
2.5- DISCUSSÃO.....	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
Apêndice I - Tipos polínicos amostrados das fêmeas de <i>Epicharis nigrita</i> no litoral dos estados do Rio de Janeiro (RJ) e Espírito Santo (ES), Brasil.....	48
Apêndice I - Eletroferograma da região <i>CytB</i> em <i>Epicharis nigrita</i>	49
Apêndice II - Eletroferograma da região 16S1 de <i>E. nigrita</i> , com elevado grau de picos duplos.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Localização geográfica dos remanescentes de restinga: Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Caruara (RPPN Caruara), Restinga de Praia das Neves (RPN), Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV) e Parque Estadual de Itaúnas (PEI)..... 11

Figura 1.2 - Vista aérea dos remanescentes de restinga: **(A)** Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), **(B)** Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Caruara (RPPN Caruara), **(C)** Restinga de Praia das Neves (RPN), **(D)** Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV) e **(E)** Parque Estadual de Itaúnas (PEI)..... 14

Figura 1.3 - **(A)** Coleta de *Epicharis nigrita* com rede entomológica em flores de *Byrsonima sericea*, **(B)** Inflorescência de *Byrsonima sericea*, **(C)** Flor de *Byrsonima sericea* e **(D)** Flor de *Byrsonima sericea* com destaque para os elaiófaros..... 15

Figura 1.4 - Abundância relativa de tipos polínicos nas escopas de *Epicharis nigrita*, em sequência dos tipos mais abundantes, nas cinco áreas estudadas. Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Caruara (RPPN Caruara), Restinga de Praia das Neves (RPN), Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV) e Parque Estadual de Itaúnas (PEI)..... 22

Figura 1.5 - Curva de rarefação, com desvio padrão, representando a riqueza dos tipos polínicos nas cinco áreas estudadas. Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Caruara (RPPN Caruara), Restinga de Praia das Neves (RPN), Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV) e Parque Estadual de Itaúnas (PEI)..... 24

Figura 1.6 - Dendrograma representativo da similaridade (índice de Bray Curtis) entre as cinco áreas estudadas. Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Caruara (RPPN Caruara), Restinga de Praia das Neves (RPN), Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV) e Parque Estadual de Itaúnas (PEI)..... 25

Figura 1.7 - Rede qualitativa de interações das cinco áreas estudadas. Os tipos polínicos estão representados por T1 a T26 com as identificações indicadas na tabela 1. Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Caruara (RPPN Caruara), Restinga de Praia das Neves (RPN), Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV) e Parque Estadual de Itaúnas (PEI)..... 25

Figura 2.1 - Resultado do BLAST demonstrando sequências similares..... 36

Figura 2.2 - Rede de haplótipos observados em *E. nigrita*. O tamanho dos círculos refere-se à frequência de cada haplótipo. Número entre os haplótipos indicam apenas um passo mutacional e a posição da mutação.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Composição, abundância relativa (AR) e frequência de ocorrência (FO) dos tipos polínicos encontrados nas escopas de <i>Epicharis nigrita</i> nas cinco áreas estudadas.....	12
Tabela 1.2 - Distância entre as áreas de amostragem de <i>Epicharis nigrita</i> ao longo do gradiente do litoral dos estados do Rio de Janeiro (RJ) e Espírito Santo (ES).....	12
Tabela 1.3 - Riqueza e diversidade dos tipos polínicos nas cinco áreas estudadas.....	21
Tabela 1.4 - Riqueza e diversidade dos tipos polínicos nas escopas de fêmeas de <i>Epicharis nigrita</i> , amostradas em cinco áreas de restinga nos estados do RJ e ES. Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Caruara (RPPN Caruara), Restinga de Praia das Neves (RPN), Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV) e Parque Estadual de Itaúnas (PEI).....	23
Tabela 1.5 - Relação entre o nível de degradação e a riqueza dos tipos polínicos nas escopas de <i>Epicharis nigrita</i> amostradas em quatro áreas de restinga nos estados do RJ e ES. Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Caruara (RPPN Caruara), Restinga de Praia das Neves (RPN) e Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV).....	26
Tabela 2.1 - <i>Primers</i> utilizados por PCR de genes mitocondriais	34
Tabela 2.2 - Sítios polimórficos em parte do gene 16S de <i>E. nigrita</i>	37
Tabela 2.3 - Número de indivíduos analisados, número de haplótipos, diversidade haplotípica e nucleotídica de cinco populações de <i>E. nigrita</i>	38
Tabela 2.4 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) e variância de frequência genética (Φ_{ST}) mostrando a porcentagem de variação entre e dentro de populações. * Valores não significativos ($P < 0,05$).....	39
Tabela 2.5 - Diferenciação genética par a par entre cinco populações de <i>E. nigrita</i> . Valores de Φ_{ST} obtidos, por meio da AMOVA. *Valors não significativos ($P < 0,05$).....	39

RESUMO

As restingas da costa brasileira vêm sofrendo há várias décadas um crescente processo de fragmentação. A fragmentação causa grandes modificações nas interações mutualísticas e pode levar à redução no tamanho das populações de polinizadores e na sua diversidade genética, ameaçando a diversidade biológica. *Epicharis nigrita* é uma espécie de abelha que apresenta estreita relação com plantas que possuem estruturas florais secretoras de óleo. Estas plantas são importantes componentes da flora das restingas, tornando o serviço dessas abelhas essencial para a restauração deste habitat. Os objetivos deste estudo foram analisar as interações tróficas de *Epicharis nigrita* com suas plantas fontes de recurso e avaliar a diversidade genética e a estrutura populacional dessa espécie de abelha em áreas de restinga. O estudo foi realizado em cinco remanescentes de restinga ao longo do litoral dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. As abelhas foram coletadas individualmente com rede entomológica, em flores de *Byrsonima sericea* DC, durante o período de maior floração, logo que pousavam nas flores, a fim de identificar as fontes de recursos utilizadas pelas fêmeas durante o forrageamento. As interações das com plantas fontes de recurso foram avaliadas através da identificação taxonômica do material polínico contido nas escopas das fêmeas. Cargas polínicas das escopas de 46 fêmeas provenientes das cinco áreas de restinga foram submetidas à acetólise e o material montado em lâminas. As estimativas foram feitas a partir da contagem e identificação de 1200 grãos de pólen por indivíduo. Amostras da musculatura torácica de 108 fêmeas foram submetidas às análises de diversidade genética, utilizando marcadores mitocondriais. Foram identificados 26 tipos polínicos pertencentes a nove famílias botânicas nas amostras nas cinco áreas de restinga. *Byrsonima sericea* foi a espécie mais representativa nas cinco áreas, como esperado, apresentando 100% de frequência de ocorrência, o que indica que estas abelhas apresentam constância floral em *Byrsonima sericea* durante as coletas de pólen. As demais famílias de plantas amostradas representaram menos de 1% de frequência relativa nas amostras em todas as áreas estudadas, confirmando a hipótese de oligolecia para *Epicharis nigrita*. A composição dos outros recursos florais utilizados por estas abelhas foi distinto

entre as áreas de estudo, sugerindo uma substituição de recursos de néctar ao longo da distribuição geográfica s ao longo do litoral do Rio de Janeiro e Espírito Santo, associada com a composição florística das áreas. As análises de diversidade genética apontaram um valor global de $\Phi_{ST} = 0,292$ e os valores obtidos para cinco pares de amostras de *E. nigrita* analisados para um segmento de 499 pb do gene 16S evidenciaram uma importante estrutura populacional para a espécie estudada. O comportamento filopátrico poderia ser um dos prováveis fatores atuando em favor da estruturação genética entre as populações. Dentre os cinco pares de amostras que evidenciaram uma diferenciação genética alta, quatro envolveram uma das áreas amostradas na distribuição mais ao norte, no estado do Espírito Santo. Um estudo mais detalhado nesta área seria necessário para avaliar se fatores ambientais ou outros fatores intrínsecos da população de *Epicharis nigrita* seriam relevantes para explicar a importante diferenciação genética encontrada entre as abelhas do Parque Estadual Paulo César Vinha e as demais áreas estudadas. Os resultados indicam que as populações de *Epicharis nigrita* podem ser mais facilmente afetadas pelo processo de fragmentação das áreas de restinga estudadas, devido as suas características particulares, necessitando de uma maior atenção à conservação.

Palavras-chave: Abelhas coletoras de óleo, Análises palinológicas, Mata Atlântica, Marcadores mitocondriais, Pólen, Polinizadores.

ABSTRACT

The restingas of the Brazilian coast have been suffering for several decades a growing process of fragmentation. Fragmentation causes major changes in the mutual interactions and may lead to a reduction in the size of pollinator populations and in their genetic diversity, threatening biological diversity. *Epicharis nigrita* is a species of bee that has a close relationship with plants that have floral structures that secrete oil. These plants are important components of the flora of the restingas, making the service of these bees essential for the restoration of this habitat. The aims of this study were to analyze the *Epicharis nigrita* trophic interactions with its resource sources and to evaluate the genetic diversity and the population structure of this bee species in restinga areas. The study was carried out in five remnants of restinga along the coast of the states of Rio de Janeiro and Espírito Santo. The bees were collected individually with entomological net, in flowers of *Byrsonima sericea* DC, during the period of greatest flowering, as soon as they landed on the flowers, in order to identify the sources of resources used by the females during foraging. The interactions of plants with resource sources were evaluated through the taxonomic identification of the pollen material contained in the scopes of the females. Pollen loadings of the scopes of 46 females from the five restinga areas were submitted to acetolysis and then the material was mounted on slides. Estimates were made from the count and identification of 1200 grains of pollen per individual. Samples of the thoracic musculature of 108 females were submitted to genetic diversity analysis using mitochondrial markers. Twenty-six pollen types belonging to nine botanical families were identified in the samples in the five restinga areas. *Byrsonima sericea* was the most representative species in the five areas, as expected, presenting a 100% frequency of occurrence, indicating that these bees present floral constancy in *Byrsonima sericea* during pollen collections. The other families of plants sampled represented less than 1% of relative frequency in the samples in all the studied areas, confirming the oligolecia hypothesis for *Epicharis nigrita*. The composition of the other floral resources used by these bees was distinct among the study areas, suggesting a substitution of nectar resources along the geographical distribution along the coast of Rio de Janeiro and Espírito Santo, associated with the floristic composition of the areas. Genetic diversity analyses showed a global value of $\Phi_{ST} = 0.292$ and the values obtained for five pairs of *E. nigrita* samples analyzed for a segment of 499 bp of the 16S gene presented an important population structure for the studied species. Philopatric behavior could be one of the probable factors acting in favor of genetic structuring between populations. Among the five pairs of samples that showed a high genetic differentiation, four involved one of the areas sampled in the further north distribution, in the state of Espírito Santo. A more detailed study in this area would be necessary to evaluate if environmental factors or other intrinsic factors of the population of *Epicharis nigrita* would be relevant to explain the important genetic differentiation found between the bees of the Paulo César Vinha State Park and the other studied areas. The results indicate that the populations of *Epicharis nigrita* can be more easily affected by the fragmentation process of the restinga

areas studied, due to their particular characteristics, requiring a greater attention to conservation.

Keywords: Oil-collecting bees, Palynological analyzes, Atlantic Forest, Mitochondrial markers, Pollinators.

INTRODUÇÃO GERAL

As restingas são ecossistemas incluídos pelo Decreto Federal 750/1993 no domínio Mata Atlântica e seu conceito é abordado na literatura desde 1785 (Reys, 1997). No sentido geral, envolvem um conjunto de comunidades que vivem sobre depósitos arenosos costeiros formados no Quaternário (Bigarella, 1947; Lacerda *et al.*, 1982; Rocha *et al.*, 2003); sua descrição é bastante complexa e diversa, pois é utilizada em uma variedade de áreas de estudo, como Geologia, Botânica e Ecologia, onde são abordados diferentes elementos que constituem este habitat (Suguio & Tessler, 1984; Assunção & Nascimento, 2000). Quando comparadas a florestas, as restingas são consideradas habitats abertos, possuindo particularidades, como intensa radiação solar, solos arenosos e pobres em nutrientes, restrição hídrica e também a presença de vegetação característica desse ecossistema, o que permite a sobrevivência de organismos adaptados a esse ambiente. Além disso, as restingas da costa brasileira apresentam diferenças particulares em sua fisionomia, estrutura e composição florística (Eiten, 1983; Oliveira & Rocha, 1997), o que pode influenciar a composição e riqueza da fauna (Rocha & Bergallo, 1997; Rocha, 2000; Rocha *et al.*, 2003).

Três fitofisionomias são mais comumente reconhecidas como formadoras das restingas costeiras no Brasil: formações herbáceas, formações arbustivas (abertas ou fechadas) e florestas. Em geral, estas fisionomias apresentam-se nesta ordem no sentido oceano-continente. Esse aumento da complexidade estrutural do ambiente, maior nas áreas mais distantes do oceano, pode acarretar o aumento da riqueza e a diversidade de espécies (Henriques *et al.*, 1986; Rocha & Bergallo, 1997; Rocha *et al.*, 2003). Devido à localização em áreas litorâneas, as restingas constituem um dos habitats mais alterados e explorados, sujeitos principalmente a atividades humanas. A crescente fragmentação em áreas de restinga, resultante da expansão dos centros urbanos e de atividades econômicas como pastagem e agricultura, é uma das maiores ameaças à diversidade biológica neste ecossistema (Araújo & Lacerda, 1987; Rocha *et al.*, 2003).

Em um estudo em área de restinga, Gaglianone (2000) relatou que cerca de 80% das espécies das plantas mais abundantes são primariamente

polinizadas por insetos e, entre estes, as abelhas estão envolvidas em interações com espécies de diversas famílias. Estas observações foram comprovadas em estudo recente (Deprá, 2018). Esta alta porcentagem observada sugere que as abelhas têm um papel essencial para os processos de restauração dos remanescentes neste tipo de vegetação. Isso ocorre especialmente no caso de espécies dioicas, como é o caso de *Clusia hilariana* Schltdl (Cesário, 2007) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (Cesário & Gaglianone, 2008), que não são capazes de produzir frutos e sementes na ausência de seus polinizadores. Uma importante guilda de abelhas considerada muito representativa na restinga é composta pelas abelhas coletoras de óleo que apresentam estreita relação com plantas que possuem estruturas florais secretoras de óleo (elaióforos), como é o caso de *Byrsonima sericea* DC (Malpighiaceae).

Byrsonima sericea é uma espécie de planta que possui indivíduos com altura que variam de 3 a 20m e cada uma das cinco sépalas que formam a corola das flores possui um par de elaióforos (Teixeira & Machado, 2000). No entanto, existe indivíduos que apresentam flores sem elaióforos, podendo ocorrer casos de populações com indivíduos com e sem as glândulas secretoras de óleo. Além do óleo, esta espécie vegetal oferece pólen como recompensa aos seus visitantes florais e suas flores apresentam diferentes atributos que são considerados atrativos às abelhas, como: zigomorfia, cor amarela e antese diurna (Vogel, 1974; Anderson, 1979; Sazima & Sazima, 1989).

As abelhas coletoras de óleo, na região neotropical, estão distribuídas em três tribos da família Apidae: Centridini, Tapinotaspidini e Tetrapediini (Alves-dos-Santos *et al.*, 2007). A tribo Centridini é a mais diversificada e apresenta dois gêneros, *Centris* Fabricius, 1804 e *Epicharis* Klug, 1807, com aproximadamente 250 espécies (Moure *et al.*, 2012), embora a monofilia da tribo esteja sendo contestada recentemente. Fêmeas de Centridini apresentam comportamento solitário de nidificação. As espécies de *Centris* constroem seus ninhos principalmente em solos expostos ou cobertos por vegetação rasteira, e há também espécies que nidificam em cupinzeiros ou em cavidades preexistentes (Coville *et al.*, 1983; Gaglianone, 2001), enquanto que as espécies de *Epicharis* nidificam em solos arenosos podendo formar agregações de ninhos com outras fêmeas (Camargo *et al.* 1975, Roubik & Michener, 1980, Gaglianone, 2005, Rocha-Filho *et al.*, 2008; Gaglianone *et al.*, 2015).

As fêmeas apresentam nas pernas estruturas morfológicas especializadas para a coleta, manuseio e transporte de óleo floral (Vogel, 1974). O óleo floral é um importante recurso utilizado na construção de ninhos, por apresentar características como impermeabilidade, aderência a substratos e também resistência e dureza. Este recurso também é utilizado como alimento larval juntamente com o pólen, podendo substituir o néctar, devido ao seu alto valor energético (Camargo *et al.*, 1975).

No Brasil, espécies de Centridini foram estudadas nos mais variados habitats, dentre estes o cerrado (Pedro, 1994; Gaglianone, 2003), a caatinga (Aguilar *et al.*, 2003), as dunas de areia (Silva *et al.*, 2001) e os ambientes florestais (Gaglianone, 2006) e urbanizados (Silva-Júnior, 2011). Em todos esses ecossistemas, estas abelhas são consideradas importantes polinizadores, contribuindo para a manutenção da vegetação nativa da área. Além disso, *Centris* e *Epicharis* são polinizadores-chave na agricultura, como em cultivos de acerola (Siqueira de Castro, 2002) e maracujá-doce (Gaglianone, 2010). Estudos da relação entre flores produtoras de óleos e abelhas coletoras de óleos em regiões costeiras do Brasil têm demonstrado o importante papel destas abelhas como potenciais agentes polinizadores neste ecossistema. Estas interações foram estudadas por autores como Teixeira & Machado (2000) no estado de Pernambuco, Costa *et al.* (2006) em dunas na Bahia e Dunley *et al.* (2009) no Rio de Janeiro. Por isso, o estudo aprofundado destas populações de abelhas pode contribuir para elucidar os efeitos da fragmentação das áreas de restinga e para a conservação deste importante ecossistema.

As abelhas do gênero *Epicharis* estão distribuídas em nove subgêneros exclusivamente neotropicais com registro de ocorrência em diferentes fitofisionomias como de Mata Atlântica, Cerrado, Florestas Úmidas Equatoriais, em vegetação de campos, e em área antrópicas (Gaglianone, 2000; Gaglianone *et al.*, 2001). Espécies desse gênero têm sido objeto de vários estudos envolvendo principalmente seu comportamento de nidificação, espécies associadas aos ninhos, sazonalidade e as fontes de recursos utilizadas para a alimentação da sua prole (Vesey-FitzGerald, 1939; Camargo *et al.*, 1975; Roubik & Michener, 1980; Raw, 1992; Hiller & Wittmann, 1994; Gaglianone, 2001; Thiele & Inouye, 2007; Rocha-Filho *et al.*, 2008; Werneck, 2012; Werneck & Campos 2012; Gaglianone *et al.*, 2015).

Epicharis (Epicharis) nigrita (Friese, 1900) é uma espécie univoltina, que constrói seus ninhos em solo arenoso formando agregações (Gaglianone, 2005). Ninhos estudados em área de Cerrado mostraram a presença de um único canal que leva a uma célula isolada. As células foram aprovisionadas com uma mistura de pólen e óleos florais, coletados de flores de *Byrsonima*. Em áreas de restingas, estudos envolvendo as interações ecológicas desta espécie são ainda limitados. Assim, devido à grande representatividade e importância de *Epicharis nigrita* como agente polinizador nas restingas costeiras, tais estudos se fazem necessários e urgentes.

Outra questão relevante envolvendo *Epicharis nigrita* diz respeito à ausência de estudos genéticos sobre suas populações. Diversos autores têm apontado a perda de diversidade genética como uma das prováveis causas responsáveis pelo declínio mundial nas populações de abelhas (Winfrey *et al.*, 2009; Zayed, 2009; Potts *et al.*, 2010). Ademais, segundo Brown & Paxton (2009), com exceção dos gêneros *Apis* L. e *Bombus* Latreille, pouco se sabe sobre a genética de populações envolvendo abelhas. A perda da diversidade genética pode levar, por exemplo, à maior susceptibilidade das populações de abelhas à patógenos (Brown & Paxton, 2009) e ao aumento de produção de machos diploides (Zayed, 2009).

Estudos sobre a diversidade genética aplicam técnicas de marcadores moleculares e podem ser desenvolvidos a partir de DNA nuclear ou mitocondrial. Ao contrário do DNA nuclear de herança biparental, o DNA mitocondrial apresenta herança uniparental de origem materna, permitindo testar a filopatria em fêmeas de abelhas, como é o caso de espécies de Centridini que tendem a nidificar nos mesmos locais onde emergiram. Trabalhos relacionando filopatria à maior tendência de diferenciação genética vêm sendo desenvolvidos com abelhas da tribo Euglossini, como é o caso dos estudos com espécies de *Eulaema* (López-Uribe *et al.* 2014) e com populações de *Euglossa iopoecila* em Floresta Atlântica dos estados do Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro (Penha *et al.* 2015).

Com o intuito de analisar a variabilidade genética entre populações de abelhas a partir de DNA, algumas metodologias têm sido frequentemente empregadas, tais como as análises com enzimas de restrição (ER), que reconhecem determinadas sequências de bases de DNA e as clivam em sítios

específicos, permitindo a separação de fragmentos do DNA analisado. Neste caso, a caracterização do DNA é possível a partir da construção de mapas de restrição, que fornecem vários dados importantes do genoma, como por exemplo o seu tamanho, número de sítios de restrição por enzima, posição desses sítios e regiões conservadas.

Outra técnica muito utilizada é a amplificação do genoma via Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Essa técnica consiste em uma sequência de ciclos que permite a multiplicação de fragmentos de DNA a partir de iniciadores (primes) e enzimas que realizam a replicação (DNA polimerase), permitindo a análise de pequenas amostras de DNA (Arias *et al.*, 2003).

Estudos utilizando DNAmT como marcadores moleculares em populações de abelhas vêm sendo desenvolvidos principalmente em grupos de abelhas sociais, como abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) e meliponíneos (Moritz *et al.*, 1986; Arias *et al.*, 1990; Garnery *et al.*, 1992; Oldroyd *et al.*, 1992; Arias & Sheppard, 1996; Arias *et al.* 1996; Smith *et al.*, 2000). De modo diverso, ao se considerar o número maior de espécies de abelhas de hábito solitário em comparação com as de hábitos sociais, as informações existentes na literatura sobre a genética das populações de abelhas solitárias são ainda escassas. No Brasil, além dos estudos genéticos com espécies sociais, nota-se um aumento no número de investigações envolvendo diferentes espécies de abelhas das orquídeas, podendo ser citados os trabalhos de Sofia *et al.* (2005), Suzuki *et al.* (2010), Cerântola *et al.* (2010), Zimmermann *et al.* (2011), Boff *et al.* (2014) e Penha *et al.* (2015). Destaca-se ainda o estudo de Augusto *et al.* (2012), que descreve e caracteriza locos microssatélites de *Xylocopa frontalis* (Olivier) e o estudo de Moure-Oliveira (2013) sobre estrutura genética de abelhas Centridini de áreas urbanas. Este último estudo procurou testar se essas abelhas são estruturadas geneticamente e, ao estimar o nível de estruturação, relatou resultados distintos para cada espécie, evidenciando apenas uma espécie (*Centris trigonoides*) com nível de estruturação significativo. Vale destacar ainda os estudos de Martins (2014) e Martins *et al.* (2015), que também fizeram uso de ferramentas moleculares para uma abordagem evolutiva envolvendo a tribo Centridini. Dessa forma, estudos que permitam um acesso ao conhecimento da diversidade genética em populações de abelhas são altamente relevantes para o planejamento de estratégias de conservação de polinizadores.

Neste contexto e levando em consideração algumas características particulares de *Epicharis nigrita*, tais como o uso de solo preferencialmente arenoso para a construção dos seus ninhos e sua possível especialização na coleta de óleo e pólen de flores do gênero *Byrsonima*, dados sobre estrutura genética e interações entre essa espécie de abelha e plantas poderão indicar se suas populações são mais suscetíveis às pressões antrópicas e necessitam de maior atenção nas medidas de conservação dos polinizadores.

CAPÍTULO 1 – Recursos polínicos utilizados por *Epicharis nigrita* (Friese, 1900) em áreas de restinga

1.1- INTRODUÇÃO

O pólen das flores é um recurso fundamental, pois além de sua função na reprodução das plantas, também é utilizado como recompensa para visitantes florais. Abelhas coletam grandes quantidades de pólen, que servem principalmente como fonte proteica para suas larvas. Embora este pólen não seja usado na polinização, é utilizado na alimentação de futuros polinizadores (Schlindwein *et al.* 2005). Esta interação entre abelhas e plantas possibilita a polinização cruzada, favorecendo o fluxo gênico das plantas, o que garante o reestabelecimento da diversidade de uma comunidade vegetal (Palmer *et al.*, 1997; Rodrigues & Gandolfi, 2000).

As interações entre abelhas e plantas em relação ao uso de recurso polínico podem ser mais ou menos específicas, o que levou autores à classificação das abelhas visitantes florais em monoléticas, que coletam pólen em uma única espécie vegetal, oligoléticas, que coletam pólen de poucas plantas proximamente aparentadas e poliléticas, que coletam pólen em grande riqueza de plantas (Robertson 1925, Linsley 1958; Eickwort & Ginsberg 1980). Outras classificações mais recentes abordam principalmente o conceito de especialização e generalização. Segundo alguns autores, as espécies especialistas visitam determinadas espécies de plantas ou famílias botânicas, coletando com máxima eficiência e assim atuando como polinizadores especializados, mantendo uma relação bastante estreita com as plantas. As espécies generalistas, por outro lado, visitam flores de muitas espécies botânicas e utilizam diversas fontes de alimento, não sendo dependente de alguma espécie específica para sua sobrevivência.

Muitas abelhas solitárias apresentam sazonalidade marcada, com adultos em apenas curto período do ano (Michener, 2007). Nestes casos, a especialização a poucas fontes de pólen é uma característica amplamente observada, o que facilita o uso de recursos de plantas em florescimento na mesma época de seu período de atividade (Roubik & Michener, 1980). Já as

espécies de abelhas eussociais, apresentam-se ativas durante todo o ano e se comportam como generalistas, possuindo uma variedade de plantas disponíveis como fornecedoras de recursos (Faria *et al.*, 2012).

Informações como estas podem ser obtidas a partir da observação direta das abelhas nas flores ou por meios indiretos, como, por exemplo, por meio da análise polínica dos grãos de pólen encontrados nas estruturas de transporte no corpo das abelhas (escopas/corbículas das fêmeas), nas fezes das larvas e nos conteúdos de provisionamento estocados nos ninhos das abelhas. O estudo dos grãos de pólen a partir da análise polínica permite a identificação taxonômica através da análise da estrutura e ornamentação da exina do grão de pólen e pode fornecer importantes informações sobre as espécies de plantas utilizadas como fontes de recursos florais para as abelhas, assim como sobre a natureza da interação entre eles. A partir disso, podemos identificar os grupos de plantas essenciais para a sobrevivência e manutenção das populações destes polinizadores e conseqüentemente dessas plantas, contribuindo dessa forma para o entendimento dessa interação mutualística entre abelhas e plantas.

Epicharis nigrita possui distribuição exclusiva no Brasil com registros de ocorrência na Mata Atlântica em regiões costeiras e em cerrados (Gaglianone, 2001). Para *E. nigrita* apenas o estudo de Gaglianone (2005), realizado em área de cerrado do estado de São Paulo, trata das fontes polínicas utilizadas como recursos para o provisionamento das células de cria. Os dados do presente trabalho podem servir como base para o planejamento de estratégias de conservação desses polinizadores.

1.2- OBJETIVO

Analisar as interações tróficas de *Epicharis nigrita* em áreas de restinga ao longo do litoral dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo.

1.3- METODOLOGIA

1.3.1- Área de estudo

O estudo foi realizado em cinco remanescentes de restinga localizadas ao longo do litoral dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, descritos a seguir (Figura 1.1 e Tabela 1.1).

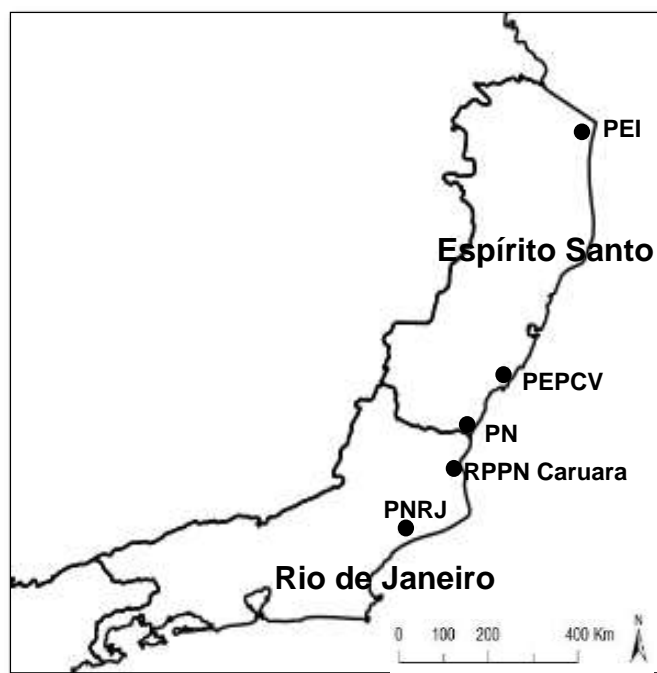


Figura 1.1 - Localização geográfica dos remanescentes de restinga: Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ) Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Caruara (RPPN Caruara), Restinga de Praia das Neves (RPN), Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV) e Parque Estadual de Itaúnas (PEI).

Tabela 1.1 - Áreas de amostragem de *Epicharis nigrita* no litoral dos estados do Rio de Janeiro (RJ) e Espírito Santo (ES), Brasil

Áreas		Município, estado	Coordenadas
PNRJ	Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba	Quissamã, RJ	22°17'S, 41°41'W
RPPN	Reserva Particular do Patrimônio Natural Caruara	São João da Barra, RJ	21°44'S, 41°02'W
PN	Restinga de Praia das Neves	Presidente Kennedy, ES	21°14'S, 40°56'W
PEPCV	Parque Estadual Paulo César Vinha	Guarapari, ES	20°33'S, 40°23'W
PEI	Parque Estadual de Itaúnas	Conceição da Barra, ES	18°20'S, 39°40'W

Tabela 1.2 - Distância entre as áreas de amostragem de *Epicharis nigrita* ao longo do gradiente do litoral dos estados do Rio de Janeiro (RJ) e Espírito Santo (ES),

Áreas	Distância
PNRJ – RPPN Caruara	64Km
RPPN Caruara – PN	43Km
PN – PEPCV	100Km
PEPCV – PEI	247Km
Distância máxima entre áreas extremas	454Km

Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba

O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ) no litoral norte do estado do Rio de Janeiro engloba áreas dos municípios de Macaé, Carapebus e Quissamã, com área total de 14.860 ha. A região apresenta uma lagoa de água doce, a Lagoa Feia, e está sobre planície de origem quaternária que se estende desde a cidade de Macaé até Barra do Furado (Araujo *et al.*, 1998). A criação do PNRJ foi fundamental para o sucesso na conservação de um dos maiores remanescentes de restinga do estado e proteção da diversidade biológica, sendo a única área de restinga preservada do Brasil na categoria de Parque Nacional (Rocha *et al.*, 2005) (Figura 1.2A).

Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Caruara

A Restinga do complexo Lagunar Grussaí/Iquipari ao norte do estado do Rio de Janeiro está localizada no município de São João da Barra. Há várias décadas a restinga vem sofrendo interferências antrópicas e sendo ameaçada por atividades dos setores imobiliário e industrial. Em parte desta restinga foi criada uma área de proteção, a RPPN Caruara, que possui uma área protegida de cerca de 4.000 ha, abrangendo os quatro tipos fisionômicos descritos por Assumpção & Nascimento (2000): formação praial graminóide, formação praia com moitas, formação de *Clusia* e formação mata de restinga. Desde 2012 está em andamento um projeto de restauração que envolve o plantio de mudas de espécies encontradas na formação de *Clusia* (Figura 1.2B).

Restinga de Praia das Neves

A restinga de Praia das Neves ao sul do Estado do Espírito Santo está localizada no município de Presidente Kennedy e ocupa uma área de aproximadamente 4.800 ha. Esta área sofreu alteração antrópica com remoção da vegetação para o estabelecimento de cultura e exploração madeireira (Lamego, 1946). Apesar disso, a restinga de Praia das Neves ainda possui remanescentes florestais e áreas com vegetação herbáceo-arbustiva em diferentes estágios de regeneração (Braz *et al.*, 2013) (Figura 1.2C).

Parque Estadual Paulo Cesar Vinha

O Parque Estadual Paulo Cesar Vinha (PEPCV) localizado em Setiba, município de Guarapari, Espírito Santo, compreende aproximadamente 1.500 ha de restinga. Esta restinga foi considerada área prioritária para conservação da biodiversidade, contemplada na categoria de alta importância biológica (MMA, 2000). O PEPCV foi criado como medida de proteção da área, que estava ameaçada por atividades imobiliárias, retirada demadeira, extração de areia e queimadas (Ferreira, 2011) (Figura 1.2D).

Parque Estadual de Itaúnas

O Parque Estadual de Itaúnas (PEI) ao norte do Estado do Espírito Santo está localizado no município de Conceição da Barra e apresenta uma área de 3.150 ha. O PEI se encontra em processo de restauração, onde estão sendo realizados plantios de mudas que tem como objetivo promover a restauração de áreas impactadas por ações antrópicas e principalmente por eventos de queimadas (Correia & Crepald, 2011) (Figura 1.2E).



Figura 1.2 - Visita aérea dos remanescentes de restinga: **(A)** Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), **(B)** Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Caruara (RPPN Caruara), **(C)** Restinga de Praia das Neves (RPN), **(D)** Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV) e **(E)** Parque Estadual de Itaúnas (PEI).

1.3.2- Coleta de dados

1.3.2.1- Amostragem das abelhas

A amostragem de abelhas foi realizada com rede entomológica em áreas de formação arbustiva aberta das restingas estudadas. As abelhas foram coletadas sobre as flores de *Byrsonima sericea* DC (Figura 1.3A, B e C), assim que pousavam nas flores, durante percurso do coletor em uma trilha de

aproximadamente 1 km de distância. As coletas foram realizadas nos horários de maior atividade das abelhas (entre 9 e 17 horas), durante os meses de outubro a março, meses de floração intensa da espécie em questão. Parte do material utilizado neste trabalho foi coletada no ano de 2016 e parte foi cedido pela orientadora, provenientes de coletas feitas em 2011, 2012 e 2014. Esta espécie vegetal foi escolhida pelo fato de ter ampla distribuição geográfica nas restingas e atrair grande número de espécies de abelhas coletoras de óleos devido à oferta de óleos e pólen como recursos florais e à interação específica com abelhas coletoras de óleos devido à presença de elaióforos (Figura 1.3D). Além disso, dados prévios (Deprá, 2018) obtidos na RPPN Caruara e Restinga de Praia das Neves indicaram *rysonima sericea* como principal espécie hospedeira de *Epicharis nigrita*. Além disso, a oferta de flores desta planta coincide com a atividade de *Epicharis nigrita* na área, estendendo-se de outubro a março (Gaglianone, 2006).

As abelhas foram coletadas separadamente, inseridas em frascos individuais, etiquetadas e armazenadas em álcool etílico absoluto (PA) no Laboratório de Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, foi retirado o material polínico da escopa dessas abelhas para posterior análise.

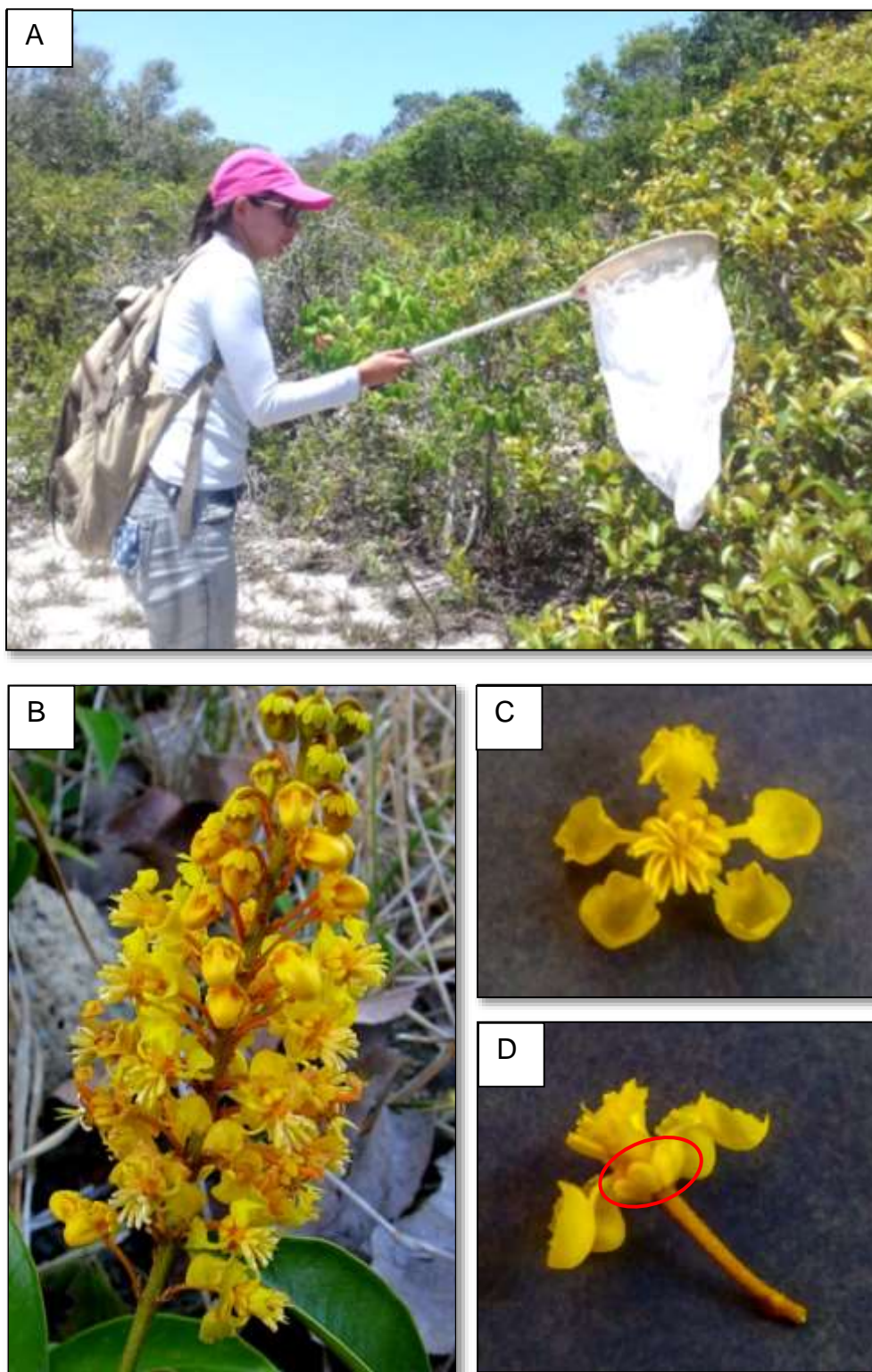


Figura 1.3 – (A) Coleta de *Epicharis nigrita* com rede entomológica em flores de *Byrsonima sericea*, **(B)** Inflorescência de *Byrsonima sericea*, **(C)** Flor de *Byrsonima sericea* e **(D)** Flor de *Byrsonima sericea* com destaque para os elaióforos. Foto: setor de ecologia de abelhas e polinização do LCA-CBB-UENF.

1.3.2.2- Obtenção das amostras do conteúdo polínico

O conteúdo polínico das escopas de 10 abelhas de cada área foi retirado e acondicionado em tubos de 15 ml contendo ácido acético glacial. Para o Parque Estadual de Itaúnas a amostragem foi de seis indivíduos, devido à inexistência de pólen suficiente para análise nas demais abelhas coletadas nesta área..

O material em ácido acético foi processado por acetólise, através do protocolo descrito a seguir O material polínico nos tubos foi submetido à centrifugação (1500 rpm por 15 min), retirado o sobrenadante e acrescentado 5 ml da mistura acetolítica (9 partes de anidrido acético para 1 parte de ácido sulfúrico). Foi colocado um bastonete de vidro em cada tubo e levado ao banho maria (80 °C por 3 min). Após início da fervura, os bastonetes foram agitados para desintegrar os tecidos que compõem o material. Em seguida, o material foi centrifugado (3000 rpm por 3 min) e novamente retirado o sobrenadante. Após essa etapa, foram acrescentados 10 ml de água destilada, o tubo agitado até formar espuma e depois acrescentadas 1 a 2 gotas de álcool 70%. Novamente o material foi centrifugado (3000 rpm por 3 min), o sobrenadante retirado e acrescentados 2 ml de uma mistura de 1:1 de água e glicerina (deixando por 30 min ou até o dia seguinte).

No setor de Ecologia Experimental do Laboratório de Ciências Ambientais da UENF, as amostras foram montadas em lâminas preparadas em triplicata para cada abelha, totalizando 138 lâminas. Foram contados 400 grãos de pólen por lâmina, totalizando 1200 grãos de pólen por abelha. Os diferentes tipos polínicos foram fotografados com auxílio de um microscópio e comparados com laminário de referência das espécies vegetais encontradas nas restingas. A identificação do material foi confirmada pela Profa. Dra. Vania Esteves e Dra. Claudia Barbieri (Museu Nacional, UFRJ), colaboradoras deste trabalho. A análise quantitativa foi através da contagem e respectiva porcentagem relativa do número de grãos de cada tipo polínico existente nas amostras.

1.3- Análises de dados

As interações entre *Epicharis nigrita* e as plantas fontes de recursos florais nas áreas de restinga estudadas foram avaliadas através da análise da riqueza (número de tipos polínicos encontrados nas amostras), abundância relativa (porcentagem de grãos de cada tipo em relação ao total de 1200 grãos por amostra), frequência de ocorrência (relativa ao número de amostras em que o tipo ocorreu) e índices de diversidade e similaridade entre as áreas de restinga.

A diversidade de tipos polínicos, uma medida da amplitude do nicho trófico das abelhas, foi calculada a partir do índice de Shannon-Wiener ($H = -\sum p_i \cdot \log p_i$, onde p_i = proporção de grãos de pólen do tipo i e \ln = logaritmo neperiano), em cada área (Magurran, 2004). Para o cálculo da diversidade foi utilizado o programa PAST versão 1.91 (Hammer *et al.*, 2001).

A similaridade na utilização das fontes de recursos florais entre as áreas de restinga foi calculada através de: $PS_{ij} = \sum \min(P_{ih}, P_{jh})$, onde PS = somatório dos menores valores de abundância relativa dos tipos polínicos i e j comuns às duas áreas comparadas (Krebs, 1989).

Os dados de frequência dos tipos polínicos foram organizados em uma matriz quantitativa, a partir da qual foram construídas redes de interação. Nas linhas da matriz foram dispostos os tipos polínicos (representando as espécies de plantas) e nas colunas foram dispostas as áreas de restinga. A matriz foi analisada no Programa R versão 2.9.2., pacote bipartite. As representações gráficas das redes de interação foram obtidas no programa Pajek 1.2.4 (Batagelj & Mrvar, 1998).

Para avaliar a suficiência amostral durante o período de estudo e comparar a tipos polínicos encontrados entre as áreas estudadas, foram avaliadas curvas de acumulação de espécies obtidas nas áreas amostradas, a partir de 1000 aleatorizações do conjunto de dados.

1.4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1- Principais fontes polínicas utilizadas por *Epicharis nigrita*

Foram identificados 26 tipos polínicos pertencentes a nove famílias botânicas, distribuídas nas cinco áreas de estudo (Tabela 1.2; Apêndice I). *Byrsonima sericea* (Malpighiaceae; Figura 1.4) foi a mais representativa nas cinco áreas, apresentando 100% de frequência de ocorrência e abundância relativa maior do que 98% em todas as áreas de estudo.

A maior abundância relativa de *Byrsonima sericea* sugere a importância dessa espécie como fonte de recursos para *Epicharis nigrita*. Apesar da amostragem focal nesta planta direcionar para a maior possibilidade de encontrar grãos de pólen desta espécie nas escopas das abelhas, a abundância tão alta deste tipo (acima de 98% em todas as amostras) indica que estas abelhas apresentam um comportamento de constância floral em *Byrsonima sericea* durante as coletas de pólen. Além disso, a abundância tão baixa de outros tipos parece indicar que outras fontes de pólen não seriam tão importantes para estas abelhas, pois caso contrário, seria esperada maior importância na massa das escopas. Outros grãos de pólen que porventura tivessem sido coletados e transferidos para as escopas em viagens anteriores, provavelmente, teriam sido detectados nas massas carregadas nas escopas e analisadas neste estudo.

A especialização de *Epicharis nigrita* na coleta de pólen foi indicada por Gaglianone (2005), em área de cerrado, onde a autora encontrou valores próximos a 97% de grãos de pólen de *Byrsonima* em algumas células de cria e fezes de larvas em ninhos estudados em agregações. O comportamento oligolético, sugerido para *Epicharis nigrita* naquele estudo, é corroborado no presente trabalho. A semelhança no padrão de uso de recursos polínicos observado entre as cinco áreas do presente estudo (Figura 1.5) sugere que a coleta especializada de pólen de *Byrsonima* seja um comportamento da espécie ao longo da sua área de distribuição e não somente uma característica local.

As interações entre abelhas do gênero *Epicharis* e flores de *Byrsonima* também foram relatadas em outros estudos, em diferentes áreas geográficas e com distintas espécies, mas principalmente no que se refere à coleta de óleos

florais (Teixeira & Machado, 2000; Gaglianone, 2001; Alves-dos-Santos *et al.*, 2007; Viana & Alves dos Santos, 2002).

Nas amostras analisadas neste estudo, *Stygmaphyllon* foi a única fonte de óleos florais, além de *B. sericea*, encontrada em abundância muito baixa e somente em uma das áreas (na RPPN Caruara), (Tabela 1.2) Este dado mostra que *B. sericea* é também a principal fonte de óleos florais para *E. nigrita* nas restingas estudadas do RJ e ES. Araújo *et al.* (2009) discute as vantagens do comportamento oligolético e especialista, relacionando-os com o menor gasto energético na coleta de recursos florais durante as viagens de forrageamento, visto que há uma diminuição no tempo gasto nessas viagens pelo fato desses insetos direcionarem suas coletas a determinada espécie vegetal. Algumas outras vantagens possíveis, que também estariam relacionadas com o tempo de viagem de forrageamento, seriam: o investimento em um maior número de células por ninhos, menor tempo de exposição das fêmeas adultas a predadores e também a diminuição na taxa de aparecimento de inimigos naturais. No presente estudo, deve-se levar em consideração que *Epicharis nigrita* é uma espécie sazonal e univoltina (Gaglianone, 2015), com atividade coincidente com o pico de floração de *Byrsonima sericea* nas restingas do RJ e ES (Deprá *et al.*, 2015).

Em todas as áreas avaliadas, as demais famílias de plantas amostradas representaram menos de 1% de abundância relativa nas amostras (Tabela 1.2, Figura 1.5). Apesar disso, algumas destas famílias apresentaram os maiores valores de riqueza de tipos polínicos: Rubiaceae (7 tipos polínicos), Leguminosae (7) e Solanaceae (4). As demais famílias apresentaram apenas um único tipo polínico (Tabela 1.2).

Entre os tipos polínicos com menos de 1% de abundância relativa, o PNRJ e a RPPN Caruara apresentaram o mesmo tipo polínico (tipo 2 da família Rubiaceae) com as maiores abundâncias relativas e frequência de ocorrência. Este fato pode indicar um possível compartilhamento do mesmo recurso complementar de pólen para *Epicharis nigrita* nessas áreas. Já na restinga de Praia das Neves, três tipos polínicos apresentaram uma abundância relativa consideravelmente maior em relação aos demais (tipo 6 da família Rubiaceae, tipo 3 de Leguminosae Caesalpinioideae e tipo 3 de

Leguminosae Mimosoideae), indicando possivelmente importantes fontes de recursos (Tabela 1.2).

Neste trabalho não foi possível identificar os tipos polínicos em nível específico e assim determinar os recursos (pólen ou néctar) utilizados pelas abelhas. Porém, baseado no fato de que várias espécies da família Rubiaceae tenham sido indicadas como fontes de néctar para abelhas coletoras de óleos, inclusive *Epicharis* (veja compilação em Gaglianone, 2001), pode-se supor que estas plantas sejam fontes de néctar para *Epicharis nigrita* nas restingas. O mesmo pode-se dizer sobre algumas espécies de Leguminosae (Papilionidae e Mimosoideae).

Diferentemente, espécies de Solanaceae são primariamente fontes de pólen por possuírem (muitas delas, e principalmente do gênero *Solanum*) anteras poricidas. Se isso for confirmado, estas fontes poderiam ser entendidas como fontes alternativas de pólen para estas abelhas nas áreas de ocorrência.

De acordo com os resultados obtidos em um trabalho realizado em dois desses remanescentes de restinga (RPPN Caruara e PN), *E. nigrita* também foi amostrada sobre flores de espécies das famílias Malpighiaceae (*Byrsonima sericea* DC) e Leguminosae (*Andira fraxinifolia* Benth e *Centrosema virginianum* Benth), além de outras duas famílias não registradas no presente estudo, pertencentes às famílias Apocynaceae (*Mandevilla funiformis* (Vell.) K.Schum.) e Melastomataceae (*Tibouchina clavata* (Pers.) Wurdack) (Deprá, 2018).

A baixa abundância de algumas famílias registradas neste trabalho pode ser explicada pela presença de pólen proveniente de resquícios de viagens realizadas pelas abelhas para coleta de outros recursos florais como, por exemplo, o néctar, que é utilizado como uma importante fonte energética para esses insetos, sendo o pólen detectado nas amostras, provavelmente aderido ao corpo das abelhas durante a coleta de néctar.

Uma identificação mais refinada dos tipos polínicos encontrados nas amostras analisadas será essencial para indicar os recursos (pólen, néctar ou óleo) oferecidos por cada espécie de planta e avaliar com maior segurança a importância das plantas visitadas, como fornecedoras desses recursos para *Epicharis nigrita*.

Tabela 1.3 - Composição, abundância relativa (AR, em %) e frequência de ocorrência (FO, em %) dos tipos polínicos encontrados nas escopas de *Epicharis nigrita* nas cinco áreas estudadas. Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Caruara (RPPN Caruara), Restinga de Praia das Neves (RPN), Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV) e Parque Estadual de Itaúnas (PEI).

Família/espécie	Caruara		PNRJ		PN		PEPCV		PEI	
	AR	FO	AR	FO	AR	FO	AR	FO	AR	FO
Malpighiaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1. <i>Byrsonima sericea</i>	99,6	100	98,9	100	98,7	100	99,5	100	99,8	100
2. <i>Stigmaphyllon</i> Tipo 1	0,02	10	-	-	-	-	-	-	-	-
Rubiaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3. <i>Hedyotis</i> Tipo 1	-	-	-	-	0,05	40	-	-	-	-
4. Tipo 1	-	-	0,01	10	-	-	-	-	-	-
5. Tipo 2	0,25	60	0,38	20	-	-	-	-	-	-
6. Tipo 3	0,04	30	0,01	10	-	-	-	-	-	-
7. Tipo 4	0,01	10	-	-	-	-	-	-	-	-
8. Tipo 5	0,01	10	-	-	0,03	30	-	-	-	-
9. Tipo 6	-	-	-	-	0,29	30	0,12	60	-	-
Solanaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10. Tipo 1	0,06	30	-	-	0,02	10	-	-	-	-
11. Tipo 2	-	-	0,02	10	-	-	-	-	-	-
12. Tipo 3	-	-	0,13	20	-	-	-	-	-	-
13. Tipo 4	-	-	0,01	10	-	-	-	-	-	-
Leguminosae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14. Leg. Pap. Tipo 1	0,01	10	0,07	10	-	-	-	-	-	-
15. Leg. Caesal. Tipo 1	-	-	0,03	10	-	-	-	-	-	-
16. Leg. Caesal. Tipo 2	-	-	-	-	0,02	10	-	-	-	-
17. Leg. Caesal. Tipo 3	-	-	0,02	10	0,29	60	-	-	-	-
18. Leg. Mimo. Tipo 1	-	-	0,08	10	0,01	10	-	-	-	-
19. Leg. Mimo. Tipo 2	-	-	-	-	0,08	30	0,14	60	-	-
20. Leg. Mimo. Tipo 3	-	-	-	-	0,30	60	0,16	60	-	-
Lythraceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21. Tipo 1	-	-	0,16	10	-	-	-	-	-	-
Apiaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22. Tipo 1	-	-	0,16	10	-	-	-	-	-	-
Myrtaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23. <i>Eucalyptus</i> Tipo 1	-	-	-	-	0,02	10	-	-	-	-
24. Tipo 1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,07	20
Nyctaginaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25. Tipo 1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,04	20
Poaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26. Tipo 1	-	-	-	-	0,14	50	-	-	-	-

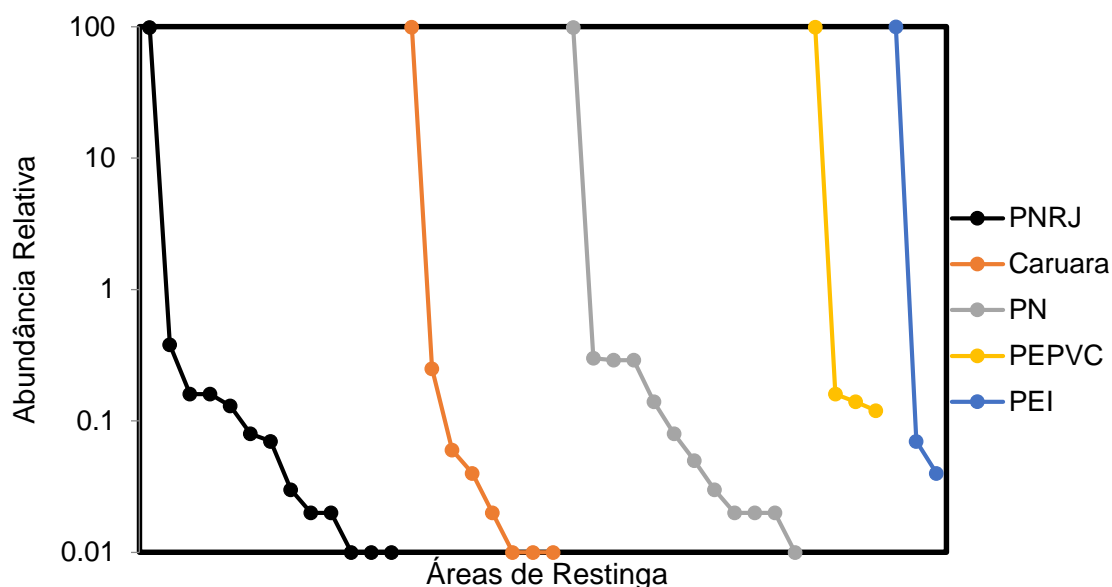


Figura 1.4 - Abundância relativa de tipos polínicos nas escopas de *Epicharis nigrita*, em sequência dos tipos mais abundantes, nas cinco áreas estudadas. Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Caruara (RPPN Caruara), Restinga de Praia das Neves (RPN), Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV) e Parque Estadual de Itaúnas (PEI).

1.4.2- Uso de recursos florais ao longo de um gradiente de restinga

A análise comparativa dos grãos de pólen coletados por *Epicharis nigrita* nas cinco áreas de estudo indicou que as abelhas amostradas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), a área amostrada mais ao sul, apresentaram a maior riqueza de tipos polínicos. Nesta área 13 tipos de pólen pertencentes a seis famílias botânicas foram identificados nas escopas das fêmeas. A família Leguminosae foi a que apresentou a maior riqueza (4 tipos polínicos), seguida de Rubiaceae (3) e Solanaceae (3). Por outro lado, as abelhas amostradas no Parque Estadual de Itaúnas (PEI), a área amostrada mais ao norte, apresentaram a menor riqueza, que apresentou apenas três tipos polínicos, cada um pertencente a uma família botânica (Tabela 1.2 e Tabela 1.3). As abelhas de PN apresentaram a maior diversidade de tipos polínicos, indicada

pelo índice de diversidade, enquanto que as abelhas do PEI apresentaram o menor índice (Tabela 1.3).

Tabela 1.4 - Riqueza e diversidade dos tipos polínicos nas escopas de fêmeas de *Epicharis nigrita*, amostradas em cinco áreas de restinga nos estados do RJ e ES. Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Caruara (RPPN Caruara), Restinga de Praia das Neves (RPN), Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV) e Parque Estadual de Itaúnas (PEI).

Locais de estudo	Área da restinga	Riqueza de tipos polínicos	Diversidade de tipos polínicos
PNRJ	14860 ha	13	0,0787
Caruara	4000 ha	8	0,0392
PN	4800 ha	12	0,0894
PEPCV	1500 ha	4	0,0354
PEI	3150 ha	3	0,0094

As curvas de rarefação, para avaliar a suficiência amostral e comparar a riqueza de tipos polínicos entre as áreas (Figura 1.6), apresentaram tendência à estabilização para quatro das cinco áreas amostradas (Caruara, PN, PEPCV e PEI), indicando que possivelmente a maior parte dos tipos polínicos utilizados por *Epicharis nigrita* foram registrados nessas áreas durante o período de estudo. No PNRJ, por sua vez, a curva mostrou insuficiência amostral, indicando que seria necessária maior amostragem de indivíduos nesta área. Este fato possivelmente está relacionado à maior área de restinga, correspondendo a mais de três vezes o tamanho das demais áreas estudadas. A riqueza da flora do PNRJ é alta, o que provavelmente explica a insuficiência amostral alcançada nas análises para esta área.

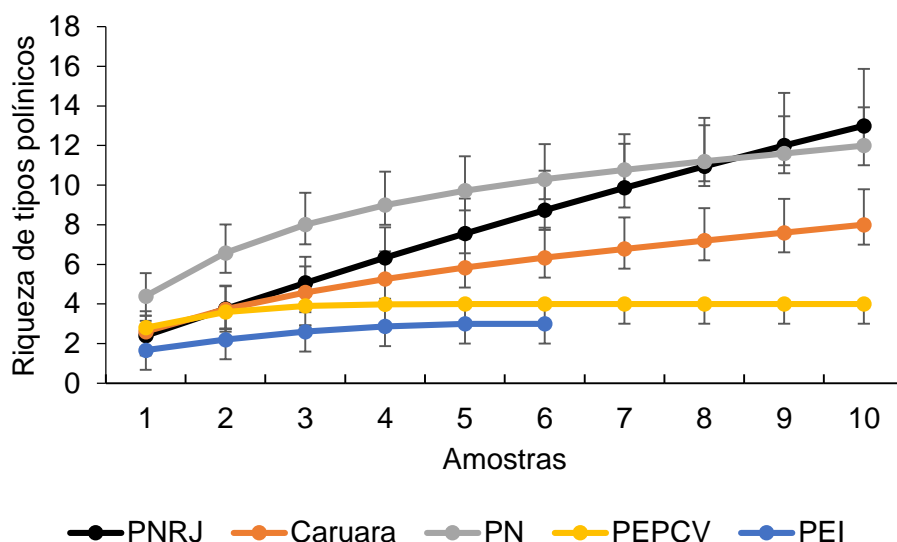


Figura 1.5 - Curva de rarefação, com desvio padrão, representando a riqueza dos tipos polínicos nas cinco áreas estudadas. Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Caruara (RPPN Caruara), Restinga de Praia das Neves (RPN), Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV) e Parque Estadual de Itaúnas (PEI).

Na comparação da composição dos tipos polínicos encontrados nas escopas das abelhas amostradas nos remanescentes de restinga, observou-se a formação de grupos quanto a similaridade dos tipos polínicos. As amostras das abelhas capturadas no PNR Jurubatiba apresentaram-se mais similares às amostras da RPPN Caruara, enquanto que Praia das Neves assemelhou-se com PEPCV. O Parque Estadual de Itaúnas foi a área com a menor similaridade com relação às demais (Figura 1.7).

A rede de interações construída com base nas amostras analisadas em cada área apresentou resultado semelhante (Figura 1.8), que pode ser interpretado como complementar ao dendrograma de similaridade, confirmando seus resultados.

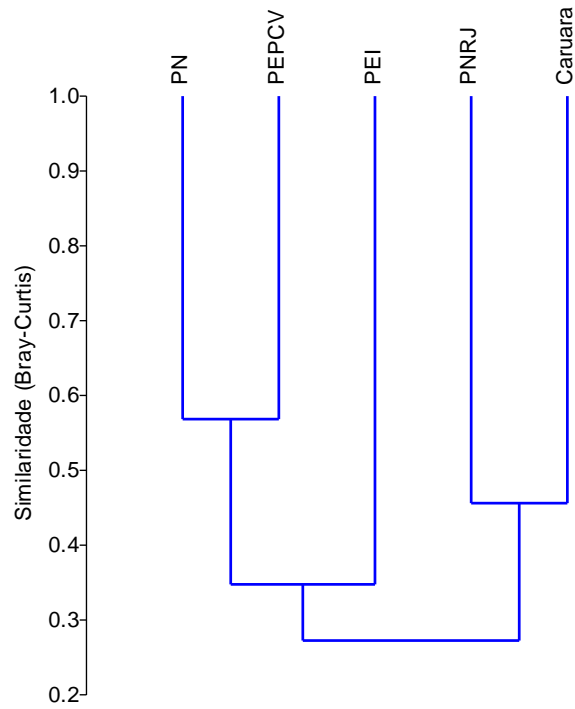


Figura 1.6 - Dendrograma de similaridade (índice de Bray Curtis) entre as cinco áreas estudadas, com relação às fontes polínicas nas escopas de fêmeas de *Epicharis nigrita*. Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Caruara (RPPN Caruara), Restinga de Praia das Neves (RPN), Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV) e Parque Estadual de Itaúnas (PEI).

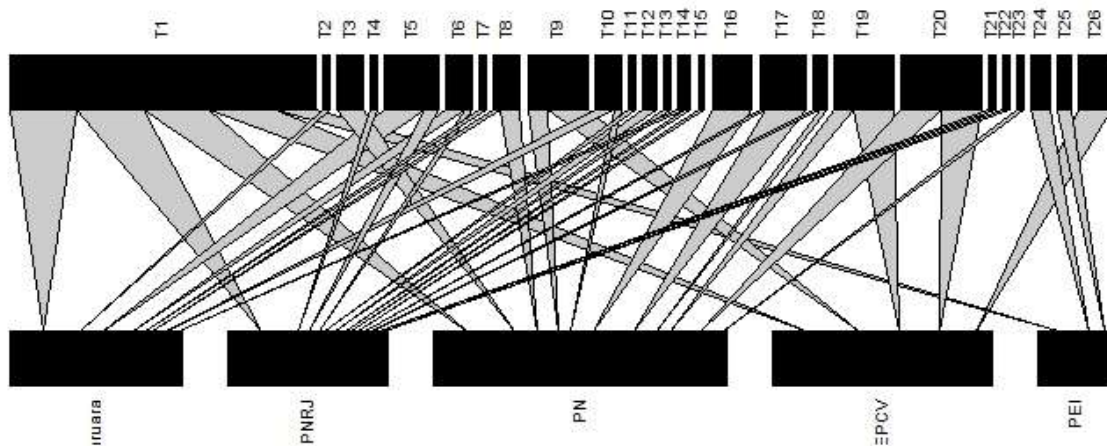


Figura 1.7 - Rede qualitativa de interações dos cinco remanescentes de restinga estudados. Os tipos polínicos estão representados por T1 a T26 com as identificações indicadas na tabela 1. Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), Reserva Particular do Patrimônio Natural Fazenda Caruara (RPPN Caruara), Restinga de Praia das Neves (RPN), Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV) e Parque Estadual de Itaúnas (PEI).

Com base nos dados obtidos, foram identificados dois agrupamentos entre os remanescentes de restingas estudados, em relação à similaridade dos tipos polínicos encontrados nessas áreas e a interação entre os indivíduos de abelhas e os pólenes. A maior similaridade entre remanescentes pode ser explicada por fatores como a proximidade entre os fragmentos de restinga, já que os grupos mais similares foram formados por fragmentos localizados ao norte do estado do Rio de Janeiro (PNRJ e Caruara) e ao sul do Espírito Santo (PN e PEPCV). Por outro lado, o maior isolamento entre os fragmentos indicou uma menor similaridade no uso de recursos, como é o caso do Parque Estadual de Itaúnas, que é o fragmento mais isolado, localizado ao norte do Espírito Santo e apresentou uma similaridade baixa com os outros quatro fragmentos.

Outros fatores importantes que podem refletir na variação da composição e riqueza de tipos polínicos entre áreas distintas mesmo com formações vegetacionais semelhantes são as diferenças na composição florística local e, conseqüentemente, a disponibilidade de recursos. Como mostrado por alguns autores, as restingas ao longo da costa do Brasil apresentam diferenças marcantes em sua fisionomia, estrutura e composição florística (Rocha & Bergallo, 1997; Araújo, 2000; Rocha *et al.*, 2003). Desse modo, cada fragmento de restinga representa um habitat com características particulares.

Um estudo sobre estrutura e padrão florístico realizado em regiões costeiras do Espírito Santo, no sudeste do Brasil, indicou a formação de dois grupos constituídos por restingas, um grupo compreendendo restingas no norte do Espírito Santo (Conceição da Barra e Itaúnas) e outro composto de restingas no sul e partes do norte do estado (Interlagos e Parque Estadual Paulo César Vinha) (Giaretta *et al.*, 2013). Este estudo indica que a distância dos fragmentos pode influenciar nas diferenças de composição florísticas, este fato esta de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, sugerindo que *Epicharis nigrita* estaria substituindo as fontes de recursos ao longo do litoral dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo.

Além dessas variáveis, outra característica a ser levada em consideração é o estado de conservação das áreas. De uma maneira geral, as restingas da costa brasileira apresentam fatores semelhantes que vem diminuindo constantemente sua cobertura vegetal (Rocha & Bergallo, 1997). Rocha *et al.* (2003) estimaram o nível de degradação de dez restingas, incluindo, entre estas,

quatro amostradas neste trabalho (PNRJ, Caruara, PN e PEPCV). O nível de degradação foi estipulado a partir das principais atividades antrópicas que causam degradação nesses habitats. Os resultados daquele trabalho indicaram a restinga da Caruara como a mais degradada no período de avaliação, seguida de PEPCV, PN e PNRJ. Esses dados relacionam-se com os dados de riqueza e diversidade obtidos no presente estudo, sugerindo que o nível de degradação das áreas pode ter influência na disponibilidade de recursos utilizados pelas abelhas. Espera-se então que melhorias nas condições ambientais das áreas, através de programas de restauração da vegetação, como tem acontecido na RPPN Caruara, resultem em ampliação das fontes de recursos florais disponível para as abelhas, em médio e em longo prazo.

CAPÍTULO 2 – Diversidade genética de *Epicharis nigrita* (Friese, 1900) em áreas de restinga

2.1- INTRODUÇÃO

A fragmentação e conseqüentemente a perda de habitat é uma das potenciais causas que podem levar à diminuição da variabilidade genética e do fluxo gênico entre populações de abelhas polinizadoras, podendo levar ao declínio populacional (Zayed, 2009 e Potts *et al.*, 2010). Além disto, ao se considerar os sistemas haplodiploide e de determinação sexual de abelhas (Zayed, 2009) e outros himenópteros (Cook & Crozier, 1995), como possíveis determinantes na redução do tamanho efetivo das populações destes insetos (Zayed, 2009), uma maior atenção deve ser dada ao conhecimento da diversidade genética e estrutura de populações nativas de abelhas.

No que tange às espécies de Centridini há uma notável lacuna na literatura sobre a diversidade e estrutura genética das populações deste grupo de abelhas. Dois estudos realizados com espécies de *Centris*, um dos dois gêneros que compõem a tribo Centridini, basearam as análises em marcadores mitocondriais (Moure-Oliveira, 2013; Luna-Lucena *et al.*, 2017). Ambos os estudos revelaram elevada diversidade genética nas populações estudadas.

O DNA mitocondrial (DNAm) possui características únicas que o tornaram uma das ferramentas mais utilizadas em estudos populacionais e evolutivos de diversos organismos (Moritz *et al.*, 1987; Avise, 1994). Algumas destas características do DNAm são: genoma pequeno e circular (a maioria); herança materna com ausência de recombinação; poucas sequências repetidas, pseudogenes ou íntrons; taxa evolutiva alta (quando comparado ao genoma nuclear) e conteúdo dos genes bastante conservado, ou seja, apresentam sequências muito semelhantes.

O uso de marcadores mitocondriais para inferências genéticas permite estimar o número de linhagens maternas relacionadas à origem das populações residentes em diferentes localidades. Pois, ao contrário do DNA nuclear, de herança biparental, o DNA mitocondrial apresenta herança uniparental de origem materna (Arias *et al.*, 2003). É possível também, com tais marcadores, obter, mesmo com base exclusivamente em genomas de machos,

como é comum em estudos com abelhas da subtribo Euglossina, informações sobre a possível filopatria das fêmeas (López-Uribe *et al.*, 2014).

Para *Epicharis nigrita* ainda não há trabalhos que abordam a diversidade genética de suas populações ao longo de um gradiente latitudinal, os dados deste trabalho serão importantes para avaliar a estruturação genética dessas populações e possivelmente indicar aquelas que estão mais sujeitas a ações antrópicas, sofrendo perda de diversidade genética.

2.2- OBJETIVO

Avaliar a diversidade genética e estrutura populacional da espécie *Epicharis nigrita* em áreas de restinga ao longo do litoral dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo.

2.3- METODOLOGIA

2.3.1- Área de estudo

O estudo foi realizado com amostras dos cinco remanescentes de restinga descritos no capítulo 1, para os quais o n amostral estava adequado às análises genéticas de população.

2.3.2- Obtenção de amostras para análises genéticas

No total foram analisados 108 indivíduos da espécie *Epicharis nigrita*, sendo 19 do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, 43 da RPPN Caruara, 28 da Praia dos Neves, 12 de Paulo César Vinha e seis de Itaúnas. Dentre os indivíduos coletados, 12 eram machos (11 de Praia dos Neves e um de Paulo César Vinha) e 96 fêmeas. As abelhas foram armazenadas individualmente em álcool etílico absoluto e mantidas sob refrigeração para a extração do DNA. Inicialmente, as abelhas passaram por um processo de retirada de contaminantes e para isso os indivíduos foram lavados com álcool 70%. Em

seguida, foi retirada a musculatura do tórax dos indivíduos coletados e armazenados em microtubos de 1,5 em duplicatas.

2.3.3- Extração de DNA

Para a extração de DNA, aproximadamente 35 mg de tecido foram colocados em placas de 96 poços com 200 µL de tampão de extração. Em cada poço foi adicionado 200 µL de tampão de extração que continha 0,5 g de chelex100 (BIO-RAD) e 5 ml de água ultrapura 13 (MilliQ) para completar o volume. A musculatura foi dilacerada com o auxílio de tesouras esterilizadas e após a dilaceração foi adicionada 3 µL de proteinase K (Invitrogen), homogeneizado e levadas ao termociclador onde foram mantidas à 55 °C por 60 minutos e aquecidas à 90 °C por 5 minutos. Após a extração, o material foi centrifugado por 1 min em 3000 rpm e retirado o sobrenadante para quantificação do DNA no NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometers (Thermo Scientific™). Após a quantificação o DNA das diferentes amostras foi diluído a 5 ng para o processo de amplificação.

2.3.4- Amplificação e sequenciamento do DNA

A amplificação das sequências parciais dos genes mitocondriais Citocromo B (*CytB*) e da subunidade maior do RNA ribossômico (16S) foram amplificadas por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando o programa: desnaturação inicial de 4 min à 94 °C; 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 52 °C por 30 s e 72 °C por 2 min, com extensão final de 2 min à 72 °C em termociclador MJ Research PTC-100. Cada reação foi realizada em volume final de 15 µL com 1x de PCR Master Mix (Promega), 0,25 µL dos primers na 20 µm e aproximadamente 5 ng DNA e água para completar o volume. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose a 1%, corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life 29 Technologies - na proporção de 2 µL para cada 100 ml de gel de agarose) e submetidos a eletroforese. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada no transiluminador ultra-violeta (UV).

Após a amplificação das regiões de interesse, 1 µL do produto de PCR foi purificado, com o kit de purificação de PCR ExoSAP-IT GE Helthcare BioSciences Ltda, segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante. Para as reações de sequenciamento foi utilizado o Kit comercial “Big Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems), obedecendo recomendações do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas independentemente para ambas as fitas utilizando o kit Big Dye Terminator v 3.1 (Applied Biosystems). Em seguida os produtos das reações foram precipitados com álcool e EDTA e ressuspensos em 10 µL de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems) com a leitura subsequente em um sequenciador automático ABI Prism 3500 XL (Applied Biosystems).

Tabela 2.1- *Primers* utilizados por PCR de genes mitocondriais

	<i>Primers</i>	Referências
CytB	F: 5'- TTATCAATAAATTATTGTCC -3' R: 5'- ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT -3'	LAGEA* Arias et al. (2008)
16SI	F: 5' - TTTTGTACCTTTTGTATCAAGGGTTG – 3' R: 5'- CTATAGGGTCTTATCGTCCC - 3'	Hall & Smith (1991) Hall & Smith (1991)
16SII	F: 5' - CACCTGTTTATCAAAAACATG - 3' R: 5'- CGTCGATTTGAACTAAAATCATG - 3'	Hall & Smith (1991) Hall & Smith (1991)

* *Primer* desenvolvido no Laboratório de Genética e Ecologia Animal - UEL

A região do *CytB* demonstrou excelente qualidade da amplificação do fragmento e da leitura dos eletrotroferogramas (Apêndice I), não apresentando sobreposição de bases (pico duplo). Entretanto, em 46 sequências com 429 pares de bases (pb), esta região não apresentou variação intra e/ou interpopulacional, não fornecendo, dessa forma, nenhuma informação relevante para analisar a estrutura genética de populações de *E. nigrita*.

Inicialmente, o 16SI foi testado em 16 indivíduos de diferentes populações. O fragmento amplificado possuía cerca de 740 pb, entretanto, com elevado grau de picos sobrepostos (Apêndice II), que inviabilizaram a interpretação dos resultados. De modo diverso, as sequências oriundas das amplificações com o

primer 16SII mostraram uma ótima qualidade e foram usadas nas análises. Assim, a partir da amplificação e sequenciamento de um fragmento de DNA mitocondrial foram obtidos 499 pb pertencentes a região 16S, em 86 indivíduos de *E. nigrita*, sendo 18 de Jurubatiba (PNRJ), 26 de Caruara (CAR), 25 do Praia dos Neves (PN), 11 de Paulo César Vinha (PEPCV) e seis de Itaúnas (PEI). A leitura do electroferograma se mostrou de fácil leitura e interpretação, devido à boa qualidade das sequências analisadas.

2.3.5- Análises dos dados

As sequências obtidas de ambas as fitas, *forward* e *reverse*, foram editadas através do programa Bioedit (Hall, 1999), alinhadas utilizando o aplicativo CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994), combinadas para formação de um consenso e analisadas no programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). O software BLAST (Altschul *et al.*, 1990) foi utilizado para identificar similaridades entre as sequências obtidas e as disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O programa DnaSP v.5 (Librado & Rozas 2009) foi empregado para estimar o número de haplótipos, diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π), sítios polimórficos. Além de gerar os arquivos de entrada (*input files*) para os programas ARLEQUIN versão 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) e NETWORK v.4.6.1.1 (Fluxus Technology Ltd - <http://www.fluxus-engineering.com>). O programa NETWORK foi usado para construir a rede de haplótipos a partir do algoritmo *median-joining* (Bandelt *et al.* 1999). A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada utilizando o software ARLEQUIN, versão 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer, 2010). Esta análise gera estimativas da variância genética (Φ_{ST}) entre os pares de populações, o qual pode ser usado como uma estimativa da distância genética entre estas. Para realizar esta estimativa foi assumido um valor de significância de 5% ($p < 0,05$).

2.4- RESULTADOS

A ferramenta BLAST constatou que o fragmento amplificado correspondia à região 16S, com similaridade superior a 82% com várias espécies de *Bombus* e *Eulaema* (Figura 2.1).

Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected 0

Alignments Download in GenBank Download Database Use of Results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Bombus securus</i> voucher SC142.16S ribosomal RNA gene, partial sequence, mitochondrial	462	462	100%	4e-126	84%	gi110676352 DQ788192.1
<input type="checkbox"/> <i>Eulaema speciosa</i> mitochondrial partial 16S rRNA gene	449	449	100%	3e-122	83%	gi48596466 A281095.1
<input type="checkbox"/> <i>Bombus sushkini</i> voucher SC143.16S ribosomal RNA gene, partial sequence, mitochondrial	446	446	100%	4e-121	83%	gi110676385 DQ788113.1
<input type="checkbox"/> <i>Esaerete smaragdina</i> mitochondrial partial 16S rRNA gene	446	446	100%	4e-121	83%	gi48596471 A281101.1
<input type="checkbox"/> <i>Bombus brudmanticus</i> voucher SC077.16S ribosomal RNA gene, partial sequence, mitochondrial	444	444	100%	1e-120	83%	gi110676230 DQ787994.1
<input type="checkbox"/> <i>Bombus zofchinskii</i> voucher SC072.16S ribosomal RNA gene, partial sequence, mitochondrial	440	440	100%	2e-119	83%	gi110676337 DQ788095.1
<input type="checkbox"/> <i>Bombus consobrinus</i> voucher SC281.16S ribosomal RNA gene, partial sequence, mitochondrial	438	438	100%	6e-119	83%	gi12426481 EF032354.1
<input type="checkbox"/> <i>Bombus consobrinus</i> mitochondrial complete genome	435	435	98%	8e-118	83%	gi126134798 2MF995069.1
<input type="checkbox"/> <i>Bombus religiosus</i> voucher SC141.16S ribosomal RNA gene, partial sequence, mitochondrial	433	433	100%	3e-117	82%	gi110676343 DQ788091.1
<input type="checkbox"/> <i>Bombus pratorum</i> voucher SC075.16S ribosomal RNA gene, partial sequence, mitochondrial	433	433	100%	3e-117	83%	gi110676328 DQ788087.1
<input type="checkbox"/> <i>Bombus gerstaeckeri</i> voucher SC065.16S ribosomal RNA gene, partial sequence, mitochondrial	431	431	100%	1e-116	83%	gi110676289 DQ788017.1
<input type="checkbox"/> <i>Bombus fuxorum</i> voucher SC207.16S ribosomal RNA gene, partial sequence, mitochondrial	429	429	100%	4e-116	83%	gi124264821 EF032359.1

Figura 2.1 - Resultado do BLAST demonstrando sequências similares.

Contudo, a análise desta sequência, em 86 indivíduos de *E. nigrita*, revelou apenas quatro haplótipos em três sítios), sendo um haplótipo único (*singleton*). Dos haplótipos encontrados, o haplótipo H1 foi o mais comum, sendo apresentado por 73 indivíduos, compartilhado com todas as populações (Figura. 2.2; Tabela. 2.2). A população de Caruara apresentou o maior número de haplótipos (3), enquanto de Itaúnas apenas um (Figura 2.2).

Tabela 2.2 - Sítios polimórficos em parte do gene 16S em 86 indivíduos de *E. nigrita*.

Haplótipos	Sítios Polimórficos (posição pb)			Incidência
	107	247	408	
H1	A	A	T	73
H2	A	G	T	4
H3	G	A	T	8
H4	A	A	G	1

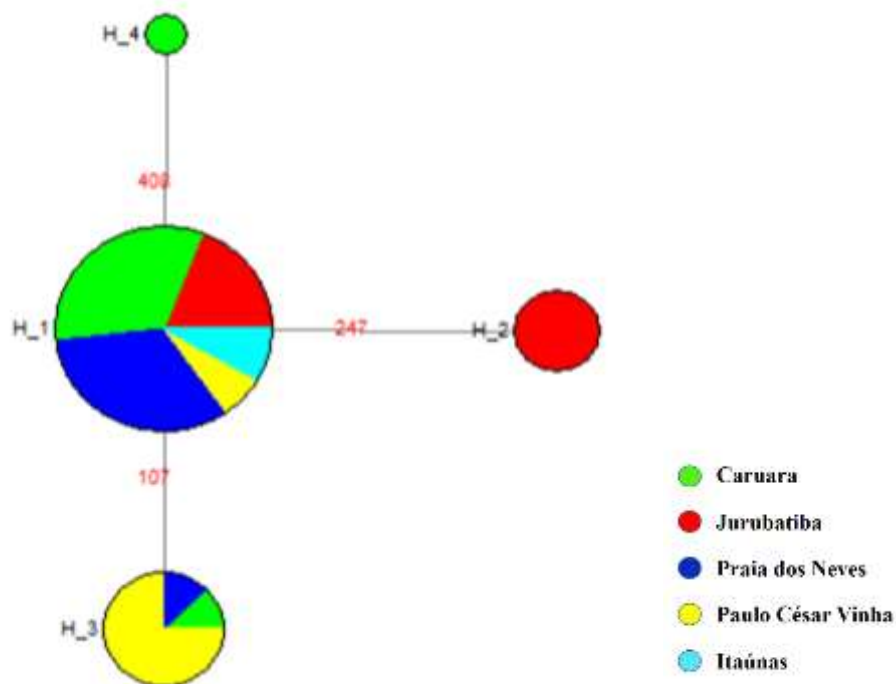


Figura 2.2 - Rede de haplótipos observados em *E. nigrita*. O tamanho dos círculos refere-se à frequência de cada haplótipo. Número entre os haplótipos indicam apenas um passo mutacional e a posição da mutação.

Na análise de diversidade genética por população, a diversidade haplotípica (h) variou de 0,000 (PEI) a 0,545 (PEPCV), enquanto que a diversidade nucleotídica (π) variou de 0,000 (PEI) a 0,00073. Os valores globais de h e π encontrados foram 0,272 e 0,00057, respectivamente (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Número de indivíduos analisados (N), número de haplótipos (NH), diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) de cinco populações de *E. nigrita* nas cinco áreas estudadas.

	POPULAÇÕES				
	PNRJ	CARUARA	PN	PEPCV	PEI
(N)	18	26	25	11	6
(NH)	2	3	2	2	1
(h)	0,366	0,151	0,080	0,545	0,000
(π)	0,00073	0,00031	0,00016	0,00065	0,00000
h global: 0,272	π g lobal: 0,00057				

A partir da análise da AMOVA, observou-se que a maioria da variação molecular ocorre dentro de populações (70,75%) e uma porcentagem menor entre as amostras (29,25%). O valor global do Φ_{ST} encontrado foi de 0,292 (Tabela 2.4).

Na comparação entre os pares de populações, os valores de Φ_{ST} de cinco combinações (PNRJ x PN, PNRJ x PEPCV, CARUARA x PEPCV, PN x PEPCV e PEPCV x PEI) foram significativos, com valores variando de 0,017 a 0,052, indicando uma importante diferenciação genética encontrada entre as abelhas de PEPCV e as demais áreas estudadas (Tabela 2.5).

Tabela 2.4 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) e variância de frequência genética (Φ_{ST}) mostrando a porcentagem de variação entre e dentro de populações. * Valores significativos ($P < 0,05$)

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	mtDNA		Φ_{ST}
			Componentes de variação	Porcentagem de variação	
Entre populações	4	3,337	0,044	29,25%	0,292*
Dentro de populações	81	8,721	0,107	70,75%	
Total	85	12,058	0,152		

Tabela 2.5 - Diferenciação genética par a par entre cinco populações de *E. nigrita*. Valores de Φ_{ST} obtidos, por meio da AMOVA, nas cinco áreas estudadas. *Valores significativos ($P < 0,05$)

Entre populações	Φ_{ST}
PNRJ x CAR	0,14
PNRJ x PN	0,17*
PNRJ x PEPCV	0,42*
PNRJ x PEI	0,05
CAR x PN	-0,02
CAR x PEPCV	0,47*
CAR x PEI	-0,08
PN x PEPCV	0,52*
PN x PEI	-0,08
PEPCV x PEI	0,40*

2.5- DISCUSSÃO

Os resultados obtidos sugerem estruturação das populações nas áreas avaliadas. De um modo geral, tanto o valor global de Φ_{ST} (= 0,292) quanto os valores obtidos para cinco pares de amostras de *E. nigrita* aqui analisados para um segmento de 499 pb do gene 16S, indicaram uma importante estrutura populacional para a espécie estudada. Embora, os resultados do presente estudo devam ser analisados com cautela, e análises adicionais se façam necessárias em razão do reduzido tamanho do segmento de DNAm analisado e à baixa variação deste segmento, os resultados deste estudo apontam, inicialmente, para uma diferenciação genética variando de moderada a alta, conforme escala de Wright (1978).

Os resultados sugerem que as populações ao longo do litoral do RJ e ES estão restritas às suas áreas, apesar de potencialmente possuírem alta capacidade de vôo, pelo grande porte corporal, e utilizarem habitats relativamente abertos, como as áreas arbustivas de restinga que estão dispersas ao longo do litoral. Estas áreas vêm sofrendo acentuada degradação e fragmentação, o que possivelmente afeta as populações de *E. nigrita*, pela destruição de ninhos no solo e diminuição dos recursos disponíveis. Além disso, deve-se considerar que o comportamento de construir grandes agregações

(Gaglianone, 2005) e o comportamento filopátrico, como observado para outras espécies de *Epicharis* (Rocha-Filho *et al.*, 2008; Gaglianone *et al.*, 2015), levaria à utilização das mesmas áreas de nidificação ao longo dos anos, por gerações seguidas, favorecendo a estruturação genética entre as populações. Neste caso, o comportamento de escavar seus ninhos próximo ao ninho materno seria um fator limitador do fluxo gênico entre populações, mesmo que próximas geograficamente.

Com base em estudos realizados com outros grupos de abelhas, como abelhas das orquídeas (Cerântola *et al.*, 2011; López-Urbe *et al.*, 2014), é possível que o macho de *Epicharis nigrita* seja o sexo dispersor e que fêmeas teriam um comportamento filopátrico. No presente estudo, apenas 12 (ou 13,9%) dos 86 indivíduos analisados eram machos e, portanto, os resultados obtidos são baseados em análises feitas sobretudo em amostras de fêmeas. Portanto, não se deve descartar que o elevado grau de diferenciação genética encontrado seja devido à análise de fêmeas, mais associadas às áreas de nidificação.

Apesar das limitações dadas pelas diferenças nos números de indivíduos analisados entre as diferentes áreas, e dos poucos sítios polimórficos encontrados, ao se interpretar o mapa de haplótipos, chama a atenção o fato de que dentre os cinco pares de amostras que mostraram uma diferenciação genética alta, quatro destes envolveram a amostra PEPCV, do Espírito Santo. Tal diferenciação pode ser explicada pelo fato desta amostra apresentar predominantemente o haplótipo 3 (H3), dentre seus 11 indivíduos analisados, e apenas alguns indivíduos com haplótipo H1, o qual foi o mais frequente para as demais amostras. O baixo número de passos mutacionais entre os quatro haplótipos encontrados atesta para a estreita relação genética entre estes.

Ao se comparar os resultados do presente estudo com os obtidos para espécies de *Centris* por Moure-Oliveira (2013), quanto ao tamanho do fragmento amplificado, para o mesmo par de *primers* (16SII), os níveis de diversidade genética observados naquele estudo foram superiores ao deste estudo. No presente trabalho, em parte, muito provavelmente, a baixa diversidade genética encontrada para as cinco amostras de *E. nigrita*, deve-se ao tamanho reduzido do segmento do gene *16S* analisado. Em razão disto, para uma avaliação mais acurada da diversidade genética das populações desta espécie, como já salientado acima, novas análises serão necessárias. A literatura mostra que uma

combinação maior de haplótipos pode ser obtida a partir de sequências concatenadas de vários genes mitocondriais (Frantine-Silva *et al.*, 2017; Luna-Lucerna *et al.*, 2017).

Gargalos genéticos, que por sua vez, ocorrem a partir de uma redução no tamanho da população, causado, por exemplo, pela perda de habitat, é uma outra causa a se considerar (Frankham *et al.*, 2008). Os sobreviventes iniciam uma nova população, na maioria das vezes, na mesma área ocupada pela população original, o que leva à redução da diversidade genética da população. A baixa heterozigosidade encontrada em alguns estudos com abelhas e outros Hymenoptera vem sendo explicada por este fenômeno, como é o caso de trabalhos desenvolvidos com outras abelhas (por exemplo *Bombus ignatus*, Shao *et al.* 2004) e com formigas *Diacamma indicum*, Viginier *et al.* 2004) e *Formica cinerea*, Goropashnaya *et al.* 2001).

Em relação à significativa diferenciação genética encontrada entre as abelhas de PEPCV e as demais áreas, é possível que as condições ambientais, como pequeno tamanho do fragmento e proximidade à região urbana ou fragmentação de habitat, possam estar influenciando neste resultado. Futuras análises devem considerar características da paisagem para entender quais os fatores associados à diferenciação genética e, assim, buscar medidas para a conservação, em médio e longo prazo, das espécies de abelhas na restinga.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho sugerem que devido à interações de *Epicharis nigrita* com características particulares do meio em que vive, como por exemplo, o uso de solo arenoso, característico do habitat de restinga e o uso de recursos (óleo e pólen) proveniente principalmente de flores de *Byrsonima sericea*, como mostrado neste estudo, essa espécie de abelha estaria mais vulnerável a alterações do ambiente em consequência da fragmentação e, dessa forma, necessitaria de uma maior atenção quanto à conservação de suas populações. Diante disso, seria interessante um estudo mais aprofundado que utilize o pólen proveniente não somente da escopa dessas abelhas, mas também de conteúdo dos ninhos em diferentes condições para avaliar possíveis fontes alternativas, principalmente em relação ao pólen utilizado como alimento de sua prole. O conhecimento das espécies de plantas utilizadas como fonte de recursos para futuros polinizadores será importante para a conservação desses insetos e conseqüentemente de seus habitats.

O resultados também sugerem que possivelmente as abelhas estariam substituindo as espécies de plantas fornecedoras de recursos florais ao longo do litoral do Rio de Janeiro e Espírito Santo, indicando que características ambientais, tais como: o isolamento dos fragmentos, composição florística e grau de degradação influencia a disponibilidade de recurso para essas abelhas, podendo levar ao isolamento das populações e conseqüentemente a alta diferenciação genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, C.M.L.; ZANELLA, F.C.V.; MARTINS, C.F. & CARVALHO, C.A.L. 2003. Plantas visitadas por *Centris* spp. (Hymenoptera: Apidae) na caatinga para obtenção de recursos florais. *Neotropical Entomology*, 32: 247-259.
- ALVES DOS SANTOS, I.; MACHADO, I.C. & GAGLIANONE, M.C. 2007. História natural das abelhas coletoras de óleo. *Oecologia Brasiliensis*, 11: 242-255.
- ARAÚJO, D.S.D. & LACERDA, L.D. 1987. A natureza das restingas. *Ciência Hoje*, 6: 42-48.
- ARAUJO, D.S.D.; SCARANO, F.R.; SÁ, C.F.; KURTZ, B.C.; ZALUAR, H.L.T.; MONTEZUMA, R.C.M. & OLIVEIRA, R.C. 1998. Comunidades Vegetais do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. Pp. 39-62. In: F.A. Esteves (Ed.). *Ecologia das Lagoas Costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé, RJ*. UFRJ, RJ.
- ARAÚJO, E.; ARAÚJO, F.P.A.; SAKITA, M.T.; FIGUEIROA, J.G.S.; SOUZA, H.A.F. 2009. Dynamical Vibration System Modeling by using Particle Swarm Optimization with Turbulence. *Proceedings of the XX International Congress of Mechanical Engineering (COBEM)*, Gramado, RS.
- ARIAS, M.C. & W.S. SHEPPARD. 1996. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5: 557-566.
- ARIAS, M.C.; A.E.E. SOARES, & F.G. NOBREGA. 1990. Improvements to the mitochondrial restriction maps for Italian and Africanized honey bees. *Brazilian Journal of Genetics* 13: 501-507.
- ARIAS, M.C.; FRANCISCO, F.O. & SILVESTRE, D. 2003. O 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.
- ASSUMPÇÃO, J. & NASCIMENTO, M.T. 2000. Estrutura e composição florística de quatro formações vegetais de restinga no complexo lagunar Grussaí/Iquipari, São João da Barra, RJ, Brasil. *Acta Botanica Brasílica*, 14(3): 301-315.
- AUGUSTO, S.C.; GOLÇALVES, P.H.P.; FRANCISCO, F.O.; SANTIAGO, L.R.; FRANÇOSO, E.A.; SUZUKI, K.M.; SOFIA, S.H.; SIMÕES, Z.L.P. & ARIAS, M.C. 2012. Microsatellite loci for the carpenter bee *Xylocopa frontalis* (Apidae, Xylocopini). *Conservation Genetics Resources*, 4: 315–317.

- AVISE, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York, Chapman & Hall. 511p.
- BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16:37-48.
- BATAGELJ, V.; MRVAR, A. 1998. Pajek-a program for large network analysis. *Connections*, 21(2): 47–57.
- BIGARELLA, J.J. 1947. Contribuição ao estudo da planície litorânea do Estado do Paraná. *Bol. Geogr.* 55: 747-779.
- BOFF, S.; SORO, A.; PAXTON, R.J. & ALVES-DOS-SANTOS, I. 2014. Island isolation reduces genetic diversity and connectivity but does not significantly elevate diploid male production in a neotropical orchid bee. *Conservation Genetics*. 10p.
- BRAZ, D.M.; JACQUES, E.L.; SOMNER, G.V.; SYLVESTRE, L.S.; ROSA, M.M.T; PEREIRAMOURA, M.V.L.; GERMANO-FILHO, P.; COUTO, A.V.S. & AMORIM, T.A. 2013. Restinga de Praia das Neves, ES, BR: caracterização fitofisionômica, florística e conservação. *Biota Neotropica*, 13(3): 315-331.
- BROWN, M.J.F. & PAXTON, R.J. 2009. The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie*, 40: 410–416.
- CAMARGO, J.M.F.; ZUCCHI, R. & SAKAGAMI, S.F. 1975. Observations on the bionomics of *Epicharis (Epicharana) rustica flava* (olivier) including notes on its parasite *Rhathymus* sp. (Hymenoptera, Apoidea: Anthophoridae). *Studia Entomological*, 18: 313-340.
- CERÂNTOLA, N.C.M; CERVINI, M. & DEL LAMA, M.A. 2011. Genetic differentiation of urban populations of *Euglossa cordata* from the state of São Paulo, Brasil. *Apidologie*. 42(2): 214-222.
- CESÁRIO, L.F. & GAGLIANONE, M.C. 2008. Biologia floral e fenologia reprodutiva de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em Restinga do Norte Fluminense. *Acta Botanica Brasílica*, 22(3): 828-833.
- CESÁRIO, L.F. 2007. Recompensas florais e visitantes de duas espécies simpátricas de *Clusia*, *Clusia hilariana* Schltd e *Clusia spiritu-sanctensis* Mariz & Weinberg (Clusiaceae), em áreas de restinga. *Dissertação* (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes. 58p.
- COOK, J.M. & CROZIER, R.H. 1995. Sex determination and population biology
- CORREIA, G.G.S.E. & CREPALDI, M.O.S. 2011. Taxas de crescimento e mortalidade de espécies em áreas em restauração, Parque Estadual de Itaúnas, ES. *In: Anais do Congresso Brasileiro de Reflorestamento Ambiental, Guarapari-ES.*

- COSTA, C.B.N., COSTA, J.A.S. & RAMALHO, M. 2006. Biologia reprodutiva de espécies simpátricas de Malpighiaceae em dunas costeiras da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 2
- COVILLE, R.E.; FRANKIE, G.W. & VINSON, S.B. 1983. Nests of *Centris segregata* (Hymenoptera: Anthophoridae) with a review of the nesting of the genus. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 56(2): 109-122.
- DEPRÁ, M. S.; MENEZES, G. B.; GAGLIANONE, M. C. 2015. Oilcollecting bees associated with *Byrsonima sericea* DC (Malpighiaceae) in restinga and atlantic rain forest. *In: XI Encontro sobre Abelhas, 2015, Ribeirão Preto. Anais XI Encontro sobre Abelhas.*
- DUNLEY, B.S.; FREITAS, L. & GALETTO, L. 2009. The reproduction of *Byrsonima sericea* (Malpighiaceae) in fragmented habitats of the Restinga of Southeastern Brazil. *Biotropica* (Lawrence, KS), 41: 692-699.
- EICKWORT, G.C. & GINSBERG, H.S. 1980. Foraging and mating behavior in Apoidea. *Annual Review of Entomology*, 25: 421-447.
- EITEN, G. 1983. Classificação da Vegetação do Brasil. Brasília. *CNPq./Coordenação editorial*. 305p.
- ERDTMAN, G. 1960. The acetolized method. A revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift*, 54: 561-564.
- EXCOFFIER, L. & LISCHER, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567.
- EXCOFFIER, L. G. L., SCHNEIDER S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47-50.
- FARIAS, R. C. A. P.; MADEIRA-DA-SILVA, M. C.; PEREIRA-PEIXOTO, M. H. & MARTINS, C. F. 2007. Horário de Atividade de Machos de Euglossina (Hymenoptera: Apidae) e preferência por fragrâncias artificiais em Mata e Dunas na área de proteção ambiental da Barra do Rio Mamanguape, Rio Tinto, PB. *Neotropical Entomology*, v.3, n.6, p.863-867..
- FERREIRA, P.F. 2011. A vegetação arbustiva aberta numa área de restinga que sofreu impacto da extração de areia no Parque Estadual Paulo César Vinha - PEPCV. *Dissertação* (Mestrado em Ecologia de Ecossistemas).Centro Universitário de Vila Velha, Vila Velha. 2p.

- FRANKHAM, R. 2008. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology*. V7, 325-333.
- FRANTINE-SILVA, W.; GIANGARELLI, D.C.; PENHA RES *et al.* 2017. Phylogeography and historical demography of the orchid bee *Euglossa iopocila*: signs of vicariant events associated to quaternary climatic changes. *Conservation Genetics*. DOI:10.1007/s10592-016-0905-7
- GAGLIANONE, M. C.; WERNECK, H. A. & CAMPOS, L. A. O. 2015. Univoltine life cycle of two species of *Epicharis* Klug, 1807 (Apidae, Centridini) and notes on their cleptoparasites *Tetraonyx* spp. (Coleoptera, Meloidae). *In*: Aguiar, A.J.C.; Gonçalves, R.B.G., Ramos, K.S. (Org.). *Ensaio sobre as abelhas da região neotropical: homenagem aos 80 anos de Danúncia Urban*. 1ed. Curitiba: Editora UFPR, v. 01, 401-414.
- GAGLIANONE, M.C. 2000. Interações de *Epicharis* (Apidae, Centridini) e flores de Malpighiaceae em um ecossistema de cerrado. *In*: *Anais do IV Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto - SP*, 246-256.
- GAGLIANONE, M.C. 2001. Nidificação e forrageamento de *Centris (Ptilotopus) scopipes* Friese (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 18 (supl.1):107-117.
- GAGLIANONE, M.C. 2003. Abelhas da Tribo Centridini na Estação Ecológica de Jataí: composição de espécies e interações com flores de Malpighiaceae. *In*: *Apoidea Neotropica* (MELO, G.A.R. & ALVES-DOS-SANTOS, I., ed). UNESC, Criciúma, p.279-284
- GAGLIANONE, M.C. 2005. Nesting biology, seasonality, and flower hosts of *Epicharis nigrita* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Centridini), with a comparative analysis for the genus. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 40(3):191-200.
- GAGLIANONE, M.C. 2006. Centridini em remanescentes de Mata Atlântica: diversidade e interações com flores. *In*: *7º Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto*
- GAGLIANONE, M.C. 2010. *Biodiversidade de abelhas em fragmentos florestais e de restinga no estado do Rio de Janeiro*. *In*: *Anais do IX Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto, SP*, 32-39.
- GARNERY, L.; J.M. CORNUET & M. SOLIGNAC. 1992. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*, 1: 145-154.
- GIARETTA, A.; MENEZES, L.F.T. & PEREIRA, O.J. 2013. Structure and floristic pattern of a *restinga* in southeastern Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, 27:87-107.
- GOROPASHNAYA, A.V.; SEPPÄ, P.; PAMILO, P. 2001. Social and genetic characteristics of geographically isolated populations of the ant *Formica cinerea*. *Molecular Ecology*, 10: 2807–2818.

- 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.
- HENRIQUES, R.P.B.; ARAUJO, D.S.D. DE & HAY, J.D. 1986. Descrição e classificação dos tipos de vegetação da restinga de Carapebus, Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Botânica*, 9: 173-189
- HILLER, B. & WITTMANN, D. 1994. Seasonality, nesting biology and mating behavior of the oil-collecting bee *Epicharis dejeanii* (Anthophoridae, Centridini). *Biociências*, 2: 107-124.
- JONES, G.D.; JONES, S.D. 2001 The uses of pollen its implication for entomology. *Neotropical Entomology*, 30: 341-350.
- KREBS, C.J. 1989. *Ecological Methodology*. New York, Harper & Row, 652p.
- LACERDA, L.D.; ARAUJO, D.S.D. & MACIEL, N.C. 1982. Restingas brasileiras: uma bibliografia. Rio de Janeiro, *Fundação José Bonifácio*. 55p.
- LAMEGO, A.R. 1946. *O homem e a Restinga*. Rio de Janeiro: IBGE.
- LIBRADO, P. & ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452 | doi: 10.1093/bioinformatics/btp187.
- LINSLEY, E.G. 1958. *Ecology of solitary bees*. *Hilgardia*, 27: 543-597.
- LÓPEZ-URIBE, M.M.; ZAMUDIO, K.R.; CARDOSO, C.F.; DANFORTH, B.N. 2014. Climate, physiological tolerance and sex-biased dispersal shape genetic structure of Neotropical orchid bees. *Molecular Ecology*.
- LUNA-LUCENA, D.; MOURE-OLIVEIRA, D.; FERREIRA, K.M.; DEL LAMA, M.A. 2017. High mitochondrial DNA diversity and lack of population structure in a solitary cavity-nesting bee in an urban landscape. *Biological Journal of the Linnean Society*. DOI: 10.1093/biolinnean/blx019.
- MARTINS, A.C. 2014. Evolução das abelhas coletoras de óleos florais *Centris* e *Epicharis*: inferências a partir da filogenia molecular datada da subfamília Apinae e das plantas produtoras de óleo floral da Região Neotropical. *Tese* (Doutorado em Ciências, Área: Entomologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 13-136p.
- MARTINS, A.C.; MELO, G.A.R. & RENNER, S.S. 2015. Gain and loss of specialization in two oil-bee lineages, *Centris* and *Epicharis* (Apidae). *Evolution*. 69-7: 1835–1844.
- MMA. 2000. Avaliação e ações prioritárias para

23 a conservação da biodiversidade da mata atlântica e campos sulinos. Ministério do Meio Ambiente/SBF, Brasília.

MICHENER, C.D. (2007) *The Bees of the World*. Baltimore, The Johns Hopkins.

MORITZ, C.; DOWLING, T.E. & BROWN, W.M. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 269-292.

MOURE, J.S.; MELO, G.A.R. & URBAN D. 2012. *Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region*.

MOURE-OLIVEIRA, D. 2013. Diversidade e estrutura genética de populações urbanas de abelhas Centridini (Hymenoptera: Apidae) visitantes florais de *Tecomastans* (L) Kunth (Bignoniaceae). *Dissertação* (Mestrado em Ciências, Área: Entomologia). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP. 38p.

OLDROYD, B.P.; W.S. SHEPPARD & J.A. STELZER. 1992. Genetic characterization of the bees of Kangaroo Island, South Australia. *Journal of Apicultural Research*, 31: 141-148.

OLIVEIRA, M.G.N. & ROCHA, C.F.D. 1997. O efeito da complexidade da bromélia tanque *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith sobre a comunidade animal associada. *Bromélia*, 4:13-22.

PALMER, M.A.; AMBROSE, R.F. & POFF, N.L. 1997. Ecological theory and community ecology. *Restoration Ecology*, 5(4): 291-300.

PEDRO, S.R.M. 1994. Interações entre abelhas e flores em uma área de cerrado no NE do Estado de São Paulo: abelhas coletoras de óleo (Hymenoptera: Apoidea: Apidae). *Anais do Encontro sobre abelhas*, p.243-255.

PENDLETON, M.W.; BRYANT JR, V.M.; PENDLETON, B.B. 1996. Entomopalynology, p. 939-943. In Jansonius J., McGregor D.C. (eds) Palynology: principles and applications. *American Association of Stratigraphic Palynologists Foundation*, Dallas, TX, 1330p.

PENHA, R.E.S. GAGLIANONE, M.C. ALMEIDA, F.S. BOFF, S.V. SOFIA, S.H. 2015. Mitochondrial DNA of *Euglossa iopocila* (Apidae, Euglossini) reveals two distinct lineages for this orchid bee species endemic to the Atlantic Forest. *Apidologie*, 46: 346–358.

POTTS, S.G.; BIESMEIJER, J.C.; KREMEN, C., NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O & KUNIN, W.E. 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(6): 345-353.

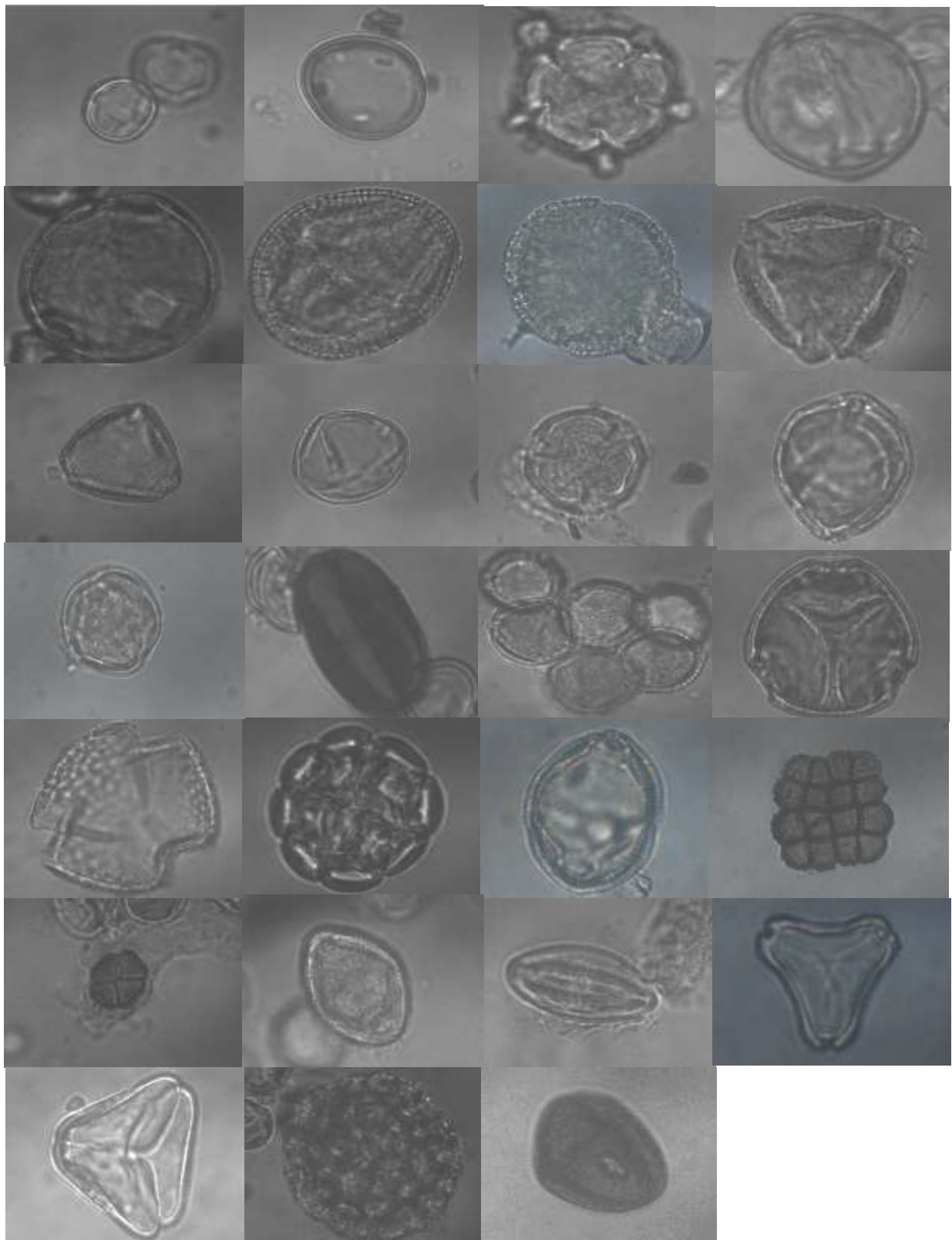
- RAW, A. 1992. Mate searching and populations size of two univoltina, solitary species of the bee genus *Epicharis* (Hymenoptera) in Brazil with records of threats to nesting populations. *Entomologist*. 111: 1-9.
- REYS, M.M. DO C. 1997. Manuscritos de Manoel Martinz do Couto Reys, 1785. *Arquivo Público do Estado do Rio de Janeiro*.
- ROBERTSON, C. 1925. Heterotropic bees. *Ecology*, 6: 412-436.
- ROCHA-FILHO, L. C.; SILVA, C. I.; GAGLIANONE, M. C. & AUGUSTO S. C. 2008. Nesting behavior and natural enemies of *Epicharis* (*Epicharis*) *bicolor* Smith 1854 (Hymenoptera Apidae). *Tropical Zoology*, 21:227-242.
- ROCHA, C.F.D. & BERGALLO, H.G., 1997, Intercommunity variation in the distribution of abundance of dominant lizard species in restinga habitats. *Ciência e Cultura*, 49: 269-274.
- ROCHA, C.F.D., 2000, Biogeografia de répteis de restinga, pp. 99-116. In: Lacerda, L.D. & Esteves, F.A. (eds.), *Ecologia de Restingas e Lagoas Costeiras*. NUPEM/ UFRJ, Macaé, RJ.
- ROCHA, C.F.D.; BERGALLO, H.G.; ALVES, M.A.S. & SLUYS, M.V. 2003. *A biodiversidade nos grandes remanescentes florestais do Estado do Rio de Janeiro e nas restingas da Mata Atlântica*. São Carlos: Rima Editora. 163p.
- ROCHA, C.F.D.; VAN SLUYS, M.; BERGALLO, H.G. & ALVES, M.A.S. 2005. Endemic and threatened tetrapods in the restingas of the biodiversity 24 corridors of Serra do Mar and of the Central da Mata Atlântica in eastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 65(1): 159 - 168.
- ROCHA-FILHO, L.C.; C.I. SILVA; M.C. GAGLIANONE & S.C. AUGUSTO. 2008. Nesting behavior and natural enemies of *Epicharis* (*Epicharis*) *bicolor* Smith 1854. (Hymenoptera, Apidae). *Tropical Zoology* 21: 227-242.
- RODRIGUES, R.R. & GANDOLFI, S. 2000. Conceitos, Tendências e Ações para a Recuperação de Florestas Ciliares. In: Rodrigues, R.R. & LeitãoFilho, H.F. *Matas Ciliares: Conservação e Recuperação*. São Paulo: EDUSP, FAPESP. 235-247p.
- ROUBIK, D.W. & MICHENER, C.D. 1980. The seasonal cycle and nests of *Epicharis zonata*, a bee whose cells are below the wet-season water table (Hymenoptera, Anthophoridae). *Biotropica*, 12 (1): 56-60.
- SCHLINDWEIN, C.; WITTMANN, D.; MARTINS, C.F.; HAMM, A.; SIQUEIRA, J.A.; SCHIFFLER, D. & MACHADO, I.C. 2005. Pollination of *Campanula rapunculoides* L. (Campanulaceae): How much pollen flows into pollination and into reproduction of oligolectic pollinators? *Plant Systematics and Evolution* 250: 147-156.

- SHAO, Z.Y.; MAO, H.X.; FU, W.J. 2004. Genetic structure of Asian populations of *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Heredity* 95: 46–52.
- SILVA, F.O.; VIANA, B.F. & NEVES, E.L. 2001. Biologia e arquitetura de ninhos de *Centris (Hemisiella) tarsata* Smith (Hymenoptera, Apidae, Centridini). *Neotropical Entomology*, 30(4): 541-545.
- SILVA-JÚNIOR, J.L.P. 2011. Diversidade de espécies e aspectos da nidificação de Aculeata (Insecta, Hymenoptera) não sociais em ninhos armadilha em fragmento de Mata Atlântica e área urbana. *Dissertação* (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes. 107p.
- SIQUEIRA DE CASTRO, M. 2002. *Bee fauna of some tropical and exotic fruits: Potential pollinators and their conservation*. pp. 275-288.
- SMITH, D. R.; L. VILLAFUERTE; G. OTIS & R. PALMER. 2000. Biogeography of *Apis cerana* F. and *A. nigrocincta* Smith: insights from mtDNA studies. *Apidologie*, 31: 265-279.
- SOFIA, S.H.; PAULA, F.M.; SANTOS, A.M.; ALMEIDA, F.S.; SODRÉ, L.M.K. 2005. Genetic structure analyses of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae) populations from southern Brazilian Atlantic rainforest remnants. *Genetics and Molecular Biology*, 28: 479-484.
- SUGUIO, K. & TESSLER, M. G. 1984. Planícies de cordões litorâneos quaternários do Brasil: Origem e nomenclatura. Pp. 15-26. In: *Restingas Origem, Estrutura e Processos*. CEUFF, Niterói.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- TEIXEIRA, L.A.G. & MACHADO, I.C. 2000. Sistemas de polinização e reprodução de *Byrsonima sericea* DC (Malpighiaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 14:347-357.
- THIELE, R. & INOUE, B.D. 2007. Nesting biology, seasonality, and mating behavior of *Epicharis metatarsalis* (Hymenoptera: Apidae) in Northeastern Costa Rica. *Annals of the Entomological Society of America* 100: 596-602.
- THOMPSON, J.D. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.
- VESEY-FITZGERALD, D. 1939. Observations on bees (Hymenoptera: Apoidea) in Trinidad, B.W.I. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London* (A), 14: 107-110
- VIANA, B.F.; ALVES-DOS-SANTOS, I. 2002. Bee diversity of the coastal sand dunes of Brazil, p.135-153. In Kevan P, Imperatriz Fonseca V.L. (eds),

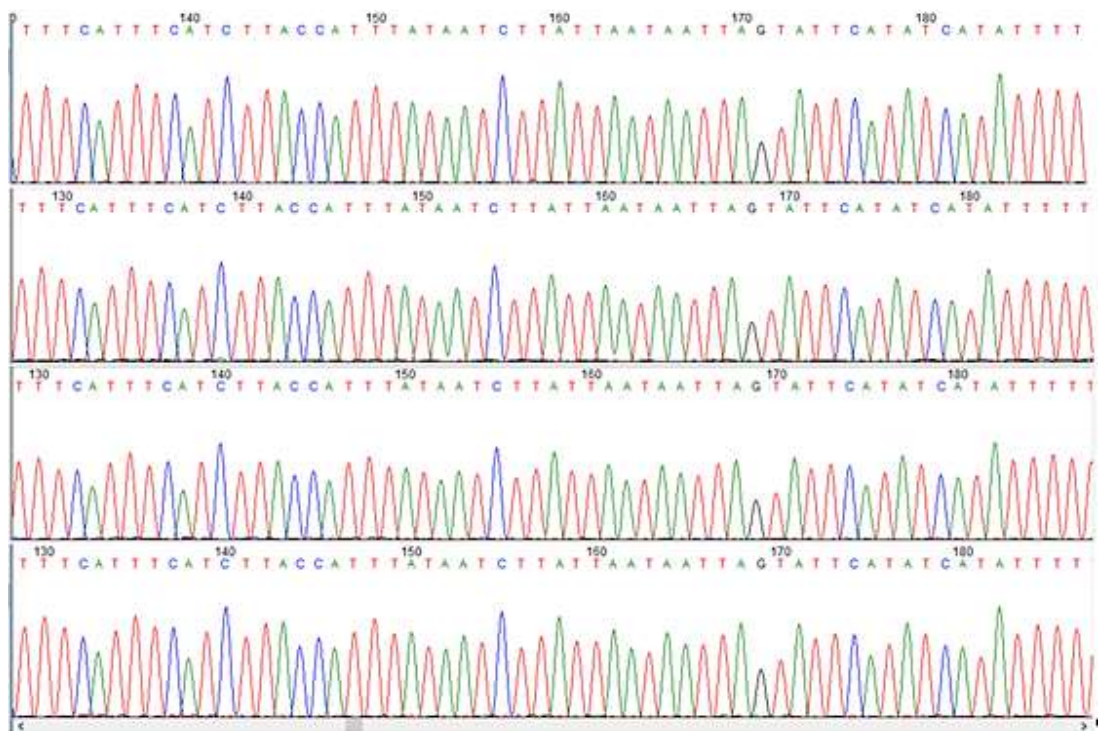
Pollination bees – *The conservation link between agriculture and nature* – Ministry of Environment/Brasília, 313p.

- VIGINIER, B.; PEETERS, C.; BRAZIER, L. & DOUMS, C. 2004. Very low genetic variability in the Indian queen less ant *Diacamma indicum*. *Molecular Ecology*, 13: 2095–2100.
- VOGEL, S. 1974. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. *Tropische und Subtropische Pflanzenwelt*, 7: 285-547.
- WERNECK, H.A. & CAMPOS, L.A.O. 2012. Seasonal cycle, rate of parasitism and sex rate of *Epicharis (Epicharoides) picta* (Apidae: Centridini). *In: Anais do X Encontro sobre Abelhas*. Ribeirão Preto, SP, São Paulo.
- WERNECK, H.A. 2012. Biologia de nidificação, sazonalidade e inimigos naturais de *Epicharis (Epicharoides) picta* (Smith, 1874) (Apidae: Centridini) no município de Viçosa, MG – Brasil. Viçosa, *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Viçosa, 104p.
- WINFREE, R.; AGUILAR, R.; VAZQUEZ, D.P.; LEBUHN, G. & AIZEN M.A. 2009. A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. *Ecology* 90(8):2068–2076.
- ZAYED, A. 2009. Bee genetics and conservation. *Apidologie*, 40: 237–262.
- ZIMMERMANN, Y.; SCHORKOPF, D. L. P.; MORITZ R, F. A.; PEMBERTON, R. W.; QUEZADAEUAN; J. J. G. & ELTZ, T. 2011. Population genetic structure of orchid bees (Euglossini) in anthropogenically altered landscapes. *Conservation Genetics*. DOI 10.1007/s10592-011-0221.

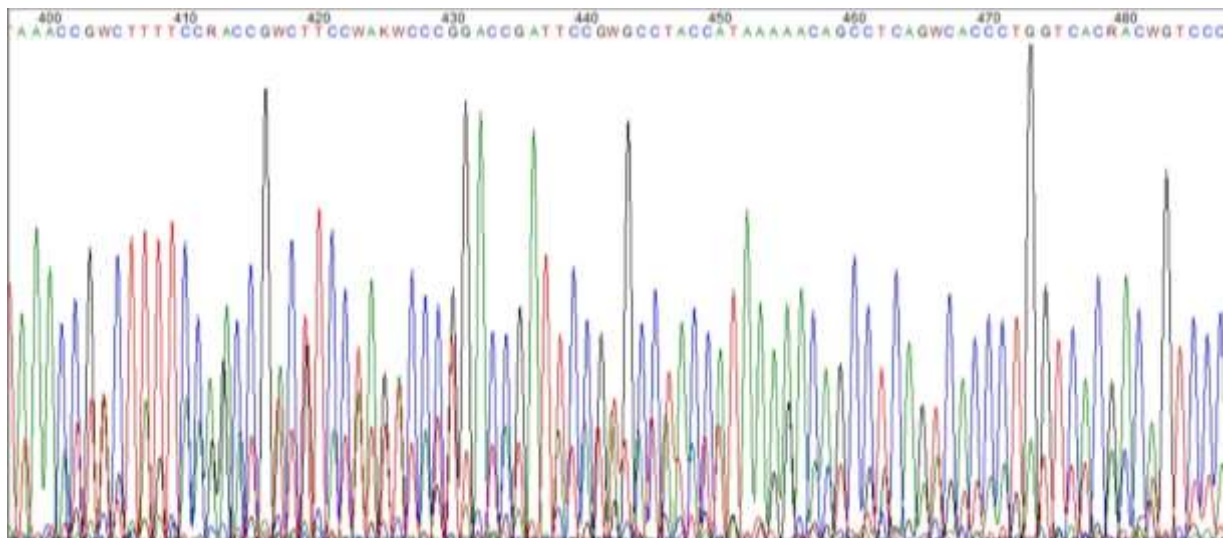
APÊNDICES



Apêndice I- Tipos polínicos amostrados das fêmeas de *Epicharis nigrita* no litoral dos estados do Rio de Janeiro (RJ) e Espírito Santo (ES), Brasil.



Apêndice II - Eletroferograma da região *CytB* em *Epicharis nigrita*.



Apêndice III - Eletroferograma da região 16S de *E. nigrita*, com elevado grau de picos duplos.