



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DOUGLAS CALDEIRA GIANGARELLI

**AS ABELHAS DAS ORQUÍDEAS DA ILHA DO SUPERAGUI:
UMA ABORDAGEM ECOLÓGICA E MOLECULAR**

Londrina
2017

DOUGLAS CALDEIRA GIANGARELLI

**AS ABELHAS DAS ORQUÍDEAS DA ILHA DO SUPERAGUI:
UMA ABORDAGEM ECOLÓGICA E MOLECULAR**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Sofia.

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de
Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Giangarelli, Douglas Caldeira.

As abelhas das orquídeas da Ilha do Superagui: Uma abordagem ecológica e
molecular / Douglas Caldeira Giangarelli. - Londrina, 2016.
126 f. : il.

Orientador: Silvia Helena Sofia.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,
2016. Inclui bibliografia.

1. Ecologia de abelhas - Teses. 2. Abelhas Euglossini - Teses. 3. Ilha do
Superagui - Teses. I. Sofia, Silvia Helena. II. Universidade Estadual de Londrina.
Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
III. Título.

DOUGLAS CALDEIRA GIANGARELLI

**AS ABELHAS DAS ORQUÍDEAS DA ILHA DO SUPERAGUI:
UMA ABORDAGEM ECOLÓGICA E MOLECULAR**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dra. Silvia Helena Sofia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dra. Solange Cristina Augusto
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Prof. Dr. Carlos Alberto Garófalo
Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. José Eduardo Lahoz da Silva Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Carlos Eduardo de Alvarenga Júlio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de Setembro de 2015

***DEDICO A MINHA QUERIDA FILHA CAROLINA,
MINHA ESPOSA MARINA, AOS MEUS PAIS,
ONILSON E THEREZINHA, MINHA IRMÃ PATRICIA E
MINHA ORIENTADORA SILVIA H. SOFIA, PELA
AMIZADE, COMPANHEIRISMO, APOIO E PACIÊNCIA.***



AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra Silvia Helena Sofia, por compartilhar comigo seu conhecimento ao longo destes doze anos, por me permitir crescer como biólogo, pela dedicação, paciência, amizade e muito mais, obrigado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

Aos colegas de Laboratório: Wilson, Dhiego e Lenice por ter tido muita paciência e disponibilidade em me auxiliar nas análises moleculares, além da grande amizade e companheirismo.

Henrique, Cecilia, Camila, Elisa, Natalia, Diogo, Carol, Same, Faustinho, Rafael (Caconde), Raul, pelo companheirismo, amizade e ajuda e nas coletas.

Ao Dr. Gabriel Melo pelo valioso auxílio na identificação de alguns dos espécimes coletados.

À Profa. Dra. Solange Cristina Augusto e Prof. Dr. Carlos Alberto Garófalo, Prof. Dr. Carlos Eduardo Alvarenga Julio, Prof. Dr. José Eduardo Lahoz da Silva Ribeiro, membros da banca examinadora, pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho.

À Guadalupe Vivekananda e Marcelo Bresolin, responsáveis pelo Parque Nacional do Superagui (PNS), pelo apoio na realização desse trabalho.

Ao pessoal do PNS pelo apoio técnico e nas coletas.

À Universidade Estadual de Londrina e ao pessoal do transporte, pelo auxílio na logística e a boa vontade em ajudar na execução do trabalho.

Ao IBAMA e o IMCBio pela liberação da realização das amostragens no PNS.

À CAPES e Fundação Araucária pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.



À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina e ao Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina por possibilitar a realização deste trabalho.

Às Professoras Fernanda Simões Almeida e Cláudia Bueno dos Reis Martinez, pela amizade, conselhos e auxílio.

À Carolina Ricci Giangarelli, minha amada e querida filha, por fazer uma alegria imensa todos os meus dias.

À Marina C. R. Giangarelli, minha linda esposa, pela dedicação, companheirismo, ajuda em todos os momentos.

Aos meus pais Onilson B. Giangarelli e Therezinha Ap. C. Giangarelli pelo apoio, incentivo e confiança em todas as minhas decisões.

À minha irmã Patricia M. Giangarelli, pela amizade, companheirismo em todos os momentos.

À Toninha, Carlão, Juliana, Marquinhos e meu sobrinho Victor, por sempre me incentivar e acreditar na minha caminhada.

À Galera do Cachaçamba, pela amizade, camaradagem, incentivo, churrascos, futebol e rodas de samba.

MUITO OBRIGADO A TODOS!



APRESENTAÇÃO

Este trabalho de tese faz parte de um projeto que idealizou um estudo mais amplo visando o conhecimento de Euglossini na região da Área de Proteção Ambiental (APA) de Guaraqueçaba. O projeto como um todo teve início com um trabalho desenvolvido na Reserva Natural Salto Morato, localizada no município de Guaraqueçaba (PR). O interesse pela região da APA de Guaraqueçaba reside no fato desta região fazer parte do Corredor de Biodiversidade da Serra do Mar, o qual constitui um dos maiores remanescente de Mata Atlântica do litoral brasileiro. Fazendo parte deste extenso remanescente de Mata Atlântica, encontra-se o Parque Nacional do Superagui, que inclui no seu domínio a Ilha do Superagui. Esta Ilha foi formada artificialmente, podendo ser, deste modo, considerada como resultado de um processo de fragmentação de habitat, ocasionado por ação antrópica. Neste contexto, as comunidades de abelhas das orquídeas da Ilha do Superagui tornaram-se o foco do presente trabalho, o qual está assim dividido: i) uma Introdução Geral, que trata principalmente de aspectos relativos à Mata Atlântica e as abelhas da tribo Euglossini; ii) Capítulo 1, intitulado “A comunidade de abelhas Euglossini da Ilha do Superagui: Diversidade em áreas de Floresta Ombrófila Densa e Restinga”, apresentado na forma de um manuscrito científico, o qual aborda e discute os resultados das comunidades de Euglossini amostradas nestes dois tipos de fitofisionomias de Mata Atlântica da Ilha do Superagui; iii) Capítulo 2, intitulado “Variações temporais e similaridades no uso de fragrâncias aromáticas por machos de Euglossini”, também apresentado na forma de um manuscrito. Neste capítulo, como o próprio título indica, são analisados vários aspectos ecológicos relacionados à exploração de fragrâncias químicas artificiais por machos euglossíneos; iv) Capítulo 3, intitulado “Orchid bees: a new assessment on the rarity of diploid males in populations of this group of Neotropical pollinators”, publicado na revista *Apidologie*. Este artigo faz uma análise de machos diploides de populações de seis espécies de Euglossini amostradas em diferentes remanescentes de Mata Atlântica, mostrando graus distintos de interferência antrópica. Dentre as populações estudadas estão a de duas espécies coletadas na Ilha do Superagui; v) Conclusões finais.



GIANGARELLI, Douglas Caldeira. **As abelhas das orquídeas da Ilha do Superagui: uma abordagem ecológica e molecular.** 2016. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

As abelhas da tribo Euglossini formam um grupo distinto dentro da família Apidae, por apresentar particularidades restritas a esta tribo, como a coleta de fragrâncias em fontes florais e não-florais, realizadas por seus machos. O grupo mostra forte associação de seus machos com flores de orquídeas, sendo a tribo popularmente conhecida como abelhas das orquídeas. Em áreas de Mata Atlântica localizadas no sul do Brasil, os estudos com este grupo de abelhas ainda são escassos. Visando contribuir para um maior conhecimento das comunidades de Euglossini presentes em latitudes sul acima de 25°, onde apenas uns poucos estudos foram realizados até o presente, este trabalho teve como objetivo estudar as comunidades de Euglossini de duas fitofisionomias de Mata Atlântica, Floresta Ombrófila Densa (FOD) e Restinga, da Ilha do Superagui (IS). Outro objetivo deste trabalho foi comparar a comunidade destas abelhas amostradas na área de FOD da IS com os resultados obtidos em um outro estudo realizado em uma reserva particular localizada no continente e cerca de 24 km da IS. Além disto, outro foco de interesse foi o de analisar as similaridades nas escolhas de fragrâncias e amplitude e sobreposição de nichos de diferentes espécies na busca por tais fragrâncias artificiais. Além desta abordagem ecológica, este estudo analisou as frequências de machos diploides de diferentes espécies de Euglossini, incluindo entre estas duas espécies amostradas na IS, para avaliar possíveis variações nas frequências de ocorrências destes machos em populações de ambientes mais e menos preservados. O estudo da IS foi realizado entre Nov/2011 e Mar/2014. Contudo, as amostragens na área de Restinga tiveram início um ano mais tarde (Nov/2012) e se estenderam até Mar/2014. Assim, foram realizadas 10 coletas mensais na Restinga e 15 na área de FOD. Para as amostragens foram utilizadas iscas-odores de oito fragrâncias químicas para a atração de machos euglossíneos. Estes foram coletados com armadilhas e rede entomológica. Os principais resultados foram: a) nas dez amostragens realizadas simultaneamente nas áreas de FOD e Restinga da IS, foram capturados 266 machos, de quatro gêneros e 13 espécies de Euglossini na área de FOD. *Euglossa stellfeldi* e *Euglossa annectans* foram as duas espécies mais abundantes nesta fitofisionomia. Na Restinga foram coletados 64 machos, pertencentes a três gêneros e oito espécies. Nesta fitofisionomia *Euglossa cordata* e *Euglossa stellfeldi* foram as espécies mais abundantes. Considerando-se riqueza, abundância e dominância de espécies, os dois tipos de fitofisionomias da IS diferiram significativamente na estrutura das comunidades destas abelhas; b) a comparação das comunidades de Euglossini das áreas de FOD da IS e da reserva no continente mostraram uma fauna muito similar, mas revelando estruturas distintas em termos de dominância de espécies; c) nos três anos de amostragens, realizadas durante a estação quente-úmida na área de FOD da IS, foram coletados 378 machos de 13 espécies. *Euglossa annectans* foi a espécie que mostrou maior diversidade no conjunto de fragrâncias exploradas e maior amplitude de nicho em relação às outras três espécies mais abundantes na área estudada. *Euglossa roderici* foi a espécie que mostrou a menor sobreposição de nicho e similaridade na exploração das fragrâncias disponíveis; d) em relação às análises genéticas, os resultados revelaram que as frequências de machos diploides mantiveram-se abaixo de 10%, para cinco das seis espécies estudadas, entretanto, em três populações de *Euglossa annectans* as frequências destes machos ficaram acima de 15,0%. Tal espécie foi apontada como potencialmente mais sensível a interferências antrópicas no ambiente.

Palavras-chave: Comunidade de Euglossini. Mata Atlântica. Floresta Ombrófila Densa. Restinga. Machos diploides.



GIANGARELLI, Douglas Caldeira. **The orchid bees of Superagui Island: an ecological and molecular approach.** 2016. 126 p. Thesis (Doctoral degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Bees of the Euglossini tribe popularly known as orchid bees given the strong association of males with orchid flowers. Males of the tribe acquire fragrance from floral and non-floral sources, which represent a unique characteristic within the Apidae family. In southern regions of the Atlantic Forest Brazil, studies with this group of bees are still scarce. In the present study we survey Euglossini communities in two types of vegetation in the southern the Atlantic Forest in the Superagui Island (SI): Forest Dense (FOD) and Restinga. Our goal was to compare the community of these bees sampled in the FOD at the SI with the results obtained in another study in a private reserve located on the mainland, distant about 24 km from SI. It was also analyzed the use and, similarities regarding fragrance choices, and breadth and niche overlap of different species in the search for chemical fragrances. Moreover, this study analyzed the frequency of diploid males of different species of Euglossini, including two species sampled the SI, to assess possible changes in the frequency of occurrences of these males in populations of more and less preserved environments. The study at the SI was carried out between Nov / 2011 and Mar / 2014. However, the samples in the Restinga began a year later (Nov / 2012) and extended to Mar / 2014. Thus, there were 10 monthly collections in Restinga and 15 in the FOD. Eight chemical fragrances were used to attract euglossine males. These were collected with traps and entomological net. The main results were: a) the ten surveys carried out simultaneously in the FOD and Restinga areas, resulted in 266 males, comprising four genera and 13 species captured at FOD area. *Euglossa stellfeldi* and *Euglossa annectans* were the two most abundant species in this type of vegetation. In the Restinga, during the surveys were sampled 64 males belonging to three genera and eight species. In this vegetation type *Euglossa cordata* and *Euglossa stellfeldi* were the most abundant species. Considering richness, abundance and dominance of euglossine bees species surveyed in the two types of ecosystems in the IS, differed considerably in the structure of communities of these bees; b) the comparison between Euglossini communities from both FOD areas surveyed (SI and mainland preserved) showed a very similar richness, but different structures in terms of dominance of species; c) in the three years of surveys, performed during the warm-wet season, in the FOD at the SI, it was collected 378 males from 13 species. *Euglossa annectans* was the species that showed the higher diversity concerning the set of fragrances visited and the higher niche breadth in comparison with the other three most abundant species in the study area. *Euglossa roderici* was the species that showed the smallest niche overlap and similarity with the other three abundant species; d) in relation to genetic analysis, the results revealed that the frequency diploid males stayed below 10%, for five of the six studied species. However, in three populations of *Euglossa annectans* the frequencies of these males were above 15.0%. It has been suggested that this orchid bee species is potentially sensitive to anthropogenic disturbance.

Keywords: Euglossini community. Atlantic Forest. Ombrophilous Dense Forest. Restinga. Diploid males.



LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1. Dados do histórico do desmatamento anual de 2005 até 2014, para o Bioma Mata Atlântica (Fonte: SOS Mata Atlântica/INPE, 2015) 5

Capítulo 1: A comunidade de abelhas Euglossini da Ilha do Superagui: Diversidade em áreas de Floresta Ombrófila Densa e Restinga

Tabela 1. Número de machos (N), porcentagem (%), dominância (D), frequência de ocorrência (FO) e as categorias (Ct) das diferentes espécies de Euglossini coletadas nos dois tipos de fitofisionomias (FOD = Floresta Ombrófila Densa; RES = Restinga) amostradas na Ilha do Superagui, Estado do Paraná, Brasil. d = dominante; o = espécie ocasional; a = acessória. mf = muito frequente; f = frequente; pf = espécie pouco frequente. Categorias: C = comum; I = intermediárias e R = rara. H' = diversidade de Shannon; J' = equidade de Pielou e DBP = índice de dominância de Berger Parker 42

Tabela S1. Comparação com os dados do presente trabalho com os dados de outros trabalhos realizados no corredor da Serra do Mar nos estados do Paraná e São Paulo. PR(ILHA)-1= dados do presente trabalho; PR(CON)-1 = Giangarelli (2011); PR(CON)-2 = Mattozo et al. (2011); SP(CON)-1 e SP(ILHA)-1 = Rocha-Filho e Garófalo (2013); SP(CON)- 2 e SP(ILHA)-2 = Cordeiro et al. (2013). PR = Paraná, SP = São Paulo, C= Região Continental e I= Região Insular. FOD= Floresta Ombrófila Densa; Esforço amostral = número de horas de coleta; H' = Índice de diversidade de Shannon-Wiener; J' = Equidade de Pielou; Essências: 1) eucaliptol; 2) eugenol; 3) beta-ionona; 4) vanilina; 5) benzoato de benzila; 6) acetato de benzila; 7) cinamato de metila; 8) salicilato de metila; 9) acetato de amila; 10) álcool fenetílico; 11) butirato de metila; 12) beta-mirceno; 13) cinamato de etila; 14) benzoato de metila; 16) linanol. *s/d = sem dados..... 60

Capítulo 2: Variações temporais e similaridades no uso de fragrâncias aromáticas por machos de Euglossini

Tabela 1. Datas de coletas de machos de Euglossini, amostrados em uma área de



	Floresta Ombrófila Densa na Ilha do Superagui, município de Guaraqueçaba, estado do Paraná, sul do Brasil, entre novembro de 2011 e março de 2014.....	74
Tabela 2.	Número de machos da tribo Euglossini amostrados (N), em uma área de Floresta Ombrófila Densa, na Ilha do Superagui, sul do Brasil, nos seguintes períodos: Nov/2011-Mar/2012 (1º ano), Nov/2012-Mar/2013 (2º ano) e Out/2013-Mar/2014 (3º ano) e as essências visitadas (EG= Eugenol; EC= Eucaliptol; BI= Beta-Ionona; SM= Salicilato de Metila; BB= Benzoato de Benzila; VN= Vanilina; AC= Acetato de Benzila; CM= Cinamato de Metila).....	80
Tabela 3.	Abundância relativa (%) das diferentes espécies de Euglossini amostradas nas áreas de Floresta Ombrófila Densa na Ilha do Superagui (IS) e Reserva Natural Salto Morato (RNSM), município de Guaraqueçaba, Estado do Paraná, sul do Brasil. N = número de machos de cada espécie. (EG= Eugenol, EC= Eucaliptol, BI= Beta-Ionona, SM= Salicilato de Metila, BB= Benzoato de Benzila, VN= vanilina, AB= Acetato de Benzila). Índice de diversidade de Shannon-Wiener (H'), índice de equidade de Pielou (J') e amplitude de nicho ((BA): referente às diferentes fragrâncias exploradas pelos machos) são fornecidos apenas para as quatro espécies mais abundantes nas duas áreas estudadas.....	85
Tabela 4.	Porcentagem de sobreposição de nicho (tipos de fragrâncias visitadas) entre as quatro espécies mais abundantes de Euglossini em duas áreas de Floresta Ombrófila Densa, localizadas na Ilha do Superagui (diagonal inferior) e Reserva Natural Salto Morato (diagonal superior), município de Guaraqueçaba, Estado do Paraná, sul do Brasil. Eg. = <i>Euglossa</i>	87
Tabela 5.	Frequência de ocorrência (FO), dominância (D) e categorias (Ct) das essências de acordo com uso destas pelas quatro espécies mais abundantes de Euglossini na área de Floresta Ombrófila Densa da Ilha do Superagui, município de Guaraqueçaba, Estado do Paraná, Brasil. Eg. = <i>Euglossa</i> .mf = fragrância muito frequente; f = frequente; pf = pouco frequente. d = fragrância dominante; a = acessória; o = ocasional. C = fragrância comum; I = intermediária e R = rara. EG=Eugenol, EC= Eucaliptol, BI= Beta-Ionona, SM= Salicilato de Metila, BB= Benzoato de Benzila, VN= vanilina, AB= Acetato de Benzila.....	88



Capítulo 3: Orchid bees: a new assessment on the rarity of diploid males in populations of this group of Neotropical pollinators

Table I. Name of the six euglossine species surveyed, number of polymorphic microsatellite loci analysed (NL), collection site, characterization of the 29 forest fragments sampled for orchid bees [including the following information: size (in hectare), type of vegetation, degree of disturbance and type of the surrounding matrix, private or governmental reserve], number of males analysed (n males), observed number of diploid males (2N), expected heterozygosity (He), probability of a male, if diploid, being heterozygous for at least one polymorphic locus (Phet), probability of detecting a diploid males per locality adjusted for putative null alleles (Phet-null), number of diploid males. He_L =intra-locus heterozygosity; He_p =heterozygosity per population. Brazilian States of Paraná (PR), São Paulo (SP), Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) and Rio de Janeiro. FDM =Frequency of diploid males. 95% CI=confident interval of FDM..... 106

Table S1. Set of primers and annealing temperatures employed in the amplification of microsatellite loci of the different species orchid bee 120

Table S2. Number of alleles that failed to amplify at different microsatellite loci, in each population of the six orchid bee species surveyed (see Table I for details of each study site where bees were collected) in Brazilian Atlantic Forest remnants, mean expected heterozygosity (He) per loci and number of alleles found for each loci..... 121



LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1.** Mapa da cobertura vegetal original da Mata Atlântica (esquerda) e dos remanescentes atuais (direita), constituindo neste último caso, uma paisagem fragmentada 4
- Figura 2.** Mapa de distribuição natural da vegetação da Mata Atlântica no Brasil 6
- Figura 3.** Mapa de Áreas Prioritárias selecionadas para a Conservação da Biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos..... 8
- Figura 4.** Localização do limite da ecorregião da Serra do Mar na Mata Atlântica, Brasil..... 09
- Figura 5.** Mapa da vegetação da Ilha do Superagui, Paraná, Brasil..... 10
- Figura 6.** Macho de *Euglossa annectans* em vista lateral e estruturas associadas a coleta de compostos aromáticos 12
- Figura 7.** Esquema do sistema de determinação sexual em Hymenoptera com um loco CSD (Sex Determination Locus) multialélico, demonstrando a formação de fêmeas (2n) e machos (n) normais e a formação de machos diploides(2n)..... 15
- Figura 8.** Base genética e detecção de polimorfismo de microssatélites. Figura A e B ilustram genótipos homozigotos e heterozigostos, respectivamente. A figura C ilustra um gel de eletroforese com diferentes genótipos homozigotos (uma banda) e heterozigotos (duas bandas). (Fonte: Ferreira e Gratapaglia, 1998)..... 17
- Figura 9.** Perfil de eletroferograma para *Euglossa annectans* obtido através do primer de microssatélite Ann2 (ver Paxton et al., 2009), representando um indivíduo haploide (a) e diploide (b) 18

Capítulo 1: A comunidade de abelhas Euglossini do Parque Nacional do Superagui: Diversidade em áreas de Floresta Ombrófila Densa e Restinga

- Figura 1.** Localização geográfica do Parque Nacional do Superagui, em destaque (tons claros), encontra-se a Ilha das Peças e a Bacia do Rio dos Patos e em tom escuro localiza-se a Ilha do Superagui, A refere-se ao ponto de amostragem composto de Floresta Ombrófila Densa e B ao ponto composto por vegetação de Restinga..... 37



- Figura 2.** Curvas de rarefação de espécies e estimadores não paramétricos de riqueza (Chao1, Jack1 e bootstrap) representando o número cumulativo de espécies de Euglossini amostradas em função da quantidade de coletas realizadas na Floresta Ombrófila Densa (acima) e Restinga (abaixo) na Ilha do Superagui, sul do Brasil. Atenção para as escalas com valores diferentes dos eixos Y representados na figura 42
- Figura 3.** Distribuição da ordem de abundância relativa para as espécies de Euglossini nas duas áreas estudadas (FOD e RES) da Ilha do Superagui. As espécies estão ordenadas em ordem decrescente de abundância relativa de indivíduos. FOD = Floresta Ombrófila Densa; RES = restinga 44
- Figura 4:** Análise de Correspondência Destendenciada (DCA) da fauna de abelhas Euglossini de áreas de Floresta Ombrófila Densa, domínio Mata Atlântica, na região do litoral do estado do Paraná e São Paulo (Os códigos são referentes a localidades e estão descritos no texto, *Eg* = *Euglossa*; *Ef* = *Eufriesea*; *El* = *Eulaema* e *Ex* = *Exaerete*). Os dados para comparação das faunas de seis áreas indicadas foram obtidos a partir dos seguintes estudos: Giangarelli et al. (2015) [PR-C1], Guaraqueçaba/PR, (região continental); Mattozo et al. (2011) [PR-C2], Antonina/PR, (região continental); Rocha-Filho e Garófalo (2013): [SP-C1], Ubatuba/SP (continental) e [SP-I1], Ilha Anchieta/SP (insular); Cordeiro et al. (2013): [SP-I2], Ilhabela (área insular) e [SP-C2], São Sebastião/SP (continental). PR-I1 = presente estudo 46
- Figura S1.** Lista de espécies amostradas no presentetrabalho, Aa) vista lateral e Ab) vista frontal de *Euglossa annectans*; Ba) vista lateral e Bb) vista frontal de *Euglossa roderici*; Ca) vista lateral e Cb) vista frontal de *Euglossa truncata*; Da) vista lateral e Db) vista frontal de *Euglossa viridis*; Ea) vista lateral e Eb) vista frontal de *Euglossa iopoecila*; Fa) vista lateral e Fb) vista frontal de *Euglossa stellfeldi*; Ga) vista lateral e Gb) vista frontal de *Euglossa townsendi*; Ha) vista lateral e Hb) vista frontal de *Euglossa pleosticta*; Ia) vista lateral e Ib) vista frontal de *Eufriesea dentilabris*; Ja) vista lateral e Jb) vista frontal de *Exaerete smaragdima*; Ka) vista lateral e Kb) vista frontal de *Eulaema cingulata*; La) vista lateral e Lb) vista frontal de *Eulaema nigrita*; Ma) vista lateral e Mb) vista frontal de *Euglossa cordata* 62



Capítulo 2: Variações temporais e similaridades no uso de fragrâncias aromáticas por machos de *Euglossini*

- Figura 1.** Localização geográfica do Parque Nacional do Superagui, em destaque (tons claros), encontra-se a Ilha das Peças e a Bacia do Rio dos Patos e em tom escuro localiza-se a Ilha do Superagui, A refere-se ao ponto de amostragem composto de Floresta Ombrófila Densa..... 73
- Figura 2.** Variação mensal nos parâmetros abióticos (temperatura média, umidade relativa média e precipitação pluviométrica) e na abundância (número de indivíduos) de machos de *Euglossini* amostrados em uma área de Floresta Ombrófila Densa na Ilha do Superagui, no município de Guaraqueçaba, estado do Paraná, sul do Brasil, durante três anos consecutivos, no período entre novembro de 2011 e março de 2014..... 78
- Figura 3.** Padrão de abundância e do uso as essências ofertadas durante o período chuvoso nos três anos de amostragens. O, N, D, J, F, M refere-se aos meses amostrados (outubro, novembro, dezembro, janeiro, fevereiro e março). EG= Eugenol; EC=Eucalipitol; VN= Vanilina; BI= Beta-Ionona; AB= Acetato de Benzila; SM= Salicilato de Metila; BB= Benzoato de Benzila e CM= Cinamato de Metila 81

Capítulo 3: Orchid bees: a new assessment on the rarity of diploid males in populations of this group of Neotropical pollinators

- Figure 1.** Map of Brazil, in South America, in detail, the 29 localities distributed in five Brazilian states (RS=Rio Grande do Sul, SC=Santa Catarina, PR=Paraná, SP=São Paulo and RJ=Rio de Janeiro) where males of the species *Eufriesea violacea*, *Eulaema cingulata*, *Euglossa annectans*, *Euglossa pleosticta*, *Euglossa iopoecila* and *Euglossa truncata* were sampled. Additional information on the 29 study sites, herein represented by codes (FSM, PEMG, FMA, ESCAS, CPCN, URU, CAB, UNI, ITA, FSJU, HT, MICO, CAR, ELP, FSFI, FD, F2C, PTF, AT, HT-UEL, RNSM, IS, PNI, IC, SS, IB, UB, AF and RF) are presented in Table I..... 104



SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
<i>A Mata Atlântica e sua devastação</i>	3
<i>Parque Nacional do Superagui (PNS)</i>	9
<i>As abelhas da tribo Euglossini</i>	11
<i>Sistema de determinação sexual das abelhas e estudos genéticos sobre machos realizados com abelhas Euglossini</i>	14
Referências Bibliográficas	19
OBJETIVO	29
Objetivo Geral	29
Objetivos Específicos	29
CAPITULO 1 - A comunidade de abelhas Euglossini da Ilha do Superagui:	
Diversidade em áreas de Floresta Ombrófila Densa e Restinga	31
Resumo	32
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAIS E MÉTODOS	36
2.1 <i>Área de estudo</i>	36
2.2 <i>Amostragens</i>	37
2.3 <i>Análise dos dados</i>	38
2.4 <i>Análise de DCA - Comparação entre as faunas de Euglossini de áreas de Floresta Ombrófila Densa, no litoral dos estados do Paraná e São Paulo, pertencendo ao Corredor de Biodiversidade da Serra do Mar</i>	39
3. Resultados	40
4. Discussão	47
5. REFERÊNCIAS	54
Material suplementar	61
CAPITULO 2 - Variações temporais e similaridades no uso de fragrâncias aromáticas por machos de Euglossini	66
Resumo	67



Abstract	68
1. Introdução	69
2. Materiais e Métodos	71
2.1. <i>Área de estudo</i>	71
2.2. <i>Metodologia</i>	72
2.3. <i>Comparações entre as faunas de Euglossini de duas áreas de Floresta Ombrófila Densa na região da APA de Guaraqueçaba</i>	73
2.4. <i>Análise dos dados</i>	74
3. Resultados	77
4. Discussão	88
5. Referências	94

CAPITULO 3 - Orchid bees: a new assessment on the rarity of diploid males in populations of this group of Neotropical pollinators	98
Abstract	100
1. INTRODUCTION	101
2. MATERIALS AND METHODS	104
2.1. <i>Study áreas</i>	102
2.2. <i>Bee sampling</i>	105
2.3. <i>DNA extraction and molecular analysis</i>	110
2.4. <i>Data analysis</i>	111
3. RESULTS	112
4. DISCUSSION/ CONCLUSION	112
REFERENCES	116
APIDOLOGIE – Supplementary material	120
CONCLUSÕES	124



INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

Considerada um dos *hotspots* de biodiversidade do planeta (Myers et al., 2000), a Mata Atlântica (MA) abrange um conjunto variado de ecossistemas que se encontram na atualidade inseridos e compondo uma paisagem fragmentada sob forte ameaça antrópica (Ribeiro et al., 2009). Após séculos de desmatamento e ocupação de suas áreas, a MA possui hoje cerca de apenas 10% de sua cobertura vegetal original (SOS Mata Atlântica e INPE, 2015).

Reconhecida por sua enorme biodiversidade e pelo elevado grau de endemismo de muitas de suas espécies, a MA integra o conjunto de 25 *hotspots* de biodiversidade (Myers et al., 2000), os quais em seu conjunto sustentam cerca de 50% da diversidade biológica do planeta, mesmo compondo uma parcela ínfima (1%) da extensão de terras do globo terrestre (Laurance, 2009). Apesar de toda sua importância biológica e de toda ameaça a que está sujeita, a MA ainda carece de estudos para um conhecimento mais completo de sua biodiversidade. Particularmente, no que se refere aos levantamentos de faunas de abelhas, Alves-dos-Santos (1999) e Moure (2000) assinalam a necessidade de maiores estudos envolvendo este grupo de insetos.

Com base em número representativo de estudos realizados de forma mais acentuada nas últimas duas décadas (Ramalho et al., 2009; Nemésio, 2010; Aguiar e Gaglianone, 2012; Cordeiro et al., 2013; Nemésio, 2013a, b; Rocha-Filho e Garófalo, 2013; Nemésio, 2014; Giangarelli et al., 2015a) há registros de ocorrência de cerca de 50 espécies de abelhas pertencentes à tribo Euglossini na MA e, conforme Nemésio (2009), metade deste total, são espécies endêmicas às áreas deste “bioma” sul-americano. Este mesmo autor destaca que, embora diversos estudos de levantamentos de Euglossini tenham sido realizados em áreas do domínio Mata Atlântica, poucas áreas têm sido extensivamente estudadas. Neste cenário, em especial, áreas mais ao sul do território brasileiro, começaram apenas mais recentemente ter suas comunidades de Euglossini melhor caracterizadas (Sofia et al., 2004; Matozzo et al., 2011; Gonçalves et al., 2014; Giangarelli et al., 2015a). Todos estes quatro estudos, realizados no estado do Paraná.

Um dos primeiros estudos sobre estas abelhas realizado em regiões mais meridionais da Mata Atlântica brasileira, no caso o estado do Rio Grande do Sul, revelou uma baixa riqueza de espécies para as áreas amostradas (Wittmann et al., 1988). A importância de se estudar intensamente áreas de Mata Atlântica localizadas em uma mesma região justifica-se plenamente, uma vez que estudos realizados em áreas



próximas, mostrando fitofisionomias similares e apresentando o mesmo estado de conservação, podem mostrar riquezas de espécies de Euglossini conspicuamente distintas. Como exemplo, podem ser citados os estudos de Matozzo et al. (2011) e Giangarelli et al. (2015a), realizados em duas áreas próximas na Área de Proteção Ambiental (APA) de Guaraqueçaba, no litoral paranaense, mas que mostraram diferenças importantes, tais como, riqueza e abundância, nas suas faunas de abelhas Euglossini.

Não menos importante é o fato de que, os diversos levantamentos de Euglossini realizados em áreas de MA têm permitido um maior conhecimento do conjunto de espécies que ocupam de forma distinta os diferentes ecossistemas que compõem o domínio Mata Atlântica. Por exemplo, Nemésio e Silveira (2007) e Matozzo et al. (2011) apontam claramente diferenças nas ocorrências de algumas espécies de Euglossini mais intimamente relacionadas à florestas de interior, como a Floresta Estacional Semidecidual, ou à florestas costeiras, como a Floresta Ombrófila Densa, resultando em estruturas de comunidades muito distintas quando se compara florestas de interior (Rebêlo e Garófalo, 1991, 1997; Sofia et al., 2004; Silveira et al., 2011) e litorâneas (Ramalho et al., 2009; Rocha-Filho et al., 2013; Cordeiro et al., 2013; Giangarelli et al., 2015a).

Além da descoberta de novas espécies de Euglossini (ex. Moure e Schindwein, 2002; Faria e Melo, 2011; Nemésio, 2010, 2011), muitas das quais com elevado grau de endemismo, os estudos realizados nos últimos anos em áreas remanescentes de MA têm permitido conhecer melhor os limites de distribuição de várias espécies (Giangarelli et al., 2011; Faria e Zanella, 2015) contribuindo, deste modo, para um maior conhecimento da biogeografia da tribo como um todo.

A despeito dos estudos já realizados com Euglossini em Mata Atlântica, até o momento, ainda são poucos os que investigaram as comunidades de Euglossini em áreas de restinga da Mata Atlântica (ex. Viana et al., 2002), bem como os voltados a um maior conhecimento da diversidade genética de populações destas abelhas presentes neste bioma.

Embora no passado o estado do Paraná tenha sido quase que totalmente recoberto por diferentes tipos de formação de Mata Atlântica (Maack, 1981), hoje este estado detém apenas 11,7% de sua cobertura vegetal original (SOS Mata Atlântica e INPE, 2015). Apesar disto, um dos maiores remanescentes de Mata Atlântica do litoral brasileiro encontra-se inserido no litoral paranaense, na APA de Guaraqueçaba;



formando em continuidade com remanescentes de MA do sul do estado de São Paulo, região de Cananéia, parte importante do Corredor de Biodiversidade da Serra do Mar (Galindo-Leal e Câmara, 2005).

É nesta região, da APA de Guaraqueçaba, que está o Parque Nacional de Superagui (PNS), constituído em sua maior parte pela Ilha do Superagui, e onde se encontra um dos grandes remanescentes de restinga e de floresta ombrófila densa da Mata Atlântica no estado do Paraná (IPARDES, 2001), que foram objeto de estudo deste trabalho para abordagens ecológicas e genéticas envolvendo as abelhas da tribo Euglossini.

A Mata Atlântica e sua devastação

Quando os primeiros colonizadores europeus chegaram ao Brasil, em 1500, a Mata Atlântica estendia-se por toda a costa oriental do Brasil, apresentando incursões profundas em direção ao interior do país, alcançando e penetrando a oeste no Paraguai e sul na Argentina, cobrindo total ou parcialmente 17 estados brasileiros (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí) (Galleti et al., 2002; IBGE, 2005; Campanilli e Prochonow, 2006).

De fato, originalmente, as áreas de vegetação da Mata Atlântica cobriam um total de 1.315.460 km², o equivalente a aproximadamente 15% do território nacional (Figura 1). Desta forma, era considerada a segunda maior floresta do Brasil, só perdendo em tamanho para a Floresta Amazônica. Entretanto, estima-se que a Mata Atlântica abrigue uma gama de diversidade biológica proporcionalmente maior do que o da Amazônia (MMA, 2005; Campanilli e Prochonow, 2006). Além de abrigar grande biodiversidade, a Mata Atlântica é reconhecida também pelo elevado grau de endemismo de muitas de suas espécies (Silva e Casteleti, 2005).



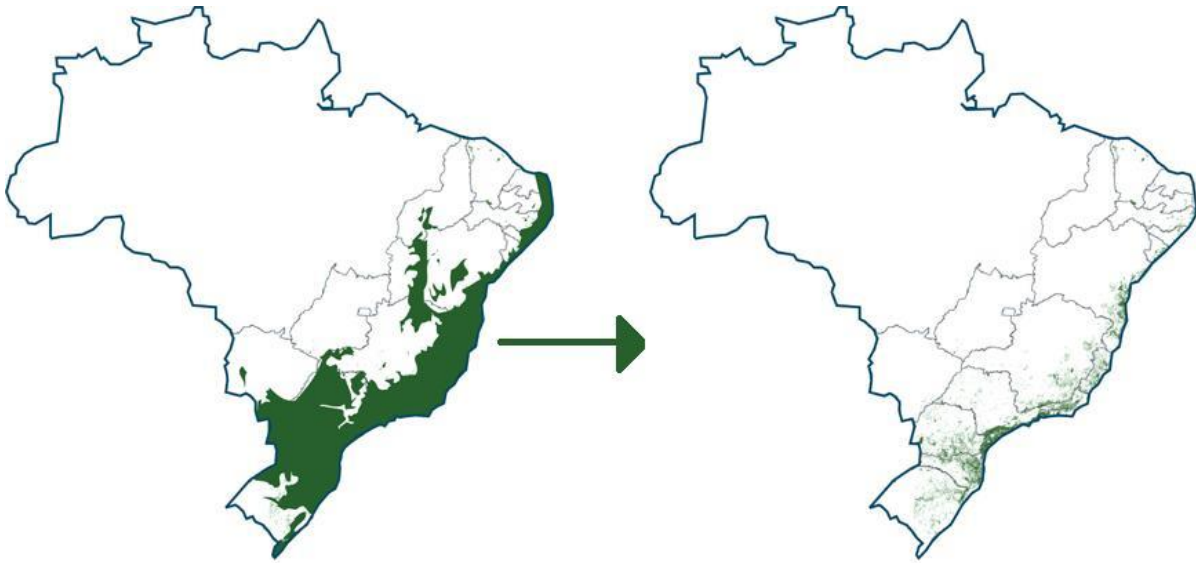


Figura 1. Mapa da cobertura vegetal original da Mata Atlântica (esquerda) e dos remanescentes atuais (direita), constituindo neste último caso, uma paisagem fragmentada (Fonte: www.riosvivos.org.com.br).

Apesar de sua imensa importância biológica, a Mata Atlântica está entre as formações vegetais mais devastadas do mundo, estando entre as cinco mais ameaçadas (FAO, 2011) Por toda sua importância biológica e elevado grau de ameaça antrópica, a Mata Atlântica foi tratada, mais recentemente, como “*the hottest of the hotspots*”, por Laurance (2009).

Segundo estimativas recentes, a cobertura de vegetação restante da Mata Atlântica é de 7,9% de sua cobertura original, podendo alcançar 12,5%, se considerados neste cômputo os fragmentos naturais de tamanho pequeno, ou seja, menores que três hectares (SOS Mata Atlântica e INPE, 2015).

Apesar desses números alarmantes, ainda é notável o avanço do desmatamento na Mata Atlântica; por exemplo, só no período entre 2013-2014 foram desflorestados 18.267 hectares (SOS Mata Atlântica e INPE, 2015). Embora nos últimos anos as taxas de desmatamento na Mata Atlântica possam mostrar variação para cima ou para baixo, o mais importante a ser destacado é que este desmatamento se dá de forma continuada, reduzindo cada vez mais as áreas remanescentes deste ameaçado bioma brasileiro (Tabela 1).



Tabela 1. Dados do histórico do desmatamento anual de 2005 até 2014, para a Mata Atlântica (Fonte: SOS Mata Atlântica e INPE, 2015).

Desmatamento observado	Total desmatado (ha)	Intervalo (anos)	Taxa anual (ha)
Período de 2013 a 2014	18.267	1	18.267
Período de 2012 a 2013	23.948	1	23.948
Período de 2011 a 2012	21.977	1	21.977
Período de 2010 a 2011	14.090	1	14.090
Período de 2008 a 2010	30.366	2	15.183
Período de 2005 a 2008	102.938	3	34.313

Entre os campeões de desmatamento no último levantamento, destacam-se os estados de Piauí, Minas Gerais, Bahia e Paraná, somente esses estados desmataram 5.626, 5.608, 4.672 e 921 ha, respectivamente. (SOS Mata Atlântica e INPE, 2015). Do total de supressão relatado nesse último relatório, 309 ha ocorreu na vegetação de restinga, e o restante (17.958 ha) se deu em remanescentes florestais (SOS Mata Atlântica e INPE, 2015).

Compondo as áreas caracterizadas como remanescentes florestais, estão: Floresta Ombrófila Densa; Floresta Ombrófila Mista, também denominada de Mata de Araucárias; Floresta Ombrófila Aberta; Floresta Estacional Semidecidual; Floresta Estacional Decidual e Campos de Altitude.

A Floresta Ombrófila Densa; também conhecida como Floresta Fluvial Tropical, é uma floresta perenifólia, com dossel variando de 20 a 30 metros e apresentando altíssima diversidade. Localizada na região Amazônica e dominando as áreas de Mata Atlântica próximas ao litoral, ocorre desde porção Norte do estado do Rio Grande do Sul avançando até a Bahia (Rizzini, 1979; Veloso e Goes-Filho, 1982) (Figura 2). Possui cinco divisões, as quais são determinadas pelas variações de altitude (Veloso et al., 1991; IBGE, 1992; Tonhasca, 2005), são estas: formação aluvial, das terras baixas, sub-montana, montana e alto-montana (Veloso et al., 1991).



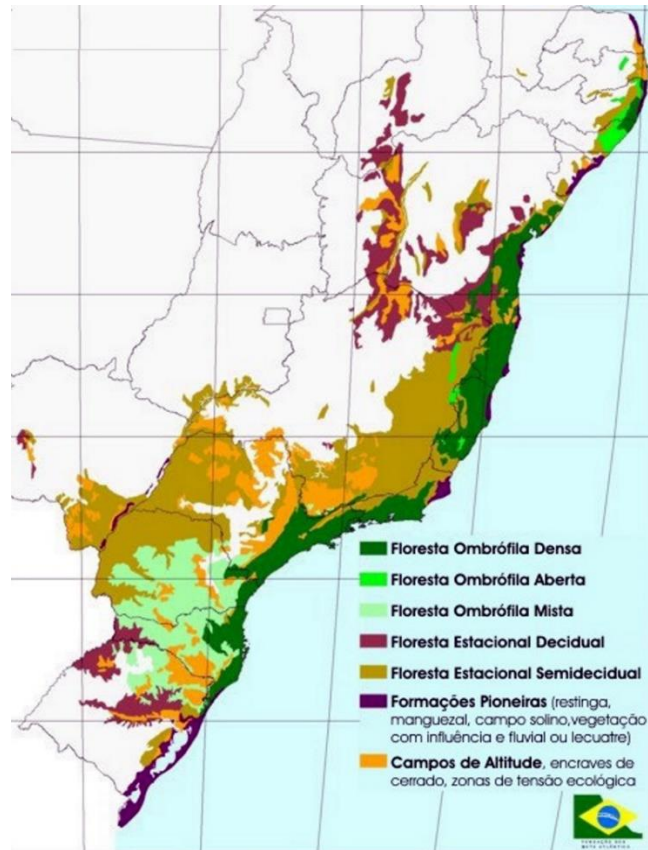


Figura 2. Mapa de distribuição natural da vegetação da Mata Atlântica no Brasil (Fonte: IBGE, 1993).

Outra fitofisionomia muito peculiar é a formação pioneira com influência marinha, também conhecida como restinga, é caracterizada pela vegetação de primeira ocupação, associada a espécies pioneiras que se desenvolvem sobre áreas sob constantes deposições sedimentares (Veloso et al., 1991). Sua vegetação é adaptada a condições ambientais adversas como, ventos constantes, salinidade alta, terreno arenoso, maresia, entre outros. (Veloso et al., 1991; IBGE, 1992; SEMA e IAP, 1996; Jaster, 2002).

É uma região de transição entre o mangue e a Floresta Ombrófila Densa de terras baixas, possui tipos distintos de vegetação em relação à distância e influência do mar, apresentando porte mais robusto conforme adentra no continente, chegando ao um aspecto florestal (IBGE, 1992; Jaster, 1995; SEMA e IAP, 1996; Roderjan et al., 2002).

Possui quatro tipos distintos: *Herbáceo-Subarbustiva*, também conhecida como restinga baixa, sua vegetação é predominantemente do tipo herbácea ou subarbustiva, possui porte de cerca de um metro; *Arbustivo-Arbórea*, caracterizado pela presença de restinga arbustiva e de estágios florestais iniciais, com porte variando de 2,5 a 5 metros; *Floresta baixade restinga*, fisionomia arbórea com dossel aberto, estrato inferior aberto e árvores emergentes, em geral de 3 a 10 metros de altura, pequena amplitude



diamétrica (5 a 10 cm), dificilmente ultrapassando 15 centímetros; *Floresta alta de restinga*, apresenta fisionomia arbórea com dossel fechado; estrato predominante arbóreo; altura variando entre 10 e 20 metros, amplitude diamétrica mediana variando de 12 a 25 centímetros, com algumas plantas podendo ultrapassar 40 centímetros (Schmidlin et al., 2005; Azevedo et al., 2014).

Em parte, a alta biodiversidade que a Mata Atlântica (MA) apresenta, pode ser atribuída à grande diversidade de suas fitofisionomias, bem como, por essas apresentarem diversos ambientes distintos, como no caso da Floresta Ombrófila Densa e da restinga, apresentados acima. Tamanhas variações são reflexo direto da grande extensão ao longo da costa, de mudanças de altitudes, diferenças de solo, relevo e exposição a ventos oceânicos, que contribuem para a formação de diferentes paisagens (MMA, 2000; Galindo-Leal e Câmara, 2005).

Na tentativa de diminuir o processo de devastação da Mata Atlântica, que continua sofrendo grande ameaça, uma vez que, atualmente, cerca de 70% da população brasileira e os maiores pólos industriais encontram-se sobre o seu domínio (MMA, 2000; Galindo-Leal e Câmara, 2005; Campanilli e Prochonow, 2006), foram criadas áreas prioritárias para a conservação levando em consideração sua importância biológica; essas áreas foram classificadas em quatro níveis de acordo com esse critério. Aproximadamente 33% da Mata Atlântica foi resguardada por áreas prioritárias, sendo a maioria dessas, 55%, indicadas como de extrema importância biológica (MMA, 2000) (Figura 3).



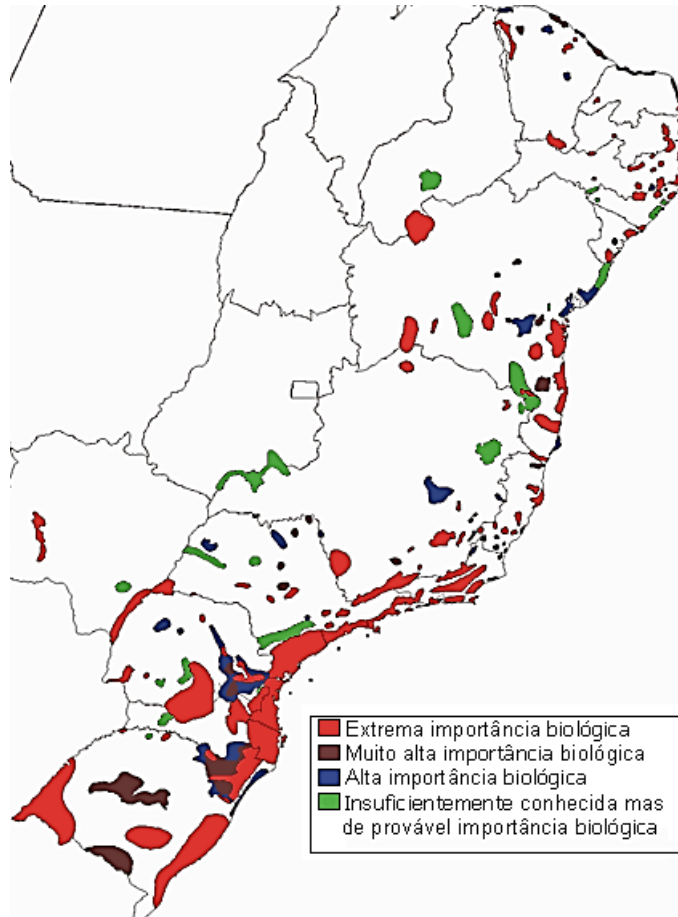


Figura 3. Mapa de Áreas Prioritárias selecionadas para a Conservação da Biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos (Fonte: MMA, 2000).

Das áreas classificadas de extrema importância, destaca-se a região da Serra do Mar, considerada a maior faixa contínua e apresentando alto nível de integridade ambiental e grande diversidade de ecossistemas de campos de altitude, floresta submontana, floresta montana, afloramentos calcários, restingas e manguezais, e a confluência das maiores formações florestais da Mata Atlântica: Ombrófila Densa, Ombrófila Mista e Estacional Semidecidual (MMA, 2000), esta região encontra-se em praticamente até o meio do litoral do estado do Rio Grande do Sul até em grande parte da região litorânea do Rio de Janeiro (Figura 4).



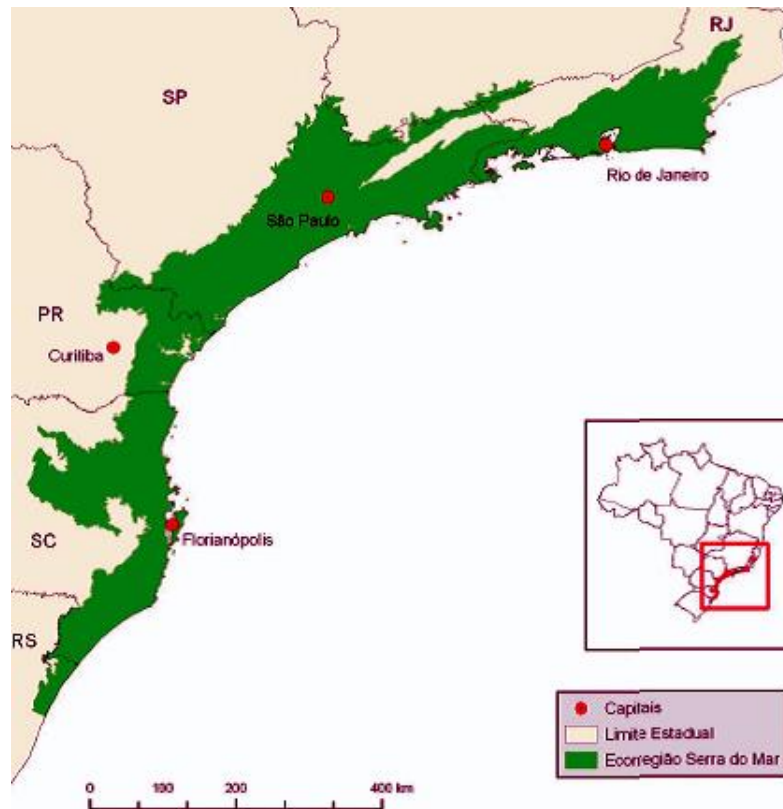


Figura 4. Localização do limite da ecorregião da Serra do Mar na Mata Atlântica, Brasil (Fonte: WWF, 2011).

Diversas áreas de proteção ambiental (APA), parques nacionais, estaduais encontram-se nessa região, como os Parques Nacionais de Itatiaia (SP), Serra dos Órgãos (RJ), Superagui (PR), entre outros.

Parque Nacional do Superagui (PNS)

Localizado no litoral norte do estado do Paraná, no município de Guaraqueçaba (PR) e inserido na APA de Guaraqueçaba, encontra-se o Parque Nacional do Superagui (PNS), criado em 1989 e formado pelas Ilhas do Superagui e Peças, com o total de 21.400 ha, e ampliado em 1997, incluindo nos seus limites o Vale do Rio dos Patos, no continente, as ilhas do Pinheiro e Pinheirinho, passando sua área total para 33.988,00 ha (Vivenkananda, 2001). O PNS é considerado um dos cinco ecossistemas costeiros mais notáveis do Globo Terrestre (Roderjan e Kuniyoshi, 1988) e está inserido em um mosaico de unidades de conservação entre os estados do Paraná e São Paulo, (Vivenkananda, 2001), compondo o Corredor de Biodiversidade da Serra do Mar, uma das áreas mais ricas em biodiversidade da Mata Atlântica (Galindo-Leal e Câmara, 2005).



A Ilha do Superagui era uma península até 1953, quando se tornou uma ilha artificial após a abertura do Canal do Varadouro, este canal apresenta cerca de 6 km de comprimento e 50 metros de largura, e foi construído com o propósito de facilitar a navegação (IBAMA, 2011). Este isolamento da área de Superagui do continente há cerca de 60 anos, representa uma forma importante de fragmentação de habitat, constituindo também uma ameaça à biodiversidade local (Vivekananda, 2001).

Inserida no domínio da floresta ombrófila densa, a vegetação da Ilha recebe influência direta das massas de ar quente e úmido do oceano Atlântico e pelas chuvas intensa e bem distribuídas ao longo do ano (Roderjan et al., 2002). Segundo Schmidlin et al. (2005), a Ilha apresenta 11 classes de cobertura do solo, possuindo diversos tipos de formação vegetal, com predominância de Floresta ombrófila densa (de terras baixas: 44%; e submontana: 2%); e restinga (dos tipos herbáceo-arbustiva: 3%; arbustivo-arbórea: 15%; e, arbórea: 12%); entre outros tipos de formações vegetais (Figura 5).

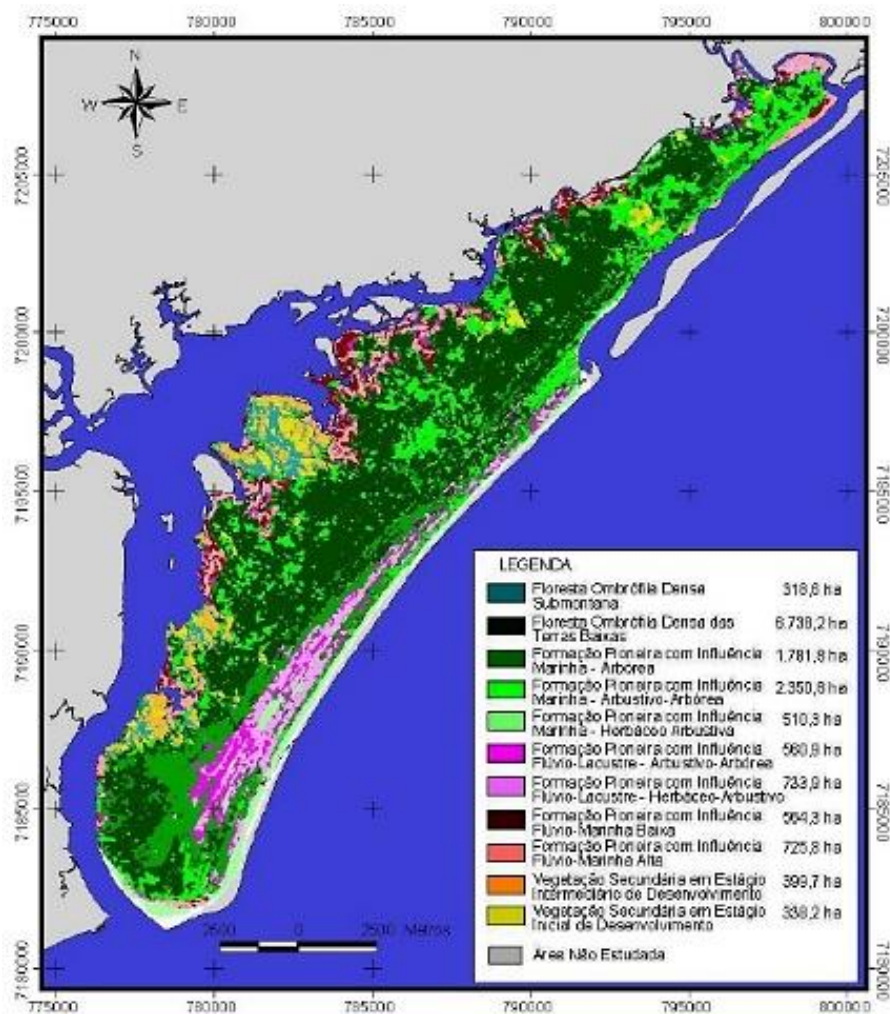


Figura 5. Mapa da vegetação da Ilha do Superagui, Paraná, Brasil (Fonte: Schmidlin et al., 2005).



O PNS abriga espécies animais ameaçadas de extinção, a exemplo do papagaio-da-cara-roxa (*Amazona brasiliensis* (Linnaeus)) e do mico-leão-da-cara-preta (*Leontopithecus caissara* Lorini e Persson), e espécies raras e endêmicas de parte da região da Serra do Mar (Scherer-Neto, 1989; Prado, 1999; Galetti et al., 2006; Nascimento, 2008). Apesar da importância do Parque, somente alguns estudos sobre a fauna deste local foram realizados até o presente, e a maioria deles voltados a fauna de primatas, macrofauna bentônica, aves e alguns mamíferos (Scherer-Neto, 1989; Prado, 1999; Passos e Gracioli, 2004; Galetti et al., 2006; Martins, 2007; Nascimento, 2008; Nascimento et al., 2011). Até o presente momento, contudo, a fauna de abelhas do PNS permanece desconhecida e à espera de maiores estudos.

Neste contexto, o interesse pelo estudo da comunidade de abelhas Euglossini do Parque Nacional do Superagui, foco do presente trabalho, se justifica plenamente, em parte, pelo fato das comunidades destas abelhas em áreas de restinga serem ainda pouco conhecidas, especialmente em latitudes maiores, como é o caso da região onde se insere a Ilha do Superagui, mas também, pelo fato deste Parque abrigar áreas como a própria IS modificadas pela antrópica.

As abelhas da tribo Euglossini

Considerados organismos essenciais à polinização de várias famílias de Angiospermas, sendo um dos grupos mais importantes de polinizadores de florestas Neotropicais (Zucchi et al., 1969; Dressler, 1982; Ramírez et al., 2002; Roubik e Hanson, 2004), as abelhas da tribo Euglossini formam um grupo conspícuo dentro da família Apidae (Michener, 2007). Tanto os machos como as fêmeas destas abelhas são capazes de voar grandes distâncias à procura de recursos, sendo importantes para a polinização cruzada de diversas espécies vegetais com distribuição esparsa comum em florestas Neotropicais (Janzen, 1971).

Popularmente conhecidas como “abelhas das orquídeas”, denominação esta devida à íntima relação de seus machos com as flores da família Orchidaceae, os quais buscam compostos aromáticos em mais de 700 espécies desta família, as abelhas desta tribo têm distribuição Neotropical (Dressler, 1982; Roubik e Hanson, 2004), com exceção de poucas espécies com ocorrência reconhecida para o sul dos Estados Unidos (Minckley e Reyes, 1996; Skov e Wiley, 2005; Pemberton e Wheeler, 2006). Além de fontes florais, machos euglossíneos também exploram fontes não florais, como frutas em decomposição, madeiras podres, fezes e troncos de árvores em busca de substâncias



químicas (Rebêlo e Garófalo, 1991; Ackerman, 1983; Eltz et al., 1999; Roubik e Hanson, 2004).

Os machos coletam essas substâncias, inicialmente secretando lipídios a partir de glândulas labiais cefálicas, que provavelmente auxiliariam a reter os compostos voláteis, maximizando a eficiência na coleta (Whitten et al., 1989), após isso, é escovada a fonte desejada com tufo de cerdas localizadas nos tarsos das pernas anteriores e essas substâncias são transferidas, coletadas e armazenadas nas tíbias posteriores (Kimsey, 1984; Eltz et al., 2003). Posteriormente, os compostos são liberados com o auxílio de estruturas como o pente jugal e a área aveludada nas tíbias médias (Eltz et al., 2005) e possivelmente, funcionam como atrativos no comportamento de pré-acasalamento (Eltz et al., 2015) (Figura 6).

Até o final da década de 1960, o conhecimento sobre os Euglossini era baseado em fêmeas coletadas geralmente em sensos em flores e pouco se sabia sobre os machos dessas abelhas, quando Dodson et al. (1969) realizaram uma pesquisa utilizando cromatografia a gás, onde conduziram à identificação de diversos compostos químicos presentes nas fragrâncias de orquídeas visitadas pelos machos. O conhecimento destes compostos (obtidos sinteticamente) permitiu o desenvolvimento de técnicas para a atração de machos Euglossini, utilizando iscas-odores (Dodson et al., 1969; Williams e Whitten, 1983).

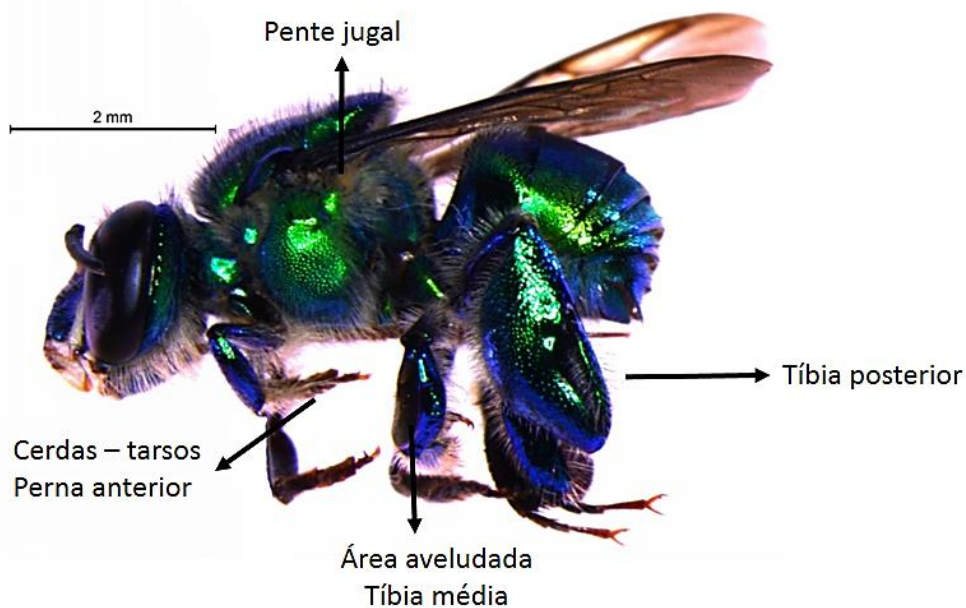


Figura 6. Macho de *Euglossa annectans* em vista lateral e estruturas relacionadas à coleta e dissipação dos compostos aromáticos. (Foto: D.C. Giangarelli).



Desde então, uma série de estudos baseados no uso de iscas-odores para atração de machos de Euglossini têm permitido um conhecimento maior da composição de espécies, riqueza e diversidade das comunidades destas abelhas em diferentes ecossistemas nas Américas Central e do Sul (Janzen et al., 1982; Ackerman, 1983; Rebêlo e Garófalo, 1997; Sofia et al., 2004; Silveira et al., 2011; Storck-Tonon et al., 2013; Cordeiro et al., 2013; Rocha Filho e Garófalo, 2013; Nemésio, 2014; Gonçalves et al., 2014; Giangarelli et al., 2015a; Silveira et al., 2015).

A tribo possui 235 espécies descritas (Moure et al., 2012), distribuídas em cinco gêneros, *Euglossa*, *Eufriesea*, *Eulaema*, *Exaerete* e *Aglae*, onde os três primeiros são espécies vida livre e os dois últimos cleptoparasitas (Dressler, 1982). *Euglossa* é o mais diverso, reunindo 126 espécies descritas, seguido por *Eufriesea* (67 espécies), *Eulaema* (33), *Exaerete* (8 espécies) e *Aglae*, gênero monotípico, com apenas a espécie *Aglae caerulea* Lepeletier e Serville, 1825 descrita (Moure et al., 2012). Destes cinco gêneros, apenas *Aglae* não possui ocorrência registrada para a Mata Atlântica (Nemésio, 2009).

As faunas destas abelhas de alguns ecossistemas têm sido bem menos estudadas do que de outros. Um bom exemplo disto é a Floresta Ombrófila Densa, principalmente se tratando da região sul do Brasil, onde poucos trabalhos foram realizados até o momento para esse tipo de fitofisionomia (Wittmann et al., 1988; Matozzo et al., 2011; Giangarelli et al., 2015a). Estudos extensivos se mostram importantes no intuito de amostrar o maior número de espécies possíveis. Giangarelli et al. (2015a) estudaram uma área de floresta ombrófila densa na região litorânea do estado do Paraná (Município de Guaraqueçaba), realizando 248 horas de amostragem, com oito essências atrativas e obtiveram uma riqueza de 13 espécies e o registro de uma outra espécie, totalizando 14 espécies diferentes para esta localidade. Matozzo et al. (2011), amostraram uma área similar, distante cerca de 40 km, utilizando cinco essências em 156 horas (coleta ativa + passiva), entretanto, esse trabalho amostrou apenas seis espécies diferentes, e de acordo com esses autores, são esperadas para essa região cerca de 17 espécies de abelhas Euglossini.

Outro exemplo de áreas pouco amostradas é em relação ao conhecimento de fauna dessas abelhas nas restingas e dunas, embora quase cinco mil quilômetros (79%) do litoral brasileiro apresentem este tipo de formação vegetal (Araújo e Lacerda, 1987). De acordo com Mantovani (2003), pelo fato da restinga estar localizada ao longo da costa brasileira, esta se encontra sob intensa pressão da ocupação humana e consequente alteração da paisagem original, o que dificulta a sua conservação.



Estudos sobre a comunidade de abelhas em áreas de restingas e dunas foram desenvolvidos em poucas regiões do Brasil, entre estes estão os trabalhos de Alves-dos-Santos (1999) no Rio Grande do Sul, Viana e Alves-dos-Santos (2002) na Bahia; Madeira-da-Silva e Martins (2003) na Paraíba e Oliveira et al. (2010) no Maranhão. Vários destes estudos têm mostrado que uma parte importante (cerca de 80%) das plantas em áreas de restingas e dunas são melitófilas, ou seja, têm as abelhas como seu principal grupo de visitantes florais e polinizadores.

O estado do Paraná possui apenas cerca de 0,05% do seu território formado por ecossistemas de restinga (Maack, 1968) e até o presente momento, nenhum trabalho foi realizado nessa fitofisionomia com as abelhas das orquídeas.

Como relatado anteriormente, a Mata Atlântica encontra-se entre as mais ameaçadas do planeta e dos remanescentes que restaram grande parte encontra-se fragmentada em pequenas áreas e pouquíssimos desses fragmentos apresentam tamanho superior a 1000 km², sabe-se que a fragmentação de habitats é um dos grandes responsáveis em elevar o risco de extinção de muitas espécies (Laurance et al., 2009).

Alguns autores têm relatado que diversas espécies de “abelhas das orquídeas” são sensíveis a fragmentação florestal (Powell e Powell, 1987; Brosi, 2009; Giangarelli et al. 2009; Nemésio, 2011), apresentando correlação positiva em relação a abundância com o tamanho do fragmento (Brosi, 2009). Outro problema em relação a esse processo, é a diminuição de áreas com matas contínuas, podendo incapacitar muitas espécies de se deslocar (Powell e Powell, 1987), ocasionando uma provável diminuição da população, o que pode gerar o isolamento da população, redução dos tamanhos populacionais e conseqüentemente perda na diversidade genética (Frankham et al., 2008; Zayed, 2009), colocando em risco as populações destas abelhas.

Sistema de determinação sexual das abelhas e estudos genéticos sobre machos realizados com abelhas *Euglossini*

As abelhas possuem um sistema de determinação sexual muito peculiar, o sistema haplodiploide, no qual os machos desses insetos são normalmente haploides, gerados de ovos não fertilizados, já as fêmeas são diploides produzidas a partir de ovos fecundados. Ao nível genético, a determinação sexual ocorre em um loco, o sl-CSD (single loco – *Complementary Sex Determination*), esse loco é encontrado de forma genérica entre as abelhas (sociais e não-sociais) (Zayed et al., 2004; Zayed, 2009). Assim, quando o indivíduo for heterozigoto para o loco CSD irá desenvolver uma



fêmea diplóide, no entanto, quando for homozigoto neste loco, será um macho diploide (machos $2N$), sendo que esses são produzidos a partir de ovos fertilizados (Unruh e Messing, 1993; Zayed et al., 2004) (Figura 7).

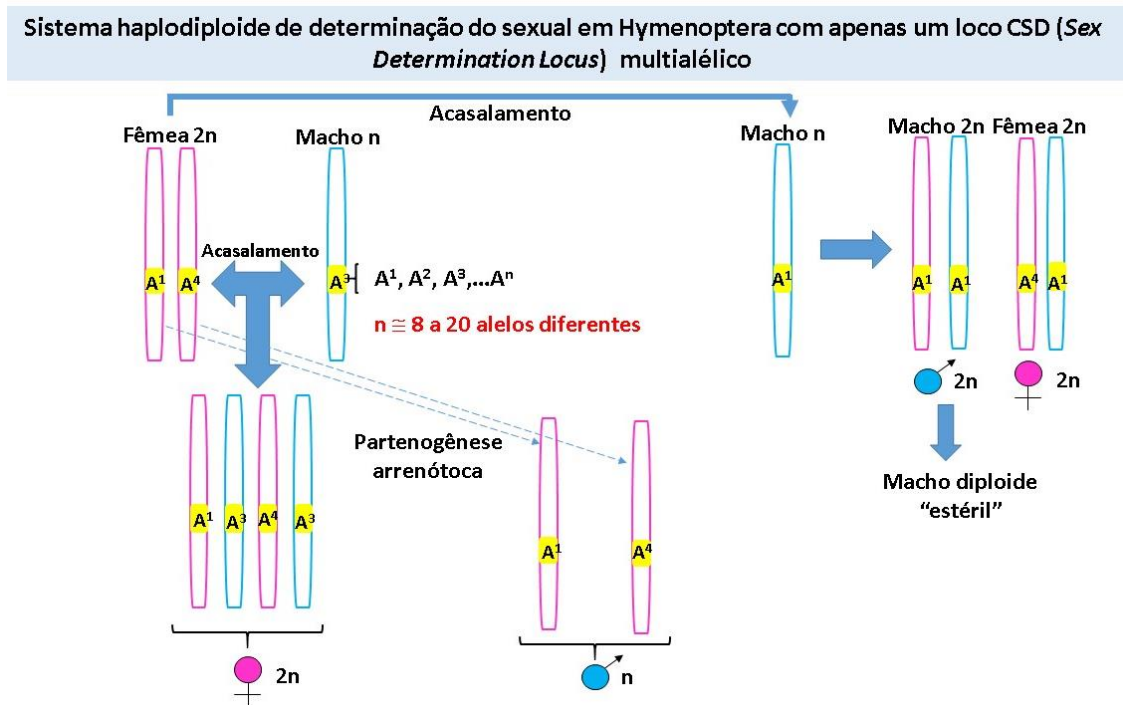


Figura 7. Esquema do sistema de determinação sexual em Hymenoptera com um loco CSD (*Sex Determination Locus*) multialélico, demonstrando a formação de fêmeas ($2n$) e machos (n) normais e a formação de machos diploides ($2n$).

Embora, diversos estudos recentes têm mostrado que os machos $2N$ são viáveis (Elias et al., 2009; Harpur et al., 2013), porém, normalmente apresentam baixa aptidão (Unruh; Messing, 1993) e são, portanto, considerados pouco vantajosos para as populações dos insetos haplodiploide (Unruh e Messing, 1993; Zayed, 2009). Além disso, para cada macho diploide, uma fêmea deixou de ser produzida, assim, machos diploides são considerados um custo significativo no sucesso reprodutivo de seus pais (Unruh e Messing, 1993; Zayed, 2009).

Machos diploides ocorrem naturalmente na natureza e já foram relatados em diversas espécies (Zayed, 2009), em populações de abelhas Euglossini diversos estudos já foram realizados investigando a frequência desses machos (Roubik et al., 1996; López-Urbe et al., 2007; Souza et al., 2010; Giangarelli et al., 2015b). Apesar disso, informações sobre a frequência de machos diploides ainda são escassas na literatura, assim, mais estudo voltados a resolução sobre a frequência de diferentes espécies e ambientes, torna-se uma ferramenta importante para o melhor entendimento e os



possíveis impactos nas populações desse importante grupo de polinizadores Neotropicais.

Análises sobre o fluxo gênico, variabilidade e estrutura genética podem ser medidas por meio de técnicas de biologia molecular disponíveis para a detecção de polimorfismos genéticos ao nível de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Variações nessa técnica passaram a ser utilizadas na obtenção de diferentes tipos de marcadores, podendo ser de origem nuclear ou mitocondrial (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Entre os marcadores de origem nuclear os microssatélites estão entre os mais utilizados, também conhecidos como repetições curtas em *tandem* (*STR – short tandem repeats*) ou sequências simples repetidas (*SSR – simple sequence repeats*), esses marcadores apresentam tamanho reduzido de 1 a 6 bases repetidas em *tandem* (Figura 8) encontradas em maior ou menor abundância no genoma eucariótico e demonstram altos níveis de polimorfismo alélico (Matioli e Passos Bueno, 2001; Solé-Cava e Cunha, 2012).

A disposição dos microssatélites nos indivíduos está altamente correlacionada com a história evolutiva do genoma e dos efeitos da seleção. Locus SSR apresentam segregação mendeliana, expressão codominante, são altamente multialélicos e parecem ser geneticamente estáveis. Seu uso é sugerido na identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações, pois todos os alelos dos locos SSR podem ser detectados e discriminados por esse marcador (Ferreira e Grattapaglia, 1998).



SSR ("Sequências simples repetidas" ou "Microsatélites")

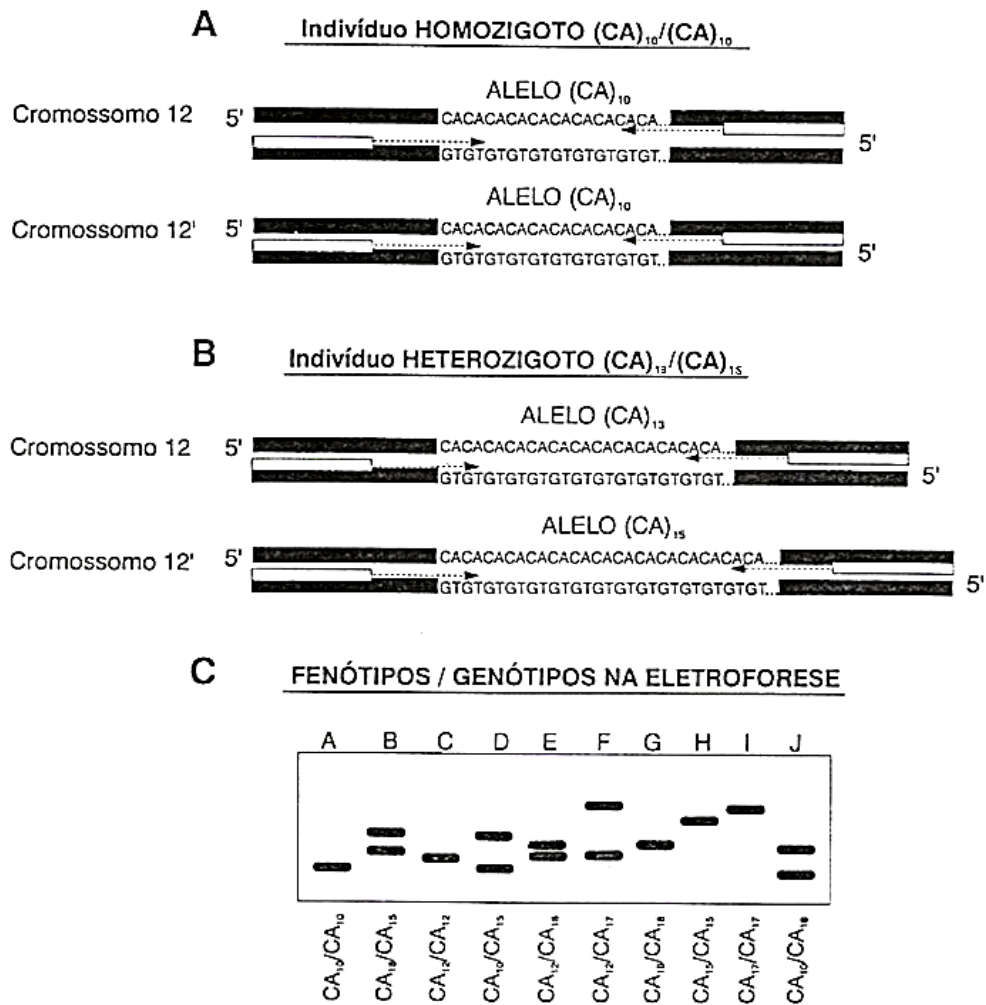


Figura 8. Base genética e detecção de polimorfismo de microsatélites. Figuras A e B ilustram genótipos homocigotos e heterocigotos, respectivamente. A figura C ilustra um gel de eletroforese com diferentes genótipos homocigotos (uma banda) e heterocigotos (duas bandas). (Fonte: Ferreira e Gratapaglia, 1998).



Cada unidade de microssatélite (loco polialélico) pode ser detectada via eletroforese automática ou em gel de poliacrilamida e, em um indivíduo diplóide à amplificação de um loco resultará em uma ou duas bandas (ou pico(s) no eletroferograma), caso ele seja homocigoto ou heterocigoto, respectivamente (Fungaro e Vieira, 2001) (Figura 9).

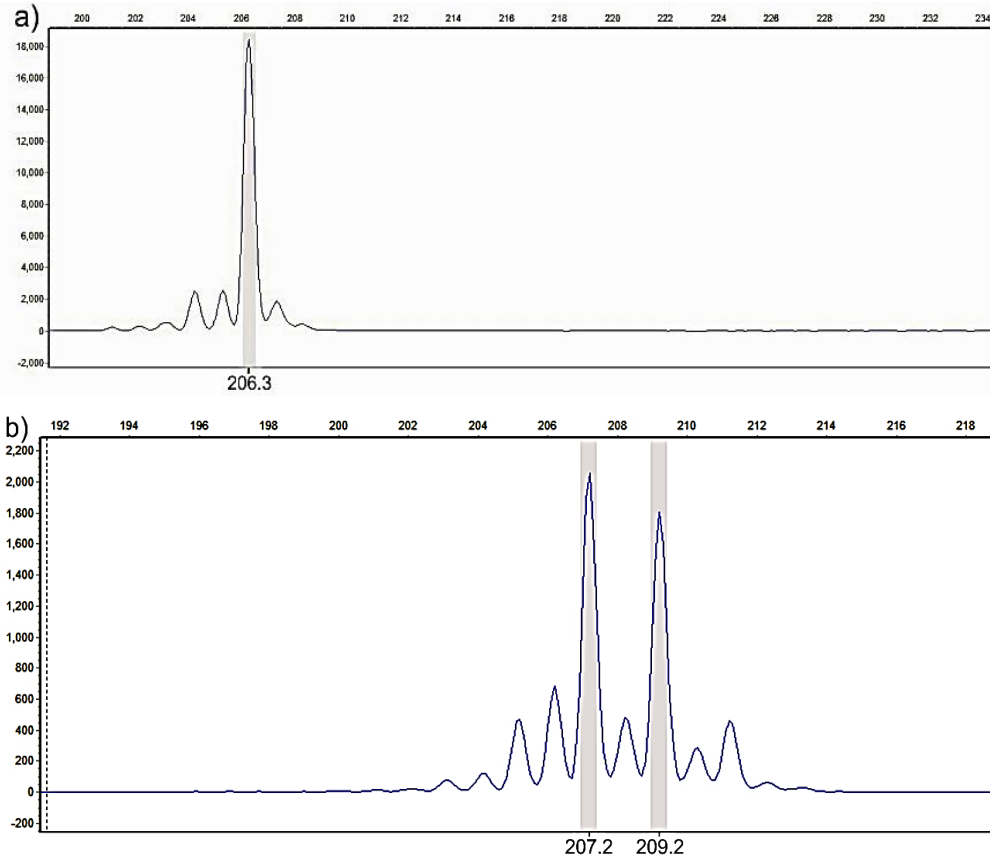


Figura 9. Perfil de eletroferograma para *Euglossa annectans* obtido com o *primer* de microssatélite Ann2 (ver Paxton et al., 2009), representando um indivíduo haploide (a) e diploide (b).

Nos últimos anos vários estudos empregando marcadores microssatélites para análises genéticas de populações de diferentes espécies de Euglossini da Mata Atlântica vêm sendo realizados (Souza et al., 2010; Freiria et al., 2012; Rocha-Filho e Garofálo, 2013; Boff et al., 2014; Penha et al., 2015; Giangarelli et al., 2015b), auxiliando no aumento do conhecimento genético das populações dessas abelhas. Assim, tais marcadores foram utilizados neste estudo para investigar as frequências de machos diplóides em populações de diferentes espécies destas abelhas.



Referências Bibliográficas

- Ackerman, J.D. (1983) Diversity and seasonality of male euglossine bees (Hymenoptera: Apidae) in Central Panama. *Ecology* **64**, 274–283
- Aguiar, W.M., Gaglianone, M.C. (2012) Euglossine bee communities in small forest fragments of the Atlantic Forest, Rio de Janeiro state, southeastern Brazil (Hymenoptera, Apidae). *Rev. Bras. Entomol.* **56**, 210–219
- Alves-dos-Santos, I. (1999). Distribuição vertical de uma comunidade de abelhas do Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Entomol.* **43**, 225–238
- Araújo, D.S.D., Lacerda, L.D. (1987) A natureza das restingas. *Ciência Hoje* **6**, 42–48
- Azevedo, N.H., Martini, A.M.Z., Oliveira, A.A., Scarpa, D.L., Petrobras, USP, IB, LabTrop/BioIn (2014) *Ecologia na restinga: uma sequência didática argumentativa*, 1ª ed., São Paulo
- Brosi, B.J. (2009) The effects of forest fragmentation on euglossine bee communities (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Biol. Conserv.* **142**, 414–423
- Câmara, I.G. (2003) Brief history of conservation in the Atlantic forest. In: C. Galindo-Leal & I.G. Câmara (eds.). *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook*. Center for Applied Biodiversity Science, Island Press, Washington. D.C, pp. 31–42
- Campanili, M., Prochnow, M. (2006) *Mata Atlântica – uma rede pela floresta*. RMA, Brasília
- Cordeiro, D.C., Boff, S., Caetano, T.A., Fernandes, P.C., Alves-dos-Santos, I. (2013) Euglossine bees (Apidae) in Atlantic forest areas of São Paulo State, southeastern Brazil. *Apidologie*, **44**, 254–267
- Colombo, A.F., Joly, C.A. (2010) Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. *Braz. J. Biol.* **70**, 697-708
- Dressler, R.L. (1982) Biology of orchid bees (Euglossini). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **13**, 373–394
- Dodson, C.H., Dressler, R.L., Hills, H.G., Adams, R.M., Williams, N.H. (1969) Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science* **164**, 1243–1249
- Elias, J., Mazzi, D., Dorn S. (2009) No need to discriminate? Reproductive diploid males in a parasitoid with complementary sex determination. *Plos One* **4**, e6024
- Eltz, T., Whitten, M.W., Roubik, D.W., Linsenmair, K.E. (1999) Fragrance collection, storage and accumulation by individual male orchid bees. *J. Chem. Ecol.* **25**, 157–176



- Eltz T., Roubik D.W., Whitten W.M. (2003) Fragrances, male display and mating behavior, our of *Euglossa hemichlora*: a flight cage experiment. *Phys. Entomol.* **28**, 251–260
- Eltz, T., Roubik, D.W., Lunau, K. (2005) Experience-dependent choices ensure species-specific fragrance accumulation in male orchid bees. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **59**, 149–156
- Eltz, T., Bause, C., Hund, K., Quezada-Euan, J.J.G., Pokorny, T. (2015) Correlates of perfume load in male orchid bees. *Chemoecology* **25**, 193–199
- Essinger, L.N. (2005) Euglossini (Apidae, Hymenoptera) no sul de Santa Catarina. Dissertação, Universidade do Extremo Sul Catarinense
- FAO (2011) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma
- Faria, L.R.R., Melo, G.A.R. (2011) A new species of *Eufriesea* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossina) from northeastern Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* **55**, 35–39
- Faria, L.R.R., Zanella, F.C.V. (2015) Beta-ionone attracts *Euglossa mandibularis* (Hymenoptera, Apidae) males in western Paraná forests. *Rev. Bras. Entomol.* **59**, 260–264
- Ferreira, M.E., Grattapaglia, D. (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Embrapa-Cenargen, Brasília
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. (2008) Fundamentos de Genética da Conservação. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto
- Freiria, G.A., Bombarda J.R, Souza R.F., Sofia, S.H. (2012) Population structure and genetic diversity of the orchid bee *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) from Atlantic Forest remnants in southern and southeastern Brazil. *Apidologie* **43**, 392–402
- Fundação SOS Mata Atlântica, INPE (2014) Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2012-2013. Dados parciais dos estados avaliados até maio de 2013. São Paulo
- Fundação SOS Mata Atlântica; INPE (2015) Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2013-2014. Dados parciais dos estados avaliados até maio de 2014. São Paulo
- Fungaro, M.H.P., Vieira, M.L.C. (2001) Marcadores moleculares. In: Fungaro, M. H.P., Vieira, M.L.C., Serafini, L.A., Barros, N.M., De Azevedo, J.L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Agropecuária, Guaíba



- Galetti, M., Donatti, C.I., Pires, A.S., Guimarães, P.R., Jordano, P. (2006) Seed survival and dispersal of an endemic Atlantic forest palm: the combined effects to defaunation and forest fragmentation. *Bot. J. Linn. Soc.* **151**, 141–149
- Galetti, M., Pizo, M.A., Morellato, L.P.C. (2002) Métodos para estudo de fenologia, frugivoria e dispersão de sementes. In *Manual Brasileiro em Biologia da Conservação* (Cullen Jr, L., Rudran, R., Padua, C.V. eds.). Smithsonian Institution Press, Washington, pp. 395–422
- Galindo-Leal, C., Câmara, I.G. (2005) Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. In Galindo-Leal, C., Câmara, L.G.(eds.). *Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas*. Fundação SOS Mata Atlântica, Belo Horizonte
- Giangarelli, D.C., Freiria, G.A., Colatreli, O.P., Suzuki, K.M., Sofia, S.H. (2009) *Eufriesea violácea* (Blanchard) (Hymenoptera: Apidae): an orchid bee apparently sensitive to size reduction in forest patches. *Neotrop. Entomol.* **38**, 1–6
- Giangarelli, D.C., Sofia, S.H. (2011) First record of the orchid bee *Euglossa viridis* (Perty) (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) from Paraná State, southern Brazil. *Braz. J. Biol.* **71**, 223
- Giangarelli, D.C., Aguiar, W.M., Sofia, S.H. (2015a) Orchid bee (Hymenoptera: apidae: Euglossini) assemblages from three different threatened phytophysiognomies of the subtropical Brazilian Atlantic Forest. *Apidologie* **46**, 71–83
- Giangarelli, D.C., Freiria, G.A., Ferreira, D.G., Aguiar, W.M., Penha, R.E.S., Alves, A. N., Gaglianone, M.C., Sofia, S.H. (2015b) Orchid bees: a new assessment on the rarity of diploid males in populations of this group of Neotropical pollinators. *Apidologie* **46**, 606-617
- Gonçalves, R.B., Scherer, V.L., Oliveira, P.S. (2014) The orchid bees (Hymenoptera, Apidae, Euglossina) in a forest fragment from western Paraná state, Brazil. *Pap. Avulsos Zool.* **54**, 63–68
- Harpur, B.A., Sobhani, M., Zaed, A. (2013) A review of the consequences of complementary sex determination and diploid male production on mating failures in the Hymenoptera. *Entomol. Exp. Appl.* **146**, 156–164
- IBAMA (2011) Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. [On line] <http://www.ibama.org.br>. (Acessado em 25/03/2011)
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (1992) *Manual Técnico da Vegetação Brasileira*. Rio de Janeiro
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2005) *Malha municipal*. IBGE. Rio de Janeiro



- IPARDES (Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social). (2001) Zoneamento da Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba/ Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico Social. Curitiba
- Janzen, D.H. (1971) Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. *Science* **171**, 203–205
- Janzen, D.H., De Vries, P.J., Higgins, M.L., Kimsey, L.S. (1982) Seasonal and site variation in Costa Rican euglossine bees at chemical baits in lowland deciduous and evergreen forests. *Ecology* **63**, 66–74
- Jaster, B.C.A. (1995) Análise Estrutural de Algumas Comunidades Florestais no Litoral do Estado do Paraná, na Área de Domínio da Floresta Ombrófila Densa – Floresta Atlântica. Dissertação, Universidade Geor-August de Göttingen/Alemanha
- Jaster, B.C.A. (2002) A estrutura como indicadora do nível de desenvolvimento sucessional de comunidades arbóreas da restinga. Curitiba. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba
- Kimsey, L.S. (1984) The behavioural and structural aspects of grooming and related activities in euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Zool.* **204**, 541-550
- Laurance, W.F., Goosem, M., Laurance, S.G.H. (2009) Impacts of roads and linear clearings on tropical forests. *Trends Ecol. Evol.* **24**, 659–669
- López-Urbe, M.M., Almanza, M.T., Ordóñez, M. (2007) Diploid male frequencies in Colombian populations of euglossine bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Biotropica* **39**, 660–662
- Maack, R. (1968) Geografia física do Estado do Paraná. Codepar, UFPR, IBPT, Curitiba
- Maack, R. (1981) Geografia física do estado do Paraná. J. Olympio, Curitiba
- Madeira-da-Silva, M.C., Martins, C.F. (2003) Abelhas (Hymenoptera, Apoidea Apiformes) de uma área de restinga, Paraíba, Nordeste do Brasil: Abundância, diversidade e sazonalidade. *Rev. Nordestina Biol.* **17**, 75–90
- Mantovani, W. (2003) A degradação dos biomas brasileiros. In: Ribeiro, W.C. (Org.). Patrimônio Ambiental Brasileiro. Coleção Uspiana: Brasil 500 anos. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo
- Martins, A.N.G. (2007) A macrofauna bentônica das praias arenosas expostas do Parque Nacional de Superagüi – PR: Subsídios ao Plano de Manejo. Dissertação Mestrado em Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba



- Matioli, S.R., Passos-Bueno, M.R.S. (2001) Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: MATIOLI, S. R. (ed) *Biologia Molecular e Evolução: Holos, Ribeirão Preto*
- Mattozo, V.C., Faria, L.R.R., Melo, G.A.R. (2011) Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) in the coastal forests of southern Brazil: diversity, efficiency of sampling methods and comparison with other Atlantic forest surveys. *Pap. Avulsos Zool.* **51**, 505–515
- Michener, C.D. (2007) *The bees of the world*. Johns Hopkins University Press, second edition. Baltimore
- Minckley, R.L., Reyes, S.G. (1996) Capture of the Orchid bee, *Eulaema polychroma* (Friese) (Apidae: Euglossini) in Arizona, with notes on northern distributions of other mesoamerican bees. *J. Kansas Entomol. Soc.* **69**, 102–104
- MMA (Ministério do Meio Ambiente) (2000) Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. CI, Fund. SOS Mata Atlântica, Fund. Biodiversitas, IPE, SEMA-SP, SEMAD/IEF-MG, MMA/SBF. Brasília
- MMA (Ministério do Meio Ambiente) (2007) Mapa das áreas prioritárias. <http://www.mma.gov.br>. (Acessado em 06/05/2014)
- Moure, J.S. (2003). As espécies de *Eulaema* Lepeletier, 1841 (Hymenoptera, Apidae, Euglossinae). *Acta Biol. Par.* **29**, 1–70
- Moure, J.S., Schindwein, C. (2002) Uma nova espécie de *Euglossa* (*Euglossella*) Moure do nordeste do Brasil (Hymenoptera, Apidae). *Rev. Bras. Zool.* **19**, 585–588
- Moure, J.S., Melo, G.A.R., Faria, L.R.R. Jr (2012) Euglossini Latreille, 1802. In: Moure, J.S., Urban, D., Melo, G.A.R. (Orgs.) *Catalogue of Bees* (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. (Acessado em 18 julho 2015)
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**, 853–858
- Nascimento, A.T.A. (2008) Uso do espaço e seleção de habitat pelo Mico-Leão-da-Cara-Preta (*Leontopithecus caissara*). Dissertação de Mestrado em Ecologia Aplicada, USP, Piracicaba
- Nascimento, A.T.A., Schmidlin, L.A.J., Valladares-Padua, C.B., Matushima, E.R., Verdade, L.M. (2011), A comparison of the home range sizes of mainland and island populations of black-faced lion tamarins (*Leontopithecus caissara*) using different spatial analysis. *Am. J. Primatol.* **73**, 1114–1126



- Nemésio, A., Silveira, F.A. (2007) Orchid bee fauna (Hymenoptera: Apidae: Euglossina) of Atlantic Forest fragments inside an urban area in southeastern Brazil. *Neotrop. Entomol.* **36**, 186–191
- Nemésio, A. (2009) Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of the Brazilian Atlantic Forest. *Zootaxa* **2041**, 1–242
- Nemésio, A. (2010) The Orchid-bee fauna (Hymenoptera: Apidae) of a forest remnant in northeastern Brazil, with new geographic records and an identification key to the known species of the Atlantic Forest of northeastern Brazil. *Zootaxa* **2656**, 55–66
- Nemésio, A. (2011) The Orchid-bee fauna (Hymenoptera: Apidae) of a forest remnant in southern Bahia, Brazil, with new geographic records and an identification key to the known species of the área. *Zootaxa* **2821**, 47–54
- Nemésio, A. (2013a) The Orchid-bee faunas (Hymenoptera: Apidae) of two Atlantic Forest remnants in southern Bahia, eastern Brazil. *Braz. J. Biol.* **73**, 375–381
- Nemésio, A. (2013b) The Orchid-bee fauna (Hymenoptera: Apidae) of ‘Reserva Biológica de Una’, a hotspot in the Atlantic Forest of southern Bahia, eastern Brazil. *Braz. J. Biol.* **73**, 347–352
- Nemésio, A. (2014) The Orchid-bee faunas (Hymenoptera: Apidae) of ‘Reserva Ecológica Michelin’, ‘RPPN Serra Bonita’ and one Atlantic Forest remnant in the state of Bahia, Brazil, with new geographic records. *Braz. J. Biol.* **74**, 16–22
- Oliveira, F.S., Mendonça, M.W.A., Vidigal, M.C.S., Rêgo, M.M.C., Albuquerque, P.M.C. (2010) Comunidade de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) em ecossistema de dunas na Praia de Panaquatira, São José de Ribamar, Maranhão, Brasil. *Rev. Bras. Entomol.* **54**, 82–90
- Passos, F.C., Graciolli, G. (2004) Observações ações da dieta de *Artibeus lituratus* (Olfers) (Chiroptera, Phyllostomidae) em duas áreas do sul do Brasil. *Rev. Bras. Zool.* **21**, 487–489
- Pemberton, R.W., Wheeler, G.S. (2006) Orchid bees don’t need orchid’s mutualists: evidence from the naturalization of an orchid bee in Florida. *Ecology* **87**, 1995–2001
- Penha, R.E.S., Gaglianone, M.C., Almeida, S.A., Boff, S.V., Sofia, S.H. (2015) Mitochondrial DNA of *Euglossa iopoecila* (Apidae, Euglossini) reveals two distinct lineages for this orchid bee species endemic to the Atlantic Forest. *Apidologie* **46**, 346–358
- Powell, A.H., Powell, V.N. (1987) Population dynamics of male euglossine bees in Amazonian forest fragments. *Biotropica* **19**, 176–179
- Prado, F. (1999) Ecologia, comportamento e conservação do mico-leão-da-cara-preta (*Leontopithecus caissara*) no Parque Nacional do Superagui, Guaraqueçaba,



- Paraná. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista 'Julio Mesquita Filho', Botucatu
- Ramalho, A.V., Gaglianone, M.C., Oliveira, M.L. (2009) Comunidades de abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em fragmentos de Mata Atlântica no Sudeste do Brasil. *Rev. Bras. Entomol.* **53**, 95–101
- Ramírez, S., Dressler, R.L., Ospina, M. (2002) Abejas euglossinas (Hymenoptera: Apidae) de la región Neotropical: Lista de especies con notas sobre su biología. *Biota Colombiana* **3**, 7–118
- Rebêlo, J.M.M., Garófalo, C.A. (1991) Diversidade e sazonalidade de machos de Euglossini (Hymenoptera, Apidae) e preferências por iscas-odores em um fragment de floresta no sudeste do Brasil. *Rev. Bras. Biol.* **51**, 787–799
- Rebêlo, J.M.M., Garófalo, C.A. (1997) Comunidades de machos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em matas semidecíduas do noroeste do Estado de São Paulo. *An. Soc. Entomol. Bras.* **26**, 243–255
- Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F.J., Hirota, M.M. (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol. Conserv.* **142**, 1141–1153
- Rizzini, C.T. (1979) Tratado de fitogeografia do Brasil. Aspectos ecológicos. 2ª edição, Hucitec / Edusp, São Paulo
- Rocha-Filho, L.C., Garófalo, G. (2013) Community ecology of euglossine bees in the coastal Atlantic Forest of São Paulo State, Brazil. *J. Insect Sci.* **13**, 1–19
- Roderjan, C.V., Kuniyoshi, Y.S. (1988) Macrozoneamento florístico da área de proteção ambiental APA-Guaraqueçaba. FUPEF-série técnica, 15. Curitiba
- Roderjan, C.V., Galvão, F., Kuniyoshi, Y.S., Hatchesbach, G.G. (2002) As unidades fitogeográficas do estado do Paraná. *Cienc. Amb.* **24**, 75–92
- Roubik, D.W., Weigt, L.A., Bonilla, M.A. (1996) Population genetics, diploid males, and limits to social evolution of euglossine bees. *Evolution* **50**, 931–935
- Roubik, D.W., Hanson, P.H. (2004) Abejas de orquídeas de la América tropical. Biología y guía de campo (Orchid bees of Tropical América. Heredia, INBio Press, Costa Rica
- Scherer-Neto, P. (1989) Contribuição à biologia do papagaio da-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*). Dissertação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba
- Schmidlin, L.A.J., Accioly, A., Accioly, P., Kirchner, F.F. (2005) Mapeamento e caracterização da vegetação da ilha de Superagüi utilizando técnicas de geoprocessamento. *Rev. Floresta* **35**, 303–315



- SEMA., IAP. (1996) Plano de manejo da Estação Ecológica da Ilha do Mel, Paraná. Curitiba
- Silva, J.M.C., Casteleti, C.H.M. (2005) Estado da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira. In: Galindo-Leal, C., Câmara, I.G. (Eds.). Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas: Fundação SOS Mata Atlântica Conservação Internacional. Belo Horizonte
- Silveira, F.A., Melo, G.A., Almeida, E.A.B. (2002) Abelhas Brasileiras, Sistemática e Identificação. 1ª Ed., MMA e Fundação Araucária, Belo Horizonte
- Silveira, G.C., Nascimento, A.M., Sofia, S.H., Augusto, S.C. (2011) Diversity of the euglossine bee community (Hymenoptera, Apidae) of an Atlantic Forest remnant in southeastern Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* **55**, 109-115
- Silveira, G.C., Freitas, R.F., Tosta, T.H.A., Rabelo, L.S., Gaglianone, M.C., Augusto, S.C. (2015) The orchid bee fauna in the Brazilian savanna: do forest formations contribute to higher species diversity? *Apidologie* **46**, 197–208
- Skov, C., Wiley, J. (2005) Establishment of the Neotropical orchid bee *Euglossa viridissima* (Hymenoptera: Apidae) in Florida. *Fla. Entomol.* **88**, 225–227
- Sofia, S.H., Santos, A.M., Silva, C.R.M. (2004) Euglossine bees (Hymenoptera, Apidae) in a remnant of Atlantic Forest in Paraná State, Brazil. *Iheringia* **94**, 217–222
- Solé-Cava, A.M., Cunha, H.A. (2012) A Genética e a Conservação da Natureza. Em: Matioli SR, *Biologia Molecular e Evolução*. 2ª Ed, Holos editora, Ribeirão Preto
- Souza, R.O., Del Lama, M.A., Cervini, C., Mortari, N., Eltz, T., Zimmermann, Y., Bach, C., Brosi, B.J., Suni, S., Quezada-Euan, J.J.G., Paxton, R.J. (2010) Conservation genetics of Neotropical pollinators revisited: microsatellite analysis demonstrates that diploid males are rare in orchid bees. *Evolution* doi:10.1111/j.1558-5646.2010.01052.x
- Storck-Tonon, D., Morato, E.F., Melo, A.W.F., Oliveira, M.L. (2013) Orchid Bees of forest fragments in Southwestern Amazonia. *Biota Neotrop.* **13**, 133–141
- Tonhasca, A.Jr. (2005) *Ecologia e história natural da Mata Atlântica*, Editora Interciência, Rio de Janeiro
- Unruh, T.R., Messing, R.H. (1993) Intraspecific biodiversity in Hymenoptera: Implications for conservation and biological control. In: LaSalle, J., Gauld, I.D. (eds). *Hymenoptera and Biodiversity*, C-A-B International. Wallingford
- Veloso, H.P., Góes-Filho, L. (1982) Fitogeografia brasileira - classificação fisionômico-ecológica da vegetação Neotropical. *Boletim Técnico do Projeto RADAMBRASIL, Série Vegetação* **1**, 1–80



- Veloso, H.P., Filho, A.L.R.R., Lima, J.C.A. (1991) Classificação da vegetação Brasileira, adaptada a um sistema universal. IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais Rio de Janeiro
- Viana, B.F., Alves-Dos-Santos, I. (2002) Bee diversity of the coastal sand dunes of Brazil. In: Kevan, P., Imperatriz Fonseca, V.L. (eds) - Pollinating Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature - Ministry of Environment, Brasília
- Vivekananda, G. (2001) Parque Nacional do Superagui: a presença humana e os objetivos de conservação. Dissertação, Federal do Paraná, Curitiba
- Whitten, W.M., Young, A.M., Williams, N.H. (1989) Function of glandular secretions in fragrance collection by male euglossine bees (Apidae: Euglossini). *J. Chem. Ecol.* **15**, 1285-1295
- Williams, N.H., Whitten, W.M. (1983) Orchid floral fragrances and male euglossine bees: methods and advances in the last sesquidecade. *Biol. Bulletin* **164**, 355–395
- Wittman D., Hoffmann, M., Scholz, E. (1988) Southern distributional limits of euglossine bees in Brazil linked to habitats of the Atlantic – and subtropical rain forest (Hymenoptera: Apidae: Euglossina). *Entomol. Gener.* **14**, 53–60
- WWF (2011) Visão da Biodiversidade da Ecorregião Serra do Mar. [on line] <http://www.wwf.org.br/informacoes/biblioteca/?28724/Visao-da-Biodiversidade-da-Ecorregiao-Serra-do-Mar>. (Acessado 12/06/20115)
- Zayed A., Roubik D.W., Packer L. (2004) Use of diploid male frequency data as an indicator of pollinator decline, *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **271**, S9–S12
- Zayed, A. (2009) Bee genetics and conservation. *Apidologie* **40**, 237–262
- Zucchi, R., Sakagami, S.F., Camargo, J.M.F. (1969) Biological observations on a Neotropical parasocial bee *Eulaema nigrita*, with a review of the biology of Euglossinae. A comparative study. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. (Ser. Zool.)* **17**, 271–380



OBJETIVOS



OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Tendo em vista a importância ecológica do Corredor de Biodiversidade da Serra do Mar para a conservação da Biodiversidade da Mata Atlântica, o presente trabalho teve como objetivo geral estudar as comunidades de Euglossini de duas fitofisionomias distintas, Floresta Ombrófila Densa e Restinga, localizadas em uma área costeira no estado do Paraná.

Objetivos Específicos:

- Identificar as espécies que compõem as comunidades de Euglossini nas áreas composta por vegetação de Floresta Ombrófila Densa (terras baixas) e Restinga da Ilha do Superagui, no Parque Nacional do Superagui;
- Comparar a riqueza, diversidade e dominância de espécie e abundância de indivíduos nos dois tipos de fitofisionomias estudadas e com outros estudos realizados em áreas do Corredor de biodiversidade da Serra do Mar;
- Avaliar o padrão de abundância e riqueza dos machos euglossíneos, durante três anos consecutivos na área de Floresta Ombrófila Densa;
- Avaliar a exploração das diferentes espécies às oito fragrâncias ofertadas na área de Floresta Ombrófila Densa, e os possíveis padrões de visitação às estas diferentes fragrâncias durante a estação quente e úmida em três anos consecutivos de amostragem;
- Analisar a amplitude e sobreposição de nichos no uso de iscas aromáticas pelas espécies mais abundantes em número de indivíduos em duas áreas estudada;



-
- Comparar o uso das espécies mais abundantes, ao conjunto de fragrâncias disponíveis, em duas áreas de Floresta Ombrófila Densa na região da APA de Guaraqueçaba;
 - Estimar a frequência de machos diploides em seis populações de Euglossini amostrados em áreas de Mata Atlântica com diferentes tamanhos e níveis de preservação.



Capítulo 1

A comunidade de abelhas Euglossini da Ilha Superagui: Diversidade em áreas de Floresta Ombrófila Densa e Restinga

Douglas Caldeira Giangarelli e Silvia Helena Sofia

(Trabalho a ser submetido à Revista Apidologie)



A comunidade de abelhas Euglossini da Ilha do Superagui: Diversidade em áreas de Floresta Ombrófila Densa e Restinga

Douglas Caldeira Giangarelli e Silvia Helena Sofia

Resumo - Até o momento, são poucos os estudos sobre as comunidades de Euglossini presentes em Floresta Ombrófila Densa (FOD) e Restinga (RES) em ambientes localizadas em latitudes mais ao sul no domínio Mata Atlântica. Assim, este trabalho investigou as comunidades destas abelhas presentes nestes dois tipos de fitofisionomia na Ilha do Superagui, região litorânea do estado do Paraná, sul do Brasil. Os machos atraídos a oito essências químicas foram capturados com rede entomológica por dois pesquisador simultaneamente. As amostragens, com duração de quatro horas cada, ocorreram apenas nos meses mais quentes e úmidos, entre novembro de 2012 e março de 2014, totalizando 10 amostragens nos dois tipos de formação vegetal. Foram capturados 266 machos na FOD pertencentes a 13 espécies e quatro gêneros de Euglossini, enquanto na Restinga foram amostrados apenas 64 indivíduos, pertencentes a oito espécies e três gêneros: *Euglossa* >*Eulaema* >*Eufriesea*. Além das diferenças detectadas entre FOD e RES em relação à riqueza de espécies e abundância de machos atraídos às iscas, o conjunto de espécies mais frequentes também diferiu significativamente, como segue: na área de FOD *Euglossa stellfeldi* (25,2%), *Euglossa annectans* (24,3%), *Euglossa iopoecila* (21%) e *Euglossa roderici* (17,7%) constituíram as espécies mais frequentes, enquanto na área de Restinga *Euglossa cordata* (35,9%) *Euglossa stellfeldi* (34,4%) representaram juntas cerca de 70% da amostra total. Apesar de próximas, as áreas de FOD e RES amostradas apresentaram diferenças relevantes nas suas comunidades de abelhas das orquídeas, sugerindo que estes dois tipos de fitofisionomias constituíram um fator importante para as diferenças encontradas, embora outros fatores possam também estar envolvidos como já demonstrado em outros estudos.

Estrutura de comunidades / Mata Atlântica / abelhas das orquídeas / fauna Neotropical / riqueza de espécies



1. INTRODUÇÃO

Do conjunto de aproximadamente 250 espécies de abelhas das orquídeas (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) atualmente reconhecidas (Moure et al. 2012), cerca de 50 ocorrem no domínio Mata Atlântica e, metade destas 50 espécies têm sido apontadas como endêmicas às áreas da Mata Atlântica (Nemésio 2009).

Com distribuição quase que restrita às Américas Central e do Sul, as abelhas da tribo Euglossini formam um grupo distinto dentro da família Apidae (Dressler 1982; Cameron 2004; Roubik e Hanson 2004). São abelhas normalmente de colorido metálico, com seus machos apresentando as pernas modificadas para a coleta e armazenamento de fragrâncias químicas (Dodson et al. 1969; Dressler 1982; Eltz et al. 2003). A íntima associação de machos euglossíneos com orquídeas (Dressler 1968; Williams e Dodson 1972; Williams e Whitten 1983) tornou o grupo popularmente conhecido como “abelhas das orquídeas” (Dressler 1982; Ackerman 1989; Roubik e Hanson 2004).

Consideradas importantes polinizadores, machos e fêmeas destas abelhas são visitantes e polinizadores de mais de 50 famílias de Angiospermas da América tropical (Dodson et al. 1969; Dressler 1982; Ramírez et al. 2002; Roubik e Hanson 2004; Cortopassi-Laurino et al. 2009; Rocha-Filho et al. 2012). As espécies desta tribo distribuem-se entre cinco gêneros - *Euglossa*, *Eulaema*, *Eufriesea*, *Exaerete* e *Aglae* – sendo os três primeiros de vida livre e os dois últimos cleptoparasitas dentro da própria tribo (Dressler 1982).

Uma série de estudos realizados nas últimas duas décadas em remanescentes de Mata Atlântica (MA) aumentou significativamente o conhecimento sobre as comunidades de abelhas Euglossini presentes nos diferentes tipos de formação vegetal que compõem a MA (ex. Rebêlo e Garófalo 1991, 1997; Bonilla-Gómez 1999; Peruquetti et al. 1999; Tonhasca et al. 2002; Viana et al. 2002; Souza et al. 2005; Aguiar e Gaglianone 2012; Ramalho et al. 2009; Nemésio 2010, 2011; Silveira et al. 2011; Cordeiro et al. 2013; Rocha-Filho e Garófalo 2013; Gonçalves et al. 2014; Giangarelli et al. 2015). A maior parte destes estudos foi desenvolvida em remanescentes de Floresta Estacional Semidecidual e de Floresta Ombrófila Densa, com alguns destes em ambos os tipos de fitofisionomias (ex. Giangarelli et al. 2015). Embora, a princípio, o número de estudos envolvendo comunidades de Euglossini se revele expressivamente elevado, merece destaque o fato de que a maioria destes estudos ter sido realizada em latitudes inferiores ao paralelo 25°S. De modo contrário, um



número reduzido de estudos inventariou as faunas destas abelhas em áreas posicionadas acima desta latitude, podendo, deste modo, serem aqui relacionados (Wittmann et al. 1988; Sofia e Suzuki 2004; Sofia et al. 2004; Mattozo et al. 2011; Gonçalves et al. 2014; Giangarelli et al. 2015). Destes últimos, três estudos (Wittmann et al. 1988; Mattozo et al. 2011; Giangarelli et al. 2015) foram realizados em áreas remanescentes de Floresta Ombrófila Densa (FOD), no sul do Brasil. Em particular, merecem destaque os estudos de Mattozo et al. (2011) e Giangarelli et al. (2015) os quais contribuíram de forma significativa para o maior conhecimento das espécies de Euglossini presentes em paralelos mais ao sul do Brasil, pois registraram a incidência de cerca de 17 espécies para uma região da Serra do Mar, está considerada a maior faixa contínua do domínio Mata Atlântica (SOS Mata Atlântica e INPE 2015). Segundo Nemésio (2009), poucas áreas de MA têm sido amostradas sistematicamente para o conhecimento de Euglossini.

Em termos de ecossistemas de Mata Atlântica, ainda muito menos estudadas que os ecossistemas de Floresta Ombrófila Densa, estão as comunidades de Euglossini em fitofisionomias de Restinga. Dentre os estudos realizados até o presente em vegetação de restinga (Neves e Viana 2002; Viana et al. 2002; Silva et al. 2009), poucos foram desenvolvidos em áreas pertencentes ao domínio MA (Neves e Viana 2002; Viana et al. 2002).

Levantamentos sistemáticos ao longo de áreas de MA da costa brasileira têm levado à descrição de novas espécies (ex. Moure e Schlindwein 2002; Nemésio 2008, 2010; Faria e Melo 2012). Além de contribuírem com informações sobre a biodiversidade local e regional, tais levantamentos faunísticos, não raro, adicionam informações sobre os limites de ocorrência de algumas espécies e, conseqüentemente, auxiliam na compreensão da biogeografia dos grupos estudados. Como exemplo, no caso particular de Euglossini em áreas de MA, pode ser citado o estudo de Giangarelli e Sofia (2011), que registrou pela primeira vez a ocorrência de *Euglossa viridis* (Perty, 1833), em latitudes maiores do que era inicialmente conhecido para esta espécie de abelhas das orquídeas. Mas, o mesmo tipo de registro tem ocorrido também para outros tipos de formações vegetais ou biomas (Anjos-da-Silva et al. 2006; Anjos-da-Silva 2008; Silva et al. 2013).

Constituindo no passado uma das maiores florestas das Américas, atualmente a Mata Atlântica está reduzida a menos de 10% de sua cobertura original, sendo ainda evidente o avanço do desmatamento em suas áreas remanescentes (SOS Mata Atlântica e INPE 2015). Da cobertura remanescente, mais de 80% desta é representada por



fragmentos menores que 50 hectares (Ribeiro et al. 2009). Além disto, segundo estes autores, das áreas remanescentes apenas 9% estão protegidas como reservas, as quais protegem apenas 1% da floresta original, com o restante sendo áreas já alteradas.

Atualmente, um dos maiores e ainda bem preservados remanescentes de FOD da Mata Atlântica encontra-se inserido na região da Área de Proteção Ambiental (APA) de Guaraqueçaba, (IPARDES 2001), onde também pode ser encontrada uma importante cobertura de restinga do sul do litoral brasileiro (Vivekananda 2001). Fazendo parte desta APA está o Parque Nacional do Superagui (PNS), formado em sua maior parte pela a Ilha do Superagui (IS), a qual é recoberta principalmente por esses dois tipos de formação vegetal (Vivekananda 2001). Embora toda esta região tenha sido considerada como uma das áreas prioritárias para ações de conservação e estudos relacionados ao conhecimento da diversidade de diferentes grupos animais (MMA 2000), a mesma ainda carece de estudos sobre as comunidades de abelhas das orquídeas, além de outros grupos de abelhas, presentes nos seus diferentes tipos de formação vegetal.

Assim, este trabalho teve como objetivo estudar as comunidades de Euglossini nos dois principais tipos de formação vegetal que recobrem a Ilha do Superagui (IS), FOD e restinga. Embora dois outros estudos sobre Euglossini tenham sido realizados em áreas do continente na mesma região (Mattozo et al. 2011; Giangarelli et al. 2015), análises comparativas com os resultados de ambos os estudos revelaram diferenças importantes em relação a riqueza e abundância nas comunidades amostradas destas abelhas. Além disto, a própria condição da IS ser uma ilha artificial, e apesar desta fazer parte de uma Unidade de Conservação, ela está sujeita à contínua interferência antrópica, tornando-se, portanto, uma área de interesse para o estudo e conservação de sua biodiversidade.



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo

O presente trabalho foi realizado na região setentrional do litoral do estado do Paraná, na Ilha do Superagui (25°15'S-25°29'S, 48°06'W-48°19'W) (Figura 1). A Ilha do Superagui (IS) possui 14.511 ha e junto com as Ilhas das Peças, Pinheiro e Pinheirinho e com a região do Vale do Rio dos Patos (região continental), formam o PARNA ou Parque Nacional do Superagui (PNS). Este parque governamental possui uma área total de 33.930 ha e é considerado um dos cinco ecossistemas costeiros mais importantes do mundo (Jaster 2002).

Como mencionado acima, o PNS encontra-se localizado dentro da APA de Guaraqueçaba, a qual se encontra em um estado de conservação considerado surpreendentemente bom (IPARDES 2001). Esta APA forma juntamente com os remanescentes vegetais presentes no litoral sul do estado de São Paulo a maior faixa contínua de Floresta Atlântica do litoral brasileiro; representando atualmente o maior remanescente de Floresta Ombrófila Densa dentro do domínio da Mata Atlântica. Estas duas áreas fazem parte do *Corredor de Biodiversidade da Serra do Mar*, considerada uma das áreas mais ricas em biodiversidade da Mata Atlântica (Galindo-Leal e Câmara 2005).

Ligada anteriormente ao continente, a IS deixou de ser uma península para se tornar uma ilha artificial após a abertura do Canal do Varadouro em 1953, com cerca de 6 km de comprimento e 50 metros de largura, este foi construindo com o propósito de facilitar a navegação (Vivekananda 2001). Embora esteja muito próximo do continente, este isolamento da área do PNS, há cerca de 60 anos, representa uma forma de fragmentação de hábitat, e como tal, um impacto antropogênico potencial à biodiversidade local.

A IS é composta principalmente por vegetação do tipo: Floresta Ombrófila Densa (terras baixas = 44% e submontana = 2%), restinga (restinga baixa = 3%, arbustiva = 15% e arbórea = 12%), mangue (9%) e brejos (9%) (Schmidlin et al. 2005). O clima da região, seguindo a escala de Köppen, é do tipo *Cfa*, ou seja, clima subtropical úmido, sem estação seca e isento de geadas, com temperatura média anual a 21°C e as médias pluviométricas ficam em torno de 2.500 mm (IAPAR 1978).



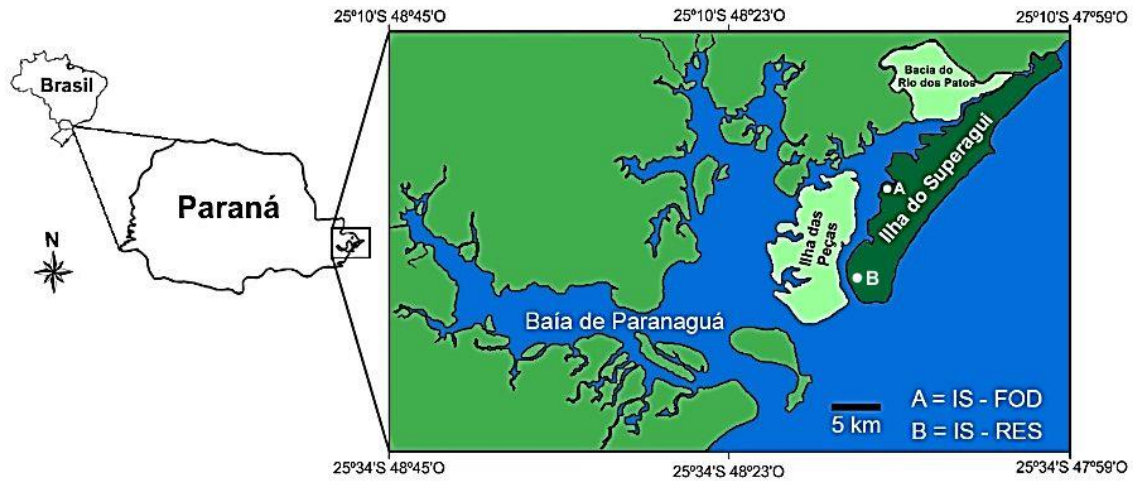


Figura 1. Localização geográfica do Parque Nacional do Superagui, em destaque (tons claros), encontra-se a Ilha das Peças e a Baía do Rio dos Patos e em tom escuro localiza-se a Ilha do Superagui, A refere-se ao ponto de amostragem composto de Floresta Ombrófila Densa e B ao ponto composto por vegetação de Restinga.

2.2. Amostragens

Para este estudo foram selecionadas duas áreas de fitofisionomias distintas, uma composta por Floresta Ombrófila Densa de terras baixas ($25^{\circ}23'7''S$ e $48^{\circ}13'34''W$), e outra composta por restinga-arbórea ($25^{\circ}27'74''S$ e $48^{\circ}14'19''W$), separadas por uma distância de cerca de 7.500 m. Em cada uma das áreas foram selecionados dois pontos de coleta, separados por aproximadamente 300 metros que foram amostrados simultaneamente por dois coletores. Em cada ponto amostrado foram disponibilizadas oito diferentes tipos de essências, totalizando 16 iscas-odores ofertadas por período amostrado.

Foram realizadas um total de 10 amostragens em cada área estudada (FOD e restinga), todas as coletas foram realizadas no período entre 9:00 e 13:00 horas, com duração de quatro horas por dia, totalizando 40 horas de amostragem. Os machos da tribo Euglossini foram atraídos as seguintes iscas-odores: eucaliptol, eugenol, vanilina, beta-ionona, salicitalto de metila, benzoato de benzila, acetato de benzila e cinamato de metila. Os espécimes coletados com rede entomológica foram acondicionados individualmente em frascos plásticos com etiquetas, onde foram registrados a data, local, horário da coleta, coletor e a fragrância visitada. Os indivíduos coletados foram montados em alfinetes entomológicos, etiquetados com todas as informações pertinentes e identificados em nível de espécie. Os dois tipos de fitofisionomias, sempre que possível, foram amostrados em dois dias subsequentes.



No presente estudo, a taxonomia utilizada segue Moure et al. (2012), no que se refere à relação de espécies reconhecidas para a tribo Euglossini até o presente. Por uma questão de praticidade, no texto a seguir foram adotadas as abreviações usuais para os gêneros de Euglossini amostrados neste estudo, como segue: *Eg.* = *Euglossa*; *Ef.* = *Eufriesea*; *El.* = *Eulaema*; *Ex.* = *Exaerete*.

Parte do material coletado deverá, após tombamento adequado, ser depositado no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL). O restante do material coletado está acondicionado em *freezer* (-20°C) no Laboratório de Genética e Ecologia Animal desta Instituição, para análises moleculares populacionais futuras.

2.3. Análise dos dados

Para verificar diferenças estatísticas entre as faunas de abelhas Euglossini das áreas amostradas e entre os pontos de amostragem da mesma área, foi utilizado o teste t quando os dados apresentaram distribuição normal e o teste Mann-Whitney para dados que não apresentaram este tipo de distribuição (Zar 1996). As análises foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad InStat v. 3.06 (GraphPad 2003), utilizando o nível de significância de 95%.

Para comparar a similaridade entre as faunas dos dois tipos de fitofisionomias amostrados foram utilizados dois índices: a) percentagem de similaridade de Renkonen, calculado pela fórmula: $Sr = \sum \min(p_{1i}, p_{2i})$, sendo p_i a frequência da espécie i na amostra total de uma área; e, b) Sorensen, $Q.S. = 2J / a+b$, onde a e b são os números de espécies que ocorrem nos habitats A e B, e J é o número de espécies presentes em ambos os habitats.

Para verificar a suficiência amostral em relação às coletas das abelhas realizadas foram geradas curvas de rarefação de espécies para as duas fitofisionomias amostradas, utilizando-se para as análises o programa computacional EstimateS, version 9.1.0 (Colwell 2013). Os estimadores de riqueza não paramétricos, Chao1, Jack1 e *Bootstrap*, também foram calculados com auxílio deste programa.

O método Chao 1 estima a riqueza total utilizando o número de *singletons* e *doubletons* (espécies raras com um ou dois indivíduos amostrados por localidade, respectivamente) (Colwell 2013). Enquanto, o método Jackknife 1 (Jack1) estima a riqueza total utilizando o número de *uniques* e *duplicates* (espécies encontradas em apenas uma amostra ou em duas amostras, respectivamente) (Smith e Van Belle, 1984). Por sua vez, *bootstrap* é um estimador baseado na incidência de espécies, utilizando



dados de todas as espécies, não se restringindo às espécies raras (Smith e Van Belle 1984).

Os índices de Shannon-Wiener (H') e de Pielou (J) foram aplicados para os cálculos da diversidade de espécies e da equidade destas na amostra total (Ludwig e Reynolds, 1988). O índice de Berger-Parker foi empregado para o cálculo de dominância. Todos estes índices foram calculados pelo programa PAST 2.07 (Hammer et al. 2011).

A frequência de ocorrência (FO) e dominância (D) para todas as espécies amostradas foram calculadas segundo Palma (1975), onde: $FO = \text{número de amostras com a espécie } i / \text{número de amostras total} \times 100$. $FO \geq 50\%$ indica que a espécie é muito frequente (mf), se $FO < 50\%$ e $\geq 25\%$, a espécie é indicada como frequente (f), se $FO < 25\%$, a espécie é indicada como pouco frequente (pf). Já a dominância será calculada como: $D = \text{abundância da espécie } i / \text{abundância total} \times 100$. Quando $D \geq 5\%$ a espécie será considerada dominante (d), se $D < 5\%$ e $\geq 2,5\%$: espécie acessória (a) e quando $D < 2,5\%$ = espécie ocasional (oc). Estes índices quando analisados em conjunto são usados para agrupar as espécies em três categorias (Ct): espécies comuns (C), intermediárias (I) e raras (R).

2.4. Análise de DCA - Comparação entre as faunas de Euglossini de áreas de Floresta Ombrófila Densa, no litoral dos estados do Paraná e São Paulo, pertencendo ao Corredor de Biodiversidade da Serra do Mar

Por meio de uma DCA (*Detrended Correspondence Analysis*) foi feita uma comparação entre as faunas de abelhas de orquídeas do presente trabalho e de outros quatro estudos, abrangendo outras seis áreas de Floresta Ombrófila Densa no domínio Mata Atlântica, em ambientes continentais (C) e insulares (I), todas as quais fazendo parte do *Corredor de Biodiversidade da Serra do Mar* (conforme Galindo-Leal e Câmara 2005). Para tanto, foi gerada uma matriz quantitativa para os seguintes trabalhos: Giangarelli (2015) [PR-I1], dados do presente trabalho (área insular); Giangarelliet al. (2015) [PR-C1], Guaraqueçaba/PR, (região continental); Mattozo et al. (2011) [PR-C2], Antonina/PR, (região continental); Rocha-Filho e Garófalo (2013) [SP-C1], Ubatuba/SP (continental); [SP-I1], Ilha Anchieta/SP (insular); Cordeiro et al. (2013) [SP-I2], Ilhabela (área insular); [SP-C2], São Sebastião/SP (continental)]. Esta matriz foi analisada com o pacote Vegan 2.2.1 (Oksanen 2011), no programa R.3.1.3 (R



Development Core Team, 2015) e, ao final, foi gerada a análise de correspondência destendenciada (DCA).

3. Resultados

Abundância riqueza, diversidade e dominância

Em cada uma das fitofisionomias estudadas, a comparação das abundâncias de indivíduos e riqueza de espécies entre os dois pontos de amostragem não revelou diferenças significativas nestes dois parâmetros de comunidade analisados (dados não mostrados). Assim, tanto para a área de FOD, quanto para a área de restinga, os dados obtidos nos dois pontos de coleta ativa foram agrupados e são assim apresentados na Tabela 1.

Enquanto na área de FOD foram amostrados 266 machos, pertencentes a 13 espécies e quatro gêneros, na restinga a abundância foi de apenas 64 indivíduos e a riqueza de oito espécies, distribuídas em três gêneros (Tabela 1 e Figura S1).

Para a área de FOD, *Euglossa* Latreille foi o gênero mais abundante (255 indivíduos e nove espécies), representando 95,9% da fauna amostrada neste ambiente, seguido de *Eulaema* Lepeletier (seis indivíduos e duas espécies), *Eufriesea* Cockerell (três indivíduos e uma espécie) e *Exaerete* Hoffmannsegg (dois indivíduos e uma espécie). *Euglossa stellfeldi* foi a espécie mais abundante, seguida de *Euglossa annectans*, *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roderici* (Tabela 1). Estas quatro espécies representaram 88,2% da composição da fauna de Euglossini neste local.

Também na restinga, *Euglossa* foi o gênero mais abundante (90,4%) e diverso (62,5%), seguido de *Eulaema* (abundância = 6,4%; riqueza = 25%) e *Eufriesea* (abundância = 3,2%; riqueza = 12,5%) (Tabela 1). Na restinga, *Euglossa cordata* foi a espécie mais abundante, seguida por *Euglossa stellfeldi*, representando juntas cerca de 70% da amostra total de Euglossini coletado neste tipo de formação vegetal.

Em relação a frequência e dominância das espécies amostradas na FOD, *Eg. stellfeldi*, *Eg. annectans*, *Eg. iopoecila* e *Eg. roderici* foram muito frequentes e dominantes, sendo classificadas como espécies comuns. *Euglossa cordata* foi frequente e dominante, sendo classificada como uma espécie intermediária. *Eulaema nigrita* foi uma espécie frequente e acessória, e também classificada como intermediária. Já *Ef. dentilabris*, *Eg. pleosticta*, *Eg. truncata*, *Eg. viridis*, *Eg. townsendi*, *Ex. smaragdina* e



El. cingulata foram espécies pouco frequentes e acessórias, assim consideradas espécies raras (Tabela 1).

Na restinga foi observado uma estrutura diferente na comunidade de Euglossini em comparação com a área de FOD, assim, *Eg. cordata* e *Eg. stellfeldi* foram muito frequentes e dominantes, classificadas como espécies comuns. Já *Eg. annectans* foi frequente e dominante, *Eg. iopoecila* foi pouco frequente e dominante, *Ef. dentilabris* e *El. cingulata*, foram pouco frequentes e ocasionais, desta forma, essas quatro espécies citadas acima foram classificadas como espécies intermediárias, e finalmente *El. nigrita* e *Eg. pleosticta* foram pouco frequentes e acessórias, consideradas como espécies raras (Tabela 1).

Comparando os dados das duas fitofisionomias do PNS (Floresta Ombrófila Densa e restinga), tanto em relação as abundâncias quanto em relação à riqueza, as análises revelaram diferenças significantes entre os dois locais (abundância: $t = 6,1$; $p = 0,0001$ / riqueza: $U' = 92$; $p = 0,002$).

Nas duas áreas amostradas foram realizadas 40 horas de coleta, o número de indivíduos amostrados por hora foi maior na área de FOD, nesse local o sucesso foi de 6,65 indivíduos a cada hora. Já na área de restinga, foram amostrados apenas 1,6 por hora de amostragem. As similaridades calculadas comparando as duas áreas foram 53,7% e 67% para os índices de Renkonen e Sorensen, respectivamente.



Tabela 1. Número de machos (N), porcentagem (%), dominância (D), frequência de ocorrência (FO) e as categorias (Ct) das diferentes espécies de Euglossini coletadas nos dois tipos de fitofisionomias (FOD = Floresta Ombrófila Densa; RES = Restinga) amostradas na Ilha do Superagui, estado do Paraná, Brasil. d = dominante; o = espécie ocasional; a = acessória. mf = muito frequente; f = frequente; pf = espécie pouco frequente. Categorias: C = comum; I = intermediária e R = rara. H' = diversidade de Shannon; J' = equidade de Pielou e D_{BP} = índice de dominância de Berger Parker.

Espécies	FOD					RES				
	N	%	D	FO	Ct	N	%	D	FO	Ct
<i>Euglossa annectans</i> Dressler 1982	65	24,3	d	mf	C	8	12,5	d	f	I
<i>Euglossa cordata</i> (Linnaeus 1758)	16	6,0	d	f	I	23	35,9	d	mf	C
<i>Euglossa iopoecila</i> Dressler 1982	56	21,0	d	mf	C	4	6,0	d	pf	I
<i>Euglossa pleosticta</i> Dressler 1982	1	0,4	a	pf	R	1	1,6	a	pf	R
<i>Euglossa roderici</i> Nemésio 2009	47	17,7	d	mf	C	0	0	-	-	
<i>Euglossa stellfeldi</i> Moure 1947	67	25,2	d	mf	C	22	34,4	d	mf	C
<i>Euglossa townsendi</i> Cockerell, 1897	1	0,4	a	pf	R	0	0	-	-	
<i>Euglossa truncata</i> Rebêlo e Moure 1996	1	0,4	a	pf	R	0	0	-	-	
<i>Euglossa viridis</i> (Perty 1833)	1	0,4	a	pf	R	0	0	-	-	
<i>Eufriesea dentilabris</i> (Mocsáry 1897)	3	1,1	a	pf	R	2	3,2	o	pf	I
<i>Eulaema cingulata</i> (Fabricius 1804)	1	0,4	a	pf	R	3	4,8	o	pf	I
<i>Eulaema nigrita</i> Lepeletier 1841	5	1,9	a	f	R	1	1,6	a	pf	R
<i>Exaerete smaragdina</i> Hoffmannsegg 1817	2	0,8	a	pf	R	0	-	-	-	
Total de indivíduos	266	100				64	100			
Diversidade (H')	1,76						1,53			
Equidade (J')	0,69						0,73			
Dominância de Berger-Parker (D_{BP})	0,25						0,36			

A curva de rarefação de espécies (Figura 2), representando uma estimativa de suficiência amostral, mostrou que apesar da tendência a estabilização, mais amostragens seriam necessárias para que todas as espécies fossem coletadas nas duas áreas, o mesmo se verifica quando se compara os valores obtidos pelos estimadores não paramétricos (Chao1, Jack1 e *bootstrap*).



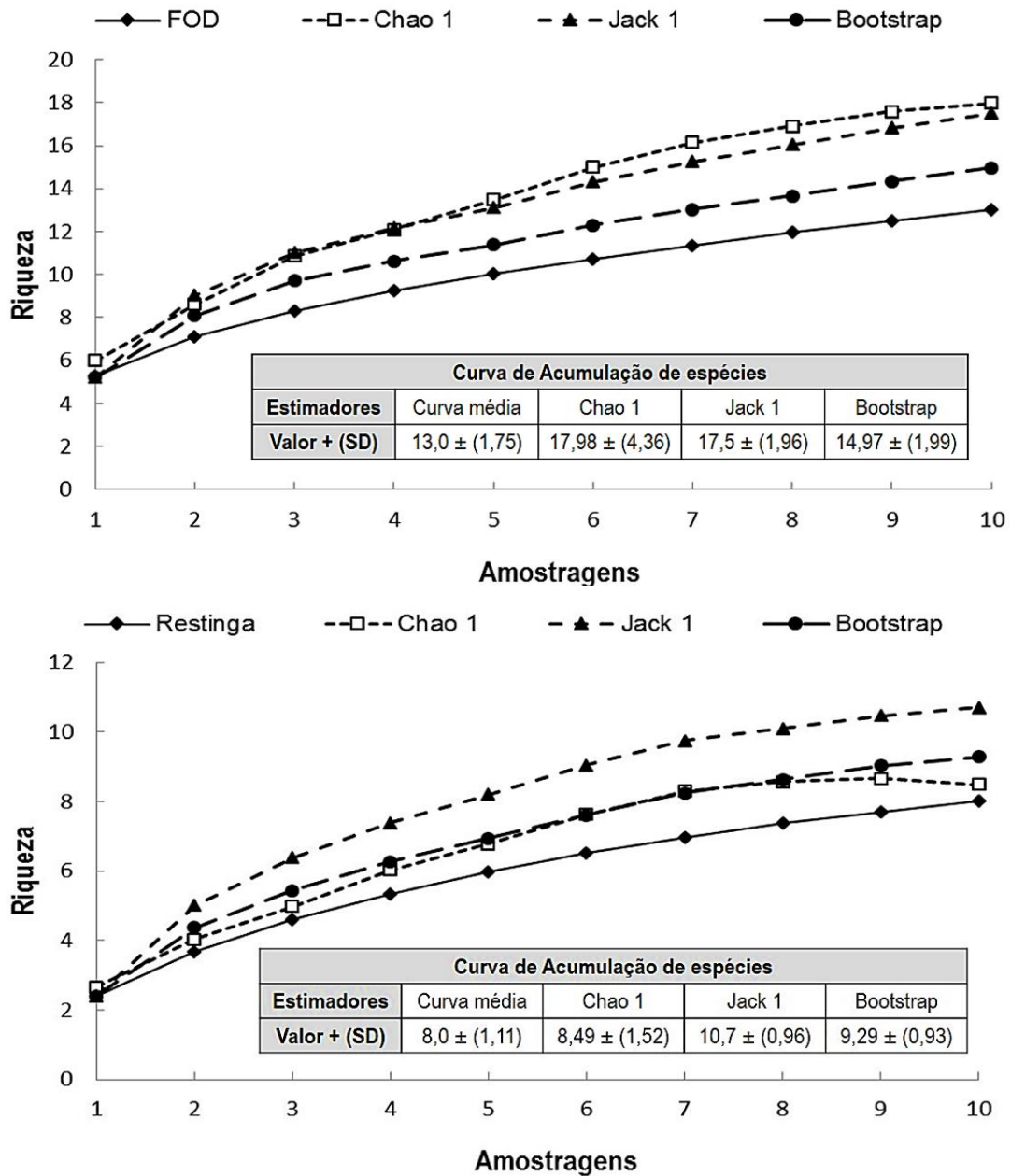


Figura 2. Curvas de rarefação de espécies e estimadores não paramétricos de riqueza (Chao1, Jack1 e *bootstrap*) representando o número cumulativo de espécies de Euglossini amostradas em função da quantidade de coletas realizadas na Floresta Ombrófila Densa (acima) e Restinga (abaixo) na Ilha do Superagui, sul do Brasil. Atenção para as escalas com valores diferentes dos eixos Y representados na figura.

Na Figura 3 são apresentados os padrões de abundâncias de espécies para as duas fitofisionomias (FOD e RES) estudadas. Embora em ambas as áreas é possível notar uma distribuição que revela poucas espécies representadas por um número maior



de indivíduos e a maioria das espécies representada por uma baixa abundância destes, tal padrão foi mais aparente na fitofisionomia de RES, onde *Eg. cordata* e *E. stellfeldi* foram nitidamente mais abundantes que as demais espécies.

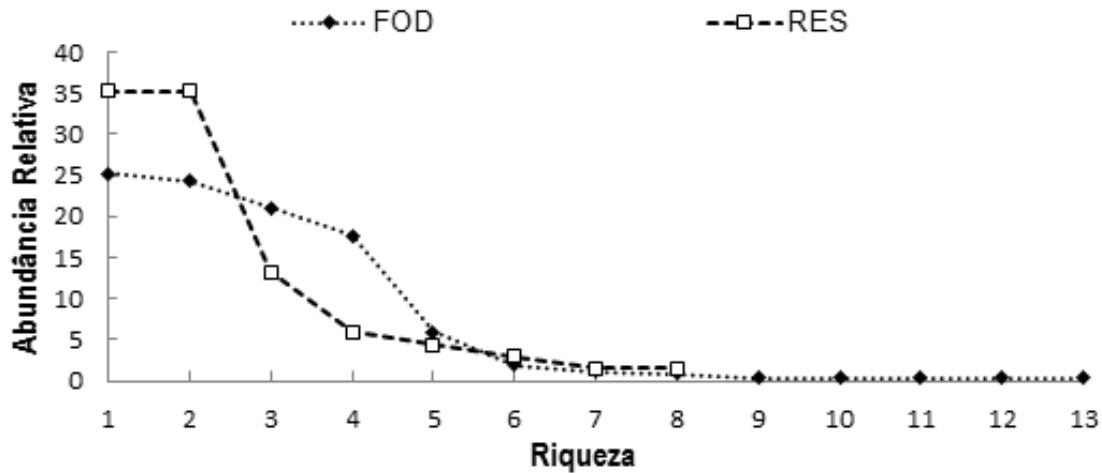


Figura 3. Distribuição da ordem de abundância relativa para as espécies de Euglossini nas duas áreas estudadas (FOD e RES) da Ilha do Superagui. As espécies estão ordenadas em ordem decrescente de abundância relativa de indivíduos. FOD = Floresta Ombrófila Densa; RES = restinga.

A Análise de Correspondência Destendenciada (DCA) revelou padrões interessantes entre as comunidades de Euglossini do trabalho atual e de outros quatro trabalhos que amostraram FOD no estado do Paraná e São Paulo. Na DCA, os dois primeiros eixos explicaram 68,2% (DCA1 = 54,4%; DCA2 = 13,8%) da variação encontrada entre as áreas. Nota-se, que ocorreu uma separação nítida entre as áreas do Paraná (PR-I1; PR-C1 e PR-C2) com as áreas de São Paulo (SP-I1; SP-C1; SP-I2 e SP-C2). As áreas do Paraná ficaram agrupadas acima de 1,33, atingindo o valor máximo de 1,85, e abaixo desse valor aparecem todas as áreas de São Paulo, ocupando a faixa entre 0,85 a -1,28 no eixo 1 da DCA (Figura 4).

Dentre as diferentes áreas estudadas, SP-C1 (DCA1=-0,58; DCA2=-0,77) foi a localidade que agrupou o maior número de espécies; *El. cingulata*, *Eg. Ioprosopa* Dressler e *Ef. surinamensis* (Linnaeus) se mostraram bastante relacionadas com esta área. *Euglossa marianae* Nemésio foi amostrada exclusivamente em SP-C2, dessa forma, ficou bem próxima desse ponto. O mesmo ocorreu com *Eg. townsendi*, que foi amostrada somente em PR-I1, entretanto, essa espécie ocupou uma das extremidades da DCA (DCA1=3,06; DCA2=-2,15), e apresentou associação com o ponto onde foi



amostrada. *Eg. stellfeldi* apresentou alta associação com o ponto PR-I1, o que faz sentido com a alta abundância dessa espécie registrada nessa área; *Eg. roderici*, *Eg. viridis*, *Eg. annectans* ocorreram mais próximas dos pontos do Paraná, nessa análise as espécies citadas acima, aparentemente, mostraram-se mais associadas com as áreas de latitudes mais altas (Figura 4).



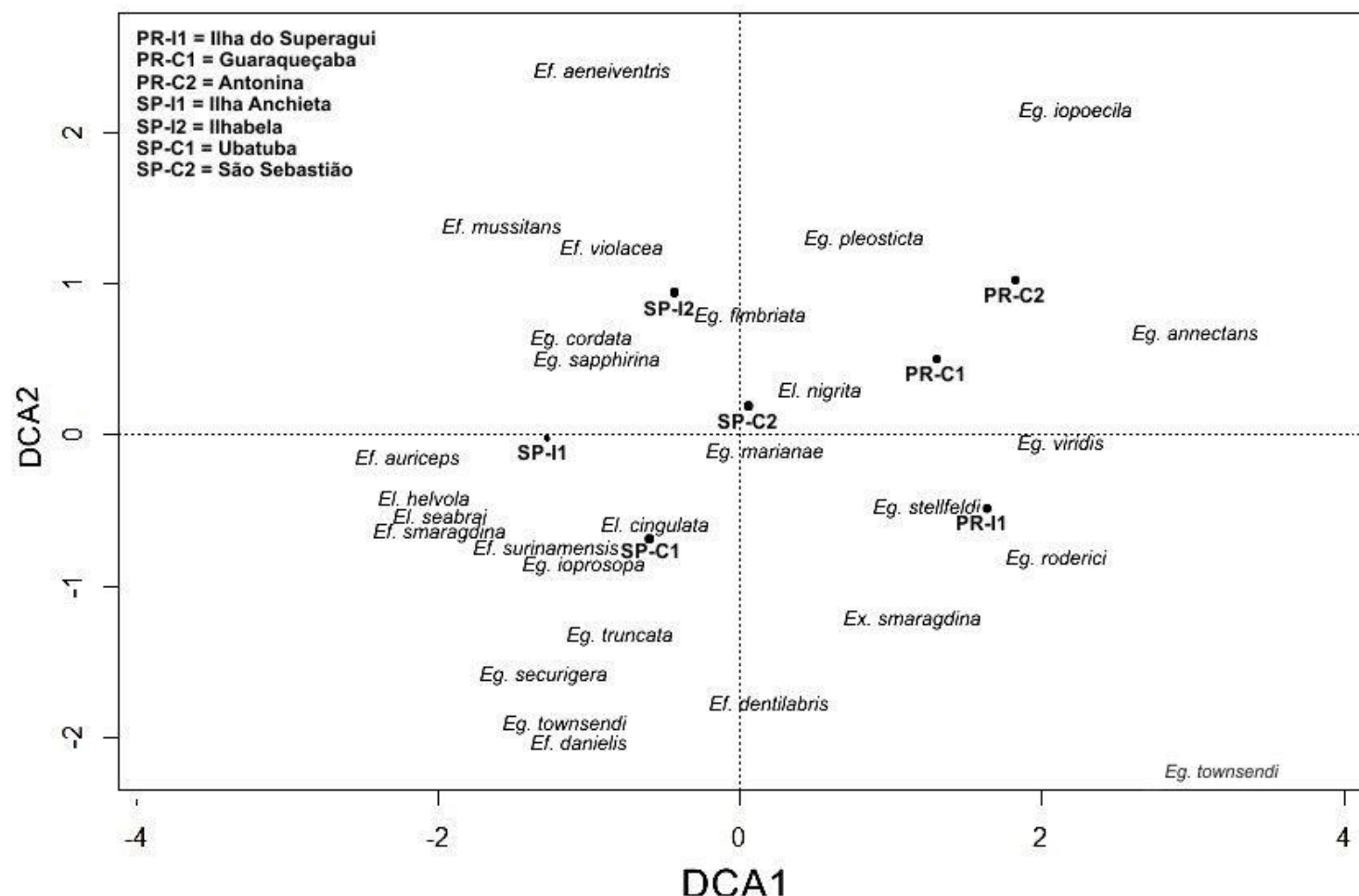


Figura 4. Análise de Correspondência Destendenciada (DCA) da fauna de abelhas Euglossini de áreas de Floresta Ombrófila Densa, domínio Mata Atlântica, na região do litoral do estado do Paraná e São Paulo (Os códigos são referentes a localidades e estão descritos no texto, *Eg* = *Euglossa*; *Ef* = *Eufriesea*; *El* = *Eulaema* e *Ex* = *Exaerete*). Os dados para comparação das faunas de seis áreas indicadas foram obtidos a partir dos seguintes estudos: Giangarelli et al. (2015) [PR-C1], Guaraqueçaba/PR, (região continental); Mattozo et al. (2011) [PR-C2], Antonina/PR, (região continental); Rocha-Filho e Garófalo (2013): [SP-C1], Ubatuba/SP (continental) e [SP-I1], Ilha Anchieta/SP (insular); Cordeiro et al. (2013): [SP-I2], Ilhabela (área insular) e [SP-C2], São Sebastião/SP (continental). PR-I1 = presente estudo.



4. Discussão

De um modo geral, os resultados obtidos neste estudo revelaram diferenças importantes na estrutura das comunidades de abelhas Euglossini amostradas nas fitofisionomias de Floresta Ombrófila Densa (FOD) e restinga (RES), quando riqueza, abundância, composição e dominância de espécies foram os parâmetros considerados. Normalmente, fatores abióticos como precipitação pluviométrica, temperatura e umidade relativa, podem afetar a abundância e ocorrência de espécies localmente e regionalmente (Andrade-Silva et al. 2012, Nemésio e Vasconcelos 2013, Aguiar et al. 2014; Giangarelli et al. 2015). No presente estudo, ao se considerar que os dois tipos de vegetação amostrados estão espacialmente juntos, sob as mesmas condições climáticas e de relevo, o tipo de vegetação se apresenta como o fator mais provável para as diferenças encontradas na estruturação das duas comunidades de Euglossini estudadas. Esta suposição encontra suporte em estudos recentes que têm encontrado resultados similares aos observados no presente trabalho (Aguiar et al. 2014; Giangarelli et al. 2015). Nestes dois estudos os autores destacam a importância do tipo de vegetação como outro fator afetando a composição e nos padrões de abundância e dominância de espécies em comunidades de Euglossini.

Particularmente, os resultados do presente trabalho são bastante similares aos encontrados por Giangarelli et al. (2015). Assim, como estes autores, que encontraram diferenças acentuadas entre as comunidades de Euglossini de dois remanescentes de Mata Atlântica, com formações vegetais de Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Semidecidual, situados muito próximos, em uma mesma localidade, os resultados aqui obtidos reforçam que o tipo de vegetação é um fator importante na estruturação das comunidades deste grupo de abelhas. Esta hipótese também encontra suporte na elevada similaridade revelada pelo coeficiente de similaridade de Sorensen (Q.S. = 0,92) entre as faunas da área de FOD da IS e a amostrada por Giangarelli et al. (2015), valor este que foi maior do que o encontrado (Q.S. = 0,76) ao se comparar as faunas da FOD e restinga da IS.

Outro aspecto que chama a atenção no presente estudo refere-se à menor riqueza de espécies amostradas na restinga quando comparada à área de FOD da IS. Como demonstrado, as faunas de Euglossini amostradas nestas duas áreas diferiram significativamente. Considerando-se que a tribo Euglossini é reconhecida por ter sua maior riqueza em áreas de florestas úmidas (Dressler 1982; Roubik e Hanson 2004), não chega a ser surpreendente a menor riqueza encontrada para a área de restinga. Além



disto, diversos estudos realizados em áreas com vegetação mais aberta, a exemplo de dunas/restingas (Viana et al. 2002), cerrado (Nemésio e Faria Jr. 2004; Alvarenga et al. 2007; Silveira et al. 2015) e caatinga (Lopes et al. 2007; Andrade-Silva et al. 2012), normalmente, mostram uma riqueza menor do que áreas de florestas. Embora, uma fauna mais rica de Euglossini em área de restinga já tenha sido relatada por Silva et al. (2009), este estudo foi realizado em uma área próxima à região amazônica, localizada no estado do Maranhão, nordeste do Brasil, em latitude bem menor (2°43'25''S), onde espera-se encontrar uma maior diversidade de espécies para este grupo de abelhas (Mattozo et al. 2011).

Mesmo tendo sido criada artificialmente por ação antrópica, em um processo de fragmentação de hábitat, há cerca de 60 anos, quando até então a Ilha do Superagui (IS) constituía uma península (Vivekananda 2001), outro resultado que chama a atenção em relação à fauna de Euglossini da IS é o número de 13 espécies amostradas na área de FOD. Ao se comparar a riqueza encontrada na área de FOD da IS com a de outros dois estudos realizados também na região da APA de Guaraqueçaba, em reservas bem preservadas de FOD localizadas no continente, constata-se que esta riqueza foi muito similar à encontrada por Giangarelli et al. (2015), que relataram 14 espécies para uma reserva de cerca de 2000 ha, e bastante superior à relatada por Mattozo et al. (2011). Embora comparações simples devam ser evitadas, uma vez que diferentes autores usualmente fazem uso de metodologias e esforços de amostragem distintos (ver Morato 1998) dificultando tais comparações, ainda assim o número de espécies da IS pode ser considerado expressivo. Embora tenham amostrado apenas seis espécies de Euglossini em uma área de cerca de 8500 ha de FOD, Mattozo et al. (2011) estimaram para a região estudada a ocorrência de 12 espécies destas abelhas. Os resultados do presente estudo confirmam a ocorrência das mesmas 13 espécies encontradas por Giangarelli et al. (2015), com exceção de *Euglossa fimbriata* Moure 1968, que foi coletada por estes últimos autores, mas não foi amostrada na IS. Assim, considerando outras três espécies - *Eufriesea mussitans* (Fabricius 1787), *Eufriesea smaragdina* (Perty 1833) e *Euglossa mandibularis* Friese 1899 - com registros para a região (ver Mattozo et al. 2011), mas que não foram amostradas no presente trabalho e nem por Giangarelli et al. (2015) e Mattozo et al. (2011), espera-se para a região da APA de Guaraqueçaba, a ocorrência de pelos menos 17 espécies de Euglossini. Este número está bem próximo aos valores médios previstos pelos estimadores não-paramétricos Jack1 (17,5) e Chao 1 (17,98),



obtidos com base no número de espécies amostrados no presente trabalho, após rarefação dos dados.

Estudos realizados em outras áreas pertencentes ao *Corredor de Biodiversidade da Serra do Mar*, localizadas próximas à região estudada, mas em latitudes abaixo de 25°, apontam para a ocorrência de, pelo menos, 26 espécies de Euglossini no conjunto de tais áreas (Cordeiro et al. 2013; Rocha-Filho e Garófalo 2013). Assim, embora ao se comparar a fauna de Euglossini da região estudada com a de tais áreas, a riqueza de espécies seja menor para a APA de Guaraqueçaba, esta se confirma superior à esperada previamente para esta região (Mattozo et al. 2011). As diferenças no conjunto de espécies, e a menor diversidade encontrada para a APA de Guaraqueçaba se reflete na análise de DCA, que mostra uma maior associação entre as faunas do estado de São Paulo (SP) do que com as faunas amostradas acima do paralelo 25°S (PR-II, PR-C1 e PR-C2). A maior associação entre SP-II e SP-C1 (áreas amostradas por Rocha-Filho e Garófalo 2013) relaciona-se provavelmente a ocorrência de *Eulaema helvola* Moure apenas nas duas áreas amostradas por estes autores. Ainda, o compartilhamento da espécie *Eg. sapphirina* Moure, ocorrendo apenas em SP-II, SP-C1 (Rocha-Filho e Garófalo 2013), SP-I2 e SP-C2 (Cordeiro et al. 2013) explicam, em parte, a posição desta espécie na DCA. De forma análoga, a ausência desta espécie, bem como de *Eg. ioprosopa* Dressler, *Eulaema seabrai* Moure e *Eufriesea mussitans* (Fabricius) nas latitudes acima de 25°, ou seja, nas áreas PR-II, PR-C1 e PR-C2 (Mattozo et al. 2011, Giangarelli et al. 2015 e presente estudo) aproximam as quatro áreas amostradas no estado de São Paulo e distanciam estas da fauna das áreas da costa litorânea do Paraná.

Nemésio (2009) ressalta que poucas áreas de Mata Atlântica têm sido sistematicamente estudadas para o conhecimento mais completo da diversidade e riqueza de Euglossini. Os resultados aqui obtidos reforçam a importância de se amostrar repetidamente a fauna de uma região, considerando-se que estudos isolados podem, por exemplo, levar a uma subestimativa da riqueza local (ex. Mattozo et al. 2011). Além disto, tais estudos podem revelar para áreas apresentando fitofisionomias similares de uma mesma região, estruturas de comunidades de Euglossini consideravelmente distintas. Por exemplo, comparando-se novamente os resultados de Giangarelli et al. (2015) com o da IS, nota-se diferenças nítidas na estrutura das duas comunidades de Euglossini estudadas. Enquanto na área de FOD do continente *Euglossa iopoecila* foi a espécie mais frequente na área estudada por Giangarelli et al. (2015), representando 43% da amostra total, na IS esta espécie ocupou o terceiro lugar em ordem de



abundância, representando 21% de todos os machos amostrados nas iscas-odores na área de FOD da IS.

De modo diverso, as espécies *Euglossa stellfeldi* e *Euglossa roderici*, que representaram, cada uma, cerca de 5% do total de indivíduos amostrados na área amostrada por Giangarelli et al. (2015), no presente estudo constituíram, respectivamente, 25,2% e 17,7% do total de Euglossini amostrado na área de FOD da IS. A princípio, parece difícil explicar as diferenças nas abundâncias encontradas entre as duas áreas de estudo. Por outro lado, Nemésio e Vasconcelos (2013), ao investigar a diversidade de 15 comunidades de Euglossini amostradas em uma ampla faixa de Mata Atlântica no Brasil detectaram que, embora variável, a similaridade entre as comunidades das diferentes áreas tendeu a uma diminuição em função do aumento das distâncias geográficas entre as áreas estudadas e também em função do clima. De acordo com autores, enquanto a combinação de variação climática e espacial explicou 55,8% da variação encontrada nas comunidades, o restante da variação (44,2%) não teve causas definidas. Embora a comparação entre as comunidades de Euglossini da IS e de uma área próxima (distância de 24 km) no continente (Giangarelli et al. 2015), deva ser feita com parcimônia, especialmente pelo menor esforço de amostragem realizado em IS (ver Tabela S1 – Material Suplementar), nota-se que o menor número de horas de amostragem na IS não determinou uma menor abundância absoluta das espécies *Eg. roderici* e *Eg. stellfeldi*; neste caso, representadas, respectivamente, por 47 e 67 machos na IS, e por apenas 17 (*Eg. roderici*) e 18 (*Eg. stellfeldi*) na área do continente amostrada por Giangarelli et al. (2015); apesar do esforço de amostragem ter sido muito maior nesta segunda área (Giangarelli et al. 2015; Tabela S1 – Material Suplementar).

Assim, outras possíveis causas devem estar relacionadas às diferenças encontradas nas estruturas das comunidades de Euglossini da IS e da área no continente (Giangarelli et al. (2015). Considerando o fato da vegetação ser a mesma (FOD) em ambas as áreas, e devido à proximidade geográfica das mesmas ser esperado uma similaridade nas condições climáticas, embora não seja possível afirmar, as diferenças climáticas locais, a que áreas mais próximas à costa usualmente estão sujeitas, a exemplo de brisas e ventos oriundos do oceano, poderiam de algum modo estar respondendo por parte das variações encontradas na estrutura das comunidades de Euglossini de IS e da reserva no continente. Contudo, para se comprovar esta hipótese, estudos adicionais seriam necessários.



Outra explicação plausível ainda poderia ser a de que as diferenças encontradas entre as comunidades da IS e da reserva do continente (Giangarelli et al. 2015) fossem decorrentes da heterogeneidade de habitats inerente às áreas de florestas tropicais, como argumentado por Ambruster (1993). Em razão disto, este autor ressalta a importância de amostrar vários sítios de estudo por área, devido à heterogeneidade de habitats comumente presente em uma floresta tropical. Embora no presente trabalho, dois locais tenham sido amostrados simultaneamente na área de FOD da IS e nenhuma diferença tenha sido observada nas riquezas e abundância destes dois locais, tal hipótese não pode ser descartada, uma vez que a distância entre estes dois pontos era pequena (300 m) e, portanto, pode não representar a heterogeneidade da área estudada. Por outro lado, Tonhasca et al. (2002a) ao comparar as comunidades de Euglossini de diferentes locais, amostradas simultaneamente dentro de uma extensa área de 230 km² de Mata Atlântica, também não encontraram diferenças entre as comunidades destes pontos, tendo observado apenas uma variação no número de indivíduos coletados entre os diferentes locais. Com base nisto, estes autores concluíram que, pelo menos dentro de uma escala espacial pequena, a heterogeneidade sugerida por Ambruster (1993) para populações destas abelhas não se confirmou.

No caso de *Eg. iopoecila*, é quase certo que variação na abundância relativa desta espécie detectada entre IS e a área do continente, amostrada por Giangarelli et al. (2015), não seja decorrente de uma limitação na capacidade desta abelha transpor a curta distância (50 m no ponto mais próximo) entre o continente e IS. Além disto, existem registros com base em observações diretas (Dressler 1982; Murren 2002; Wikelski et al. 2010) ou por meio de inferências indiretas realizadas em estudos genéticos (Rocha-Filho et al. 2013; Boff et al. 2014) que várias espécies de Euglossini são capazes de voar extensas distâncias através de corpos d'água. Pelo menos para algumas espécies de Euglossini encontra-se bem estabelecido a elevada capacidade de voo e dispersão destas abelhas (Janzen 1971; Raw 1989; Pokorný et al. 2015). Embora, aparentemente a capacidade de dispersão certamente não seja a mesma entre as diferentes espécies de Euglossini, a curta distância entre IS e continente não parece constituir uma barreira relevante para a dispersão de *Eg. iopoecila*.

De fato, Penha et al. (2015) encontraram, com base em marcadores mitocondriais e microssatélites uma baixa diferenciação genética entre populações de *E. iopoecila* em uma área continental e outra insular (distante cerca de 2000 metros do continente), sendo tal resultado um forte indicativo de fluxo gênico pretérito e presente



entre as populações destas áreas. De modo diverso, Rocha-Filho e Garófalo (2013) ao inventariar as faunas de Euglossini de duas áreas de FOD, uma delas localizada em uma ilha natural e a outra em uma área continental, distante 30 km do ponto de amostragem, encontraram diferenças importantes nas abundâncias de *Eg. iopoecila* das duas áreas. Embora a ilha amostrada por estes autores estivesse apenas a 600 m do ponto mais próximo do continente, nenhum macho de *Eg. iopoecila* foi coletado na ilha, enquanto 219 machos desta espécie foram atraídos às iscas-odores da área inventariada no continente (Rocha-Filho e Garófalo 2013). Ainda, embora esta espécie tenha sido amostrada por Cordeiro et al. (2013) em áreas de FOD do continente e uma ilha de origem continental, a abundância relativa de *Eg. iopoecila* foi notavelmente menor na comunidade da ilha. Deste modo, sugere-se que, no que se refere a abordagens comparando comunidades de Euglossini dentro de uma escala geográfica mais local, que outros estudos são ainda necessários para que possa entender os padrões nas abundâncias de populações de *Eg. iopoecila* de ambientes insulares e áreas continentais.

Por fim, em relação às diferenças encontradas entre as estruturas das comunidades de Euglossini das áreas de FOD e restinga e entre a área de FOD da IS e a amostrada por Giangarelli et al. (2015), outros fatores devem também ser considerados. Por exemplo, alguns autores têm sugerido que diferenças na diversidade beta entre comunidades de Euglossini poderia ser explicada por fatores não mensurados nos diferentes estudos, tais como abundância e diversidade nos locais de ninhos, bem como em materiais disponíveis usados na construção dos ninhos, disponibilidade de recursos alimentares, os quais poderiam constituir fatores relevantes na estruturação das comunidades destas abelhas (Abrahamczyk et al. 2011; Nemésio e Vanconcelos 2013). Contudo, segundo estes últimos autores, a falta de informação sobre aspectos biológicos básicos da tribo, como por exemplo, os poucos dados disponíveis sobre os hábitos de nidificação da maioria das espécies do grupo ou ainda sobre as associações específicas entre tais abelhas e as diferentes espécies vegetais, limita bastante o entendimento da potencial influência de tais fatores na estruturação das comunidades destas abelhas.

Tomando-se em conjunto os resultados obtidos no presente estudo, é possível afirmar que em uma pequena escala geográfica, diferenças importantes podem ser detectadas nas populações das comunidades de Euglossini de áreas próximas de Mata Atlântica e tal fato deve ser levado em consideração com vistas ao manejo e conservação de tais áreas e as comunidades destas abelhas.



AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, Fundação Araucária e CAPES pelo apoio financeiro; ao Instituto Agronômico do Paraná por fornecer os dados abióticos; ao IBAMA pela autorização para as coletas de abelhas no Parque Nacional do Superagui e pelo apoio logístico; à bióloga Guadalupe Vivekananda, do posto local do IBAMA na Ilha do Superagui, pelo apoio e atenção dispensados; à Universidade Estadual de Londrina pelo transporte. À Eliza Tanaka, Diogo Mazzaro, Natália Uemura, Wilson Frantine-Silva, Henrique Zotarelli, Dhiego Gomes Ferreira e Rafael E.S. Penha pelo auxílio nas coletas. D.C.G. agradece à CAPES pela bolsa de doutorado recebida e S.H.S. ao CNPq pela bolsa de pesquisador.



5. REFERÊNCIAS

- 1
2
3 Abrahamczyk, S., Gottleuber, C., Matauscheck, C., Kessler, M. (2011) Diversity and
4 community composition of euglossine bee assemblages (Hymenoptera: Apidae)
5 in western Amazonia. *Biodivers. Conserv.* **20**, 2981-3001
6
7 Ackerman, P.L. (1989) Within-task intercorrelations of skilled performance:
8 Implications for predicting individual differences? *J. Appl. Psychol.* **74**, 360-364
9
10 Aguiar, W.A., Gaglianone, M.C. (2012) Euglossine bee communities in small forest
11 fragments of the Atlantic Forest, Rio de Janeiro state, southeastern Brazil
12 (Hymenoptera, Apidae). *Rev. Bras. Entomol.* **56**, 210-219
13
14 Aguiar, W.M., Melo, G.A.R., Gaglianone, M.C. (2014) Does forest physiognomy affect
15 the structure of orchid bee (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) communities? A
16 study in the Atlantic Forest of Rio de Janeiro state, Brazil. *Sociobiol.* **61**, 68-77
17
18 Alvarenga, P.E.F., Freitas, R.F., Augusto, S.C. (2007) Diversidade de Euglossini
19 (Hymenoptera: Apidae) em áreas de cerrado do Triângulo Mineiro, MG. *Biosci.*
20 *J.* **23**, 30-37
21
22 Ambruster, W.S. (1993) Within-Habitat heterogeneity en baiting sample of male
23 euglossine bees: possible cases and implication. *Biotropica*, **25**, 122-128
24
25 Andrade-Silva, A.C.R., Nemésio, A., Oliveira, F.F., Nascimento, F.S. (2012) Spatial-
26 temporal variation in orchid bee communities (Hymenoptera: Apidae) in
27 remnants of arboreal Caatinga in the Chapada Diamantina region, State of Bahia,
28 Brazil. *Neotrop. Entomol.* **41**, 296–305
29
30 Anjos-Silva, E.J. 2008 Discovery of *Euglossa* (*Euglossa*) *cognata* Moure (Apidae:
31 Euglossini) in the Platina Basin, Mato Grosso state, Brazil. *Biot. Neotrop.* **8**, 79-
32 83
33
34 Anjos-Silva, E.J., Camillo, E., Garófalo, C.A. (2006) Occurrence of *Aglae caerulea*
35 Lepeletier & Serville (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) in the Parque Nacional
36 da Chapada dos Guimarães, Mato Grosso State, Brazil. *Neotrop. Entomol.* **35**,
37 868-870
38
39 Boff, S., Soro, A., Paxton, R.J., Alves-dos-Santos, I. (2014). Island isolation reduces
40 genetic diversity and connectivity but does not significantly elevate diploid male
41 production in a neotropical orchid bee. *Conserv. Genet.* **15**, 1123-1135
42
43 Bonilla-Gomez, M.A. (1999) Caracterização da Estrutura Espaço-temporal da
44 Comunidade de Abelhas Euglossinas (Hymenoptera, Apidae) na Hiléia Bahiana.
45 Ph.D. Thesis. Campinas.
46
47 Cameron, S.A. (2004) Phylogeny and biology of Neotropical orchid bees (Euglossini).
48 *Ann. Rev. Entomol.* **49**, 377-404
49



- 1 Colwell, R.K. (2013) EstimateS: Statistical Estimation of Species Richness and Shared
2 Species from Samples, Version 9.10. User's guide and application published at:
3 <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>. Acessado em: (09/11/ 2014)
4
- 5 Cordeiro, D.C., Boff, S., Caetano, T.A., Fernandes, P.C., Alves-dos-Santos, I. (2013)
6 Euglossine bees (Apidae) in Atlantic forest areas of São Paulo State,
7 southeastern Brazil. *Apidologie*, **44**, 254-267
8
- 9 Cortopassi-Laurino, M., Imperatriz-Fonseca, V.L., Roubik, D.W., Dollin, A., Heard, T.,
10 Aguilar, I., Venturieri, G.C., Eardley, C., Nogueira-Neto, P. (2006) Global
11 meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie*, **37**, 275-292
12
- 13 Dodson, C.H., Dressler, H.G., Hills, R.M., Adams, R.M., Williams, N.H. (1969)
14 Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science* 164:1243–1249
15 Dressler RL (1982) Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annu. Rev. Ecol.*
16 *Evol. Syst.* **13**, 373–394
17
- 18 Dressler, R.L. (1968) Observations on orchids and euglossine bees in Panama and Costa
19 Rica. *Rev. Biol. Trop.* **15**, 143–183
- 20 Dressler, R.L. (1982) Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annu. Rev. Ecol. Syst.*
21 **13**, 373–394
- 22 Eltz, T., Roubik, D.W., Whitten, W.M. (2003) Fragrances, male display and mating
23 behaviour of *Euglossa hemichlora*: a flight cage experiment. *Phys. Entomol.* **28**,
24 251–260
25
- 26 Faria, L.R.R., Melo, G.A.R. (2011) A new species of *Eufriesea* Cockerell
27 (Hymenoptera, Apidae, Euglossina) from northeastern Brazil. *Rev. Bras.*
28 *Entomol.* **55**, 35-39
29
- 30 Galindo-Leal, C., Câmara, I.G. (2005). Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e
31 perspectivas. Fundação SOS Mata Atlântica. Conservação Internacional, São
32 Paulo.
33
- 34 Giangarelli, D.C. (2011) Comunidade de abelhas Euglossini de dois remanescentes de
35 Mata Atlântica do estado do Paraná. Dissertação de mestrado, Universidade
36 Estadual de Londrina, Londrina.
37
- 38 Giangarelli, D.C., Aguiar, W.M., Sofia, S.H. (2015) Orchid bee (Hymenoptera: Apidae:
39 Euglossini) assemblages from three different threatened phytophysiognomies of
40 the subtropical Brazilian Atlantic Forest. *Apidologie*, **46**, 77-83
41
- 42 Gonçalves, R.B., Scherer, V.L., Oliveira, P.S. (2014) The orchid bees (Hymenoptera,
43 Apidae, Euglossina) in a forest fragment from western Paraná state, Brazil. *Pap.*
44 *Avulsos Zool.* **54**, 63-68
45
- 46 Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. (2001) PAST Paleontological Statistics
47 software package for education and data analysis. *Paleont. Electron.* **4**, 1-9
48



- 1 IAPAR (Fundação Instituto Agrônômico do Paraná). (1978) Cartas climáticas básicas
2 do Estado do Paraná. Londrina.
3
- 4 IPARDES (Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social). (2001)
5 Zoneamento da Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba/ Instituto
6 Paranaense de Desenvolvimento Econômico Social. Curitiba.
7
- 8 Janzen, D.H. (1971) Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants.
9 *Science*, **171**, 203-205
10
- 11 Jaster, B.C.A. (2002) A estrutura como indicadora do nível de desenvolvimento
12 sucessional de comunidades arbóreas da restinga. Tese (Doutorado em Ciências
13 Florestais) – Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná,
14 Curitiba.
15
- 16 Lopes, A.V.L., Machado, I.C., Aguiara, A.V., Rebêlo, J.M.M. (2007) A scientific note
17 on the occurrence of Euglossini bees in the Caatinga, a Brazilian tropical dry
18 forest. *Apidologie*, **38**, 472-473
19
- 20 Ludwig, J.A., Reynolds, J.F. (1988) *Statistical ecology: a primer of methods and*
21 *computing*. Wiley Press, New York.
22
- 23 Mattozo, V.C., Faria, L.R.R., Melo, G.A.R. (2011) Orchid bees (Hymenoptera: Apidae)
24 in the coastal forests of southern Brazil: diversity, efficiency of sampling
25 methods and comparison with other Atlantic forest surveys. *Pap. Avulsos Zool.*
26 **51**, 505–515
27
- 28 MMA (Ministério do Meio Ambiente). (2000) Avaliação e ações prioritárias para a
29 conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. CI, Fund.
30 SOS Mata Atlântica, Fund. Biodiversitas, IPE, SEMA-SP, SEMAD/IEF-MG,
31 MMA/SBF. Brasília.
32
- 33 Moure, J.S., Melo, G.A.R., Faria Jr. L.R.R.(2012) Euglossini Latreille, 1802. In Moure,
34 J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees Hymenoptera,*
35 *Apoidea*) in the Neotropical Region - online version. Available at
36 <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. (Accessado 28/04/2015)
37
- 38 Moure, J.S., Schindwein, C. (2002) Uma nova espécie de *Euglossa* (*Euglossella*)
39 Moure do Nordeste do Brasil (Hymenoptera, Apidae). *Rev. Bras. Zool.* **19**, 585-
40 588
41
- 42 Murren, C.J. (2002) Effects of habitat fragmentation on pollination: pollinators, pollinia
43 viability and reproductive success. *J. Ecol.* **90**, 100-107
44
- 45 Nemésio, A. (2008) *Eufriesea atlantica* (Hymenoptera: Apidae), a new orchid bee from
46 the Brazilian Atlantic Forest. *Lundiana* **8**, 147-152
47
- 48 Nemésio, A. (2009) Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of the Brazilian Atlantic
49 Forest. *Zootaxa* **2041**, 1–242
50



- 1 Nemésio, A. (2010) The orchid-bee fauna (Hymenoptera: Apidae) of a forest remnant in
2 northeastern Brazil, with new geographic records and an identification key to the
3 known species of the Atlantic Forest of northeastern Brazil. *Zootaxa* **2656**, 55–
4 66
5
- 6 Nemésio, A. (2011) The orchid-bee fauna (Hymenoptera: Apidae) of a forest remnant in
7 southern Bahia, Brazil, with new geographic records and an identification key to
8 the known species of the area. *Zootaxa* **2821**, 47–54
9
- 10 Nemésio, A., Faria Jr. L.R.R. (2004) First assessment of the Orchid-bee fauna
11 (Hymenoptera: Apidae) at Parque Estadual do Rio Preto, a cerrado area in
12 southeastern Brazil. *Lundiana* **5**, 113–117
13
- 14 Nemésio, A., Vasconcelos, H.L. (2013) Beta diversity of Orchid bees in a tropical
15 biodiversity hotspot. *Biodivers. Conserv.* **22**, 1647–1661
16
- 17 Neves, E.L., Viana, B.F. (2002) As abelhas eussociais (Hymenoptera, Apidae)
18 visitantes florais em um ecossistema de dunas continentais no médio Rio São
19 Francisco, Bahia, Brasil. *Rev. Bras. Entom.* **46**, 571-578
20
- 21 Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., O’Hara, R.B., Simpson, G.L.,
22 Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H. (2011) *Vegan: community ecology*
23 *package*. R package version 1.17-6. <http://CRAN.Rproject.org/package=vegan>.
24 (Accessado: 15 maio 2015)
25
- 26 Palma, S. (1975) Contribución al estudios de los sifonoforos encontrados frente a la
27 costa de Valparaiso. Aspectos ecológicos, in: II Simpósio Lationoamericano
28 sobre Oceanografía Biológica, Univ. D’ Oriente, Venezuela
29
- 30 Penha, R.E.S., Gaglianone, M.C., Almeida, F.S., Boff, S.V., Sofia, S.H. (2014)
31 Mitochondrial DNA of *Euglossa iopoecila* (Apidae, Euglossini) reveals two
32 distinct lineages for this orchid bee species endemic to the Atlantic Forest.
33 *Apidologie*, **46**, 346-358
34
- 35 Peruquetti, R.C., Campos, L.A.O., Coelho, C.D.P., Abrantes, C.V.M., Lisboa, L.C.O.
36 (1999) As abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância,
37 riqueza e aspectos biológicos. *Rev. Bras. Zool.* **16**, 101–118
38
- 39 Pokorny, T., Loose, D., Dyker, G., Quezada-Euán, J.J.G., Eltz, T. (2015) Dispersal
40 ability of male orchid bees and direct evidence for long-range flights.
41 *Apidologie*, **46**, 224–237
42
- 43 Powell, A.H., Powell, V.N. (1987) Population dynamics of male euglossine bees in
44 Amazonian forest fragments. *Biotropica* **19**, 176–179
45
- 46 R Development Core Team (2015) *R: A language and environment for statistical*
47 *computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. ISBN 3-900051-
48 07-0, URL <http://www.R-project.org/> (Accessado 15/03/2015)
49



- 1 Ramalho, A.V., Gaglianone, M.C., Oliveira, M.L. (2009) Comunidades de abelhas
2 Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em fragmentos de Mata Atlântica no Sudeste
3 do Brasil. *Rev. Bras. Entomol.* **53**, 95–101
4
- 5 Ramírez, S., Dressler, R.L., Ospina, M. (2002) Abejas euglossinas (Hymenoptera:
6 Apidae) de la región Neotropical: Lista de especies con notas sobre su biología.
7 *Biota Colomb.* **3**, 7-118
8
- 9 Raw, A. (1989) The dispersal of euglossine bees between isolated patches of eastern
10 brazilian wet forest (Hymenoptera, Apidae). *Rev. Bras. Entomol.* **33**, 103-107
11
- 12 Rebêlo, J.M.M., Garófalo, C.A. (1991) Diversidade e sazonalidade de machos de
13 Euglossini (Hymenoptera, Apidae) e preferências por iscas-odores em um
14 fragmento de floresta no sudeste do Brasil. *Rev. Bras. Biol.* **51**, 787–799
15
- 16 Rebêlo, J.M.M., Garófalo, C.A. (1997) Comunidades de machos de Euglossini
17 (Hymenoptera: Apidae) em matas semidecíduas do nordeste do Estado de São
18 Paulo. *Ann. Soc. Entomol. Bras.* **26**, 243–255
19
- 20 Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F.J., Hirota, M.M. (2009) The
21 Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest
22 distributed? Implications for conservation. *Biol. Conserv.* **142**, 1141–1153
23
- 24 Rocha-Filho, L.C., Krug, C., Silva, C.I., Garófalo, C.A. (2012) Floral Resources Used
25 by Euglossini Bees (Hymenoptera: Apidae) in Coastal Ecosystems of the
26 Atlantic Forest. *Psyche*, 1-13
27
- 28 Rocha-Filho, L.C., Garófalo, C.A. (2013) Community ecology of euglossine bees in the
29 coastal Atlantic Forest of São Paulo State, Brazil. *J. Insect Sci.* **13**, 1-19
30
- 31 Roubik, D.W., Hanson, P.H. (2004) *Orchid Bees of Tropical America*, 1st edn. INBio,
32 Santo Domingo de Heredia, Costa Rica.
33
- 34 Schmidlin, L.A.J., Accioly, A., Accioly, P., Kirchner, F.F. (2005) Mapeamento e
35 caracterização da vegetação da ilha de Superagüi utilizando técnicas de
36 geoprocessamento. *Floresta*, **35**, 303-315
37
- 38 Silva, O., Rego, M.M.C., Albuquerque, P.M.C., Ramos, M.C. (2009) Abelhas
39 Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em Área de Restinga do Nordeste do
40 Maranhão. *Neotrop. Entomol.* **38**, 186-196
41
- 42 Silva, D.P., Aguiar, J.C., Melo, G.A.R., Anjos-Silva, E.J., Marco Jr., P. (2013)
43 Amazonian species within the Cerrado savanna: new records and potential
44 distribution for *Aglae caerulea* (Apidae: Euglossini). *Apidologie*, **44**, 673-683
45
- 46 Silva, S.J.R., Gama Neto, J.L., Parente, F.S. (2013) Abundância e diversidade de
47 abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) da Serra do Tepequém, município de
48 Amajari, Roraima, Brasil. *Rev. Agro@mbiente* **7**, 225-230
49



- 1 Silveira, G.C., Nascimento, A.M., Sofia, S.H., Augusto, S.C. (2011) Diversity of the
2 euglossine bee community (Hymenoptera, Apidae) of an Atlantic Forest remnant
3 in southeastern Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* **55**, 109-115
4
- 5 Silveira, G.C., Freitas, R.F., Tosta, T.H.A., Rabelo, L.S., Gaglianone, M.C., Augusto,
6 S.C. (2015) The orchid bee fauna in the Brazilian savanna: do forest formations
7 contribute to higher species diversity? *Apidologie* **46**, 197–208
8
- 9 Smith E, Van Belle, G. (1984) “Nonparametric Estimation of Species Richness.”
10 *Biometrics*, **40**, 119–129
11
- 12 Sofia, S.H., Suzuki, K.M. (2004) Comunidades de machos de abelhas Euglossina
13 (Hymenoptera: Apidae) em fragmentos florestais no Sul do Brasil. *Neotrop.*
14 *Entomol.* **33**, 693–702
15
- 16 Sofia, S.H., Santos, A.M., Silva, C.R.M. (2004) Euglossine bees (Hymenoptera,
17 Apidae) in a remnant of Atlantic Forest in Paraná State, Brazil. *Iheringia* **94**,
18 217–222
19
- 20 SOS MATA ATLÂNTICA/INPE (2015) Atlas Dos Remanescentes Florestais da Mata
21 Atlântica período 2013-2014, São Paulo
22
- 23 Souza A K P, Hernández M I M, Martins C F (2005) Riqueza, abundância e diversidade
24 de Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em três áreas da Reserva Biológica
25 Guaribas, Paraíba, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* **22**, 320-325
26
- 27 Tonhasca Jr., A., Blackmer, J.L., Albuquerque, G.S. (2002) Abundance and diversity of
28 euglossine bees in the fragmented landscape of the Brazilian Atlantic Forest.
29 *Biotropica* **34**, 416–422
30
- 31 Tonhasca Jr., A., Albuquerque, G.S., Blackmer, J.L. (2002a) Dispersal of euglossine
32 bees between fragments of the Brazilian Atlantic Forest. *J. Trop. Ecol.* **19**, 99–
33 102
34
- 35 Viana, B.F., Kleinert, A.M.P., Neves, E.L. (2002) Comunidade de Euglossini
36 (Hymenoptera, Apidae) das dunas litorâneas do Abaeté, Salvador, Bahia, Brasil.
37 *Rev. Bras. Entomol.* **46**, 539–545
38
- 39 Vivekananda, G. (2001) Parque Nacional do Superagui: a presença humana e os
40 objetivos de conservação. Dissertação de Mestrado Universidade Federal do
41 Paraná, Curitiba.
42
- 43 Wikelski, M., Moxley, J., Eaton-Mordas, A., López-Uribe, M.M., Holland, R.,
44 Moskowitz, D., Roubik, D.W., Kays, R. (2010) Large-range movements of
45 Neotropical orchid bees observed via radio telemetry. *PLoS ONE*, **5**, 1-6
46
- 47 Williams, N.H., Dodson, C.H. (1972) Selective attraction of male euglossine bees to
48 orchid floral fragrance and its importance in long distance pollen flow.
49 *Evolution* **26**, 84-95
50



-
- 1 Williams, N.H., Whitten, W.M. (1983) Orchid floral fragrances and male euglossine
2 bees: methods and advances in the last sesquidecade. *Biol. Bulletin*, **164**, 355-
3 395
4
- 5 Wittmann, D., Hoffmann, M., Scholz, E. (1988) Southern distributional limits of
6 euglossine bees in Brazil linked to habitats of the Atlantic and subtropical rain
7 forest (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Entomol. Gen.* **14**, 53–60
8
- 9 Zar, J.H. (1996) *Biostatistical analysis*. 3th ed. McElroy, W.D., Swanson, C.P (eds.).
10 New Jersey, USA, Prentice-Hall INC, Englewood Cliffs.



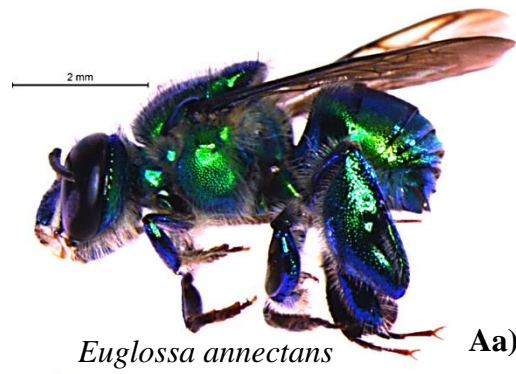
Material Suplementar

Tabela S1. Comparação com os dados do presente trabalho com os dados de outros trabalhos realizados no corredor da Serra do Mar nos estados do Paraná e São Paulo. PR_(ILHA)-1= dados do presente trabalho; PR_(CON)-1 = Giangarelli et al. (2015); PR_(CON)-2 = Mattozo et al. (2011); SP_(CON)-1 e SP_(ILHA)-1 = Rocha-Filho e Garófalo (2013); SP_(CON)-2 e SP_(ILHA)-2 = Cordeiro et al. (2013). PR = Paraná, SP = São Paulo, C= Região Continental e I= Região Insular. FOD= Floresta Ombrófila Densa; Esforço amostral = número de horas de coleta; H' = Índice de diversidade de Shannon-Whiner; J' = Equidade de Pielou; Essências: 1) eucalipto; 2) eugenol; 3) beta-ionona; 4) vanilina; 5) benzoato de benzila; 6) acetato de benzila; 7) cinamato de metila; 8) salicilato de metila; 9) acetato de amila; 10) álcool fenetílico; 11) butirato de metila; 12) beta-mirceno; 13) cinamato de etila; 14) benzoato de metila; 16) linanol. *s/d = sem dados.

Local	Vegetação	Esforço amostral (h)	Abundância	Riqueza	H'	J'	Latitude	Longitude	Altitude	Tipos de amostragem	Intervalo	Essências
PR _(ILHA) -1	FOD	40	266	13	1,74	0,69	48°13'	25°23'	25	Ativa	9:00 - 13:00	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
PR _(CON) -1	FOD	74**	464	13	1,45	0,57	48°18'	25°09'	36	Ativa e passiva	9:00 -13:00	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
PR _(CON) -2	FOD	78	221	6	0,95	0,53	48°39'	25°19'	54	Ativa e passiva	9:00 - 15:00	1, 2, 4, 8
SP _(CON) -1	FOD	144	951	20	2,06	0,70	45°10'	23°27'	42	Ativa e passiva	9:00 - 15:00	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16
SP _(ILHA) -1	FOD	144	624	17	1,34	0,48	45°02'	23°31'	57	Ativa e passiva	9:00 - 15:00	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16
SP _(CON) -2	FOD	72	197	11	1,43	0,60	45°24'	23°45'	44	Ativa e passiva	9:00 - 17:00	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
SP _(ILHA) -2	FOD	144	1260	19	1,39	0,47	45°27'	23°45'	s/d*	Ativa e passiva	9:00 - 17:00	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13

** Valor adaptado de Giangarelli et al. (2015), pois o autor assume cada ponto de coleta (ativa e passiva) como uma estação diferente e considera como período amostrado, somando as horas amostradas.

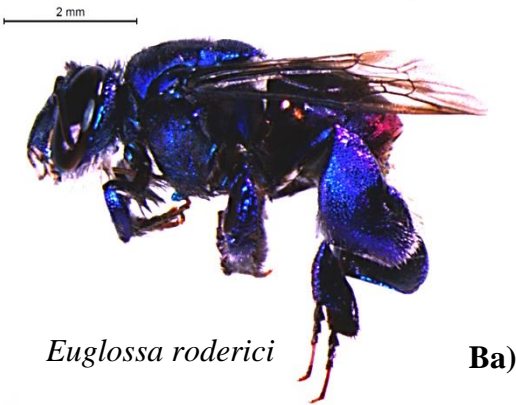




Euglossa annectans Aa)



Ab)



Euglossa roderici Ba)



Bb)



Euglossa truncata Ca)



Cb)

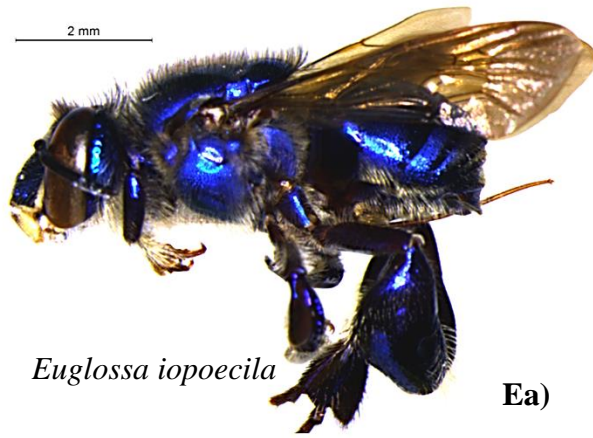


Euglossa viridis Da)



Db)



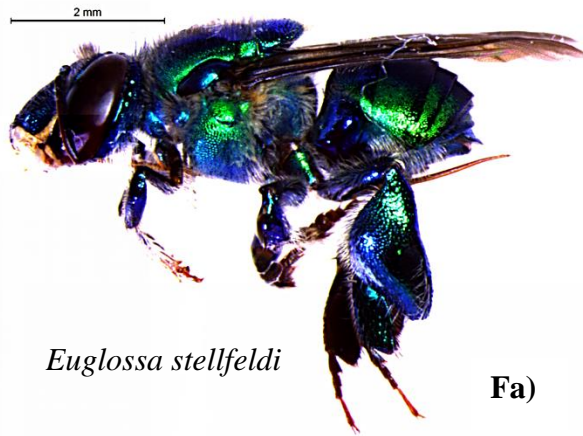


Euglossa iopoecila

Ea)



Eb)



Euglossa stellfeldi

Fa)



Fb)

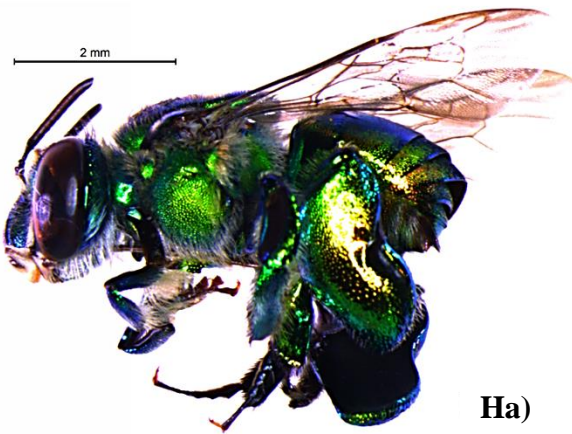


Euglossa townsendi

Ga)

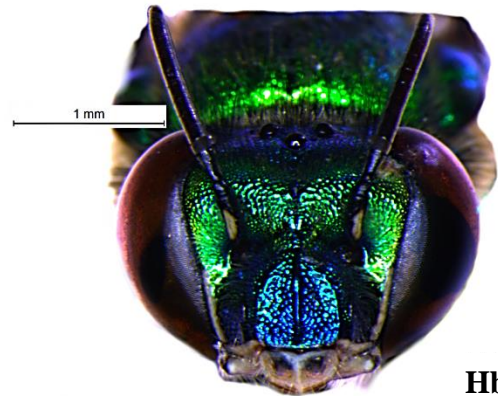


Gb)



Euglossa pleosticta

Ha)



Hb)





Eufriesea dentilabris

Ia)



Ib)



Exaerete smaragdina

Ja)



Jb)



Eulaema cingulata

Ka)



Kb)



Eulaema nigrita

La)



Lb)

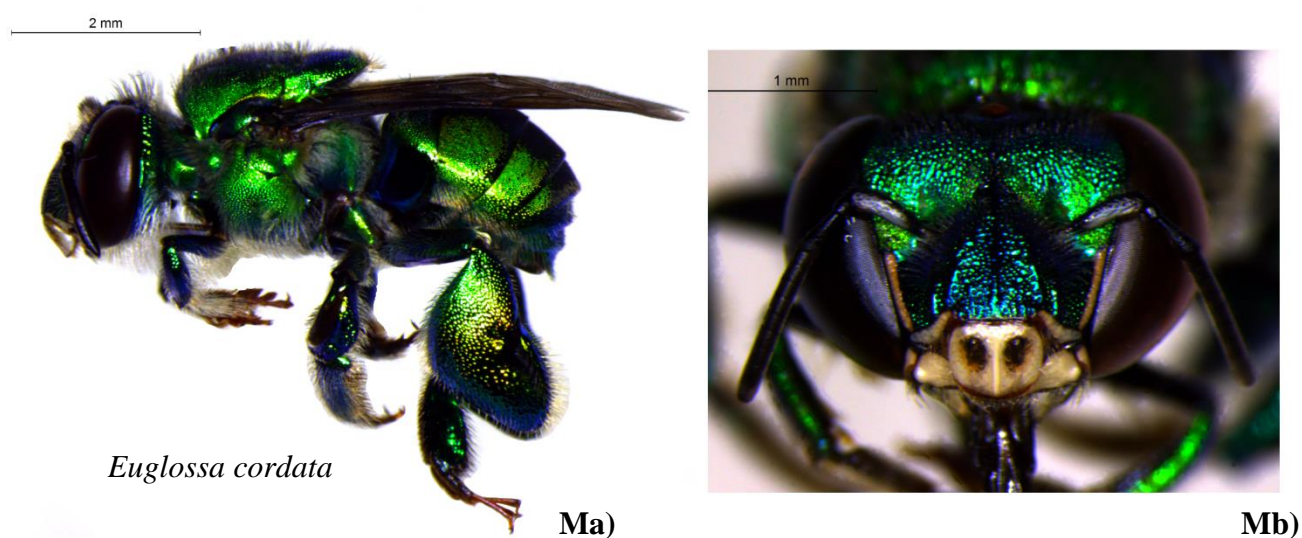


Figura S1. Lista de espécies amostradas no presentetrabalho, Aa) vista lateral e Ab) vista frontal de *Euglossa annectans*; Ba) vista lateral e Bb) vista frontal de *Euglossa roderici*; Ca) vista lateral e Cb) vista frontal de *Euglossa truncata*; Da) vista lateral e Db) vista frontal de *Euglossa viridis*; Ea) vista lateral e Eb) vista frontal de *Euglossa iopoecila*; Fa) vista lateral e Fb) vista frontal de *Euglossa stellfeldi*; Ga) vista lateral e Gb) vista frontal de *Euglossa townsendi*; Ha) vista lateral e Hb) vista frontal de *Euglossa pleosticta*; Ia) vista lateral e Ib) vista frontal de *Eufriesea dentilabris*; Ja) vista lateral e Jb) vista frontal de *Exaerete smaragdima*; Ka) vista lateral e Kb) vista frontal de *Eulaema cingulata*; La) vista lateral e Lb) vista frontal de *Eulaema nigrita*; Ma) vista lateral e Mb) vista frontal de *Euglossa cordata*.



Capítulo 2

Variações temporais e similaridades no uso de fragrâncias aromáticas por machos de *Euglossini*

Douglas Caldeira Giangarelli e Silvia Helena Sofia

Trabalho a ser submetido ao periódico *Acta Oecologica*



Variações temporais e similaridades no uso de fragrâncias aromáticas por machos de Euglossini

Douglas C. Giangarelli e Silvia Helena Sofia

Resumo. Machos das abelhas da tribo Euglossini mostram um comportamento peculiar de coletar fragrâncias químicas de uma variedade de fontes florais e não-florais, provavelmente para fins de acasalamento. Alguns estudos revelaram que a escolha e exploração de fragrâncias por machos euglossíneos podem variar sazonalmente, entre diferentes localidades ou ainda entre diferentes habitats. O presente estudo investigou os possíveis efeitos relacionados a atratividade e a sazonalidade no uso de iscas artificiais de machos destas abelhas por diferentes fragrâncias em três anos consecutivos de amostragens. O estudo foi realizado na Ilha do Superagui, localizada no município de Guaraqueçaba, estado do Paraná, sul no Brasil. As amostragens foram efetuadas em uma área de Mata Atlântica, apresentando fitofisionomia de Floresta Ombrófila Densa, durante a estação quente e úmida (outubro a março), como segue: Nov/2011-Mar/2012; Nov/2012-Mar/2013; Out/2013-Mar/2014. Durante as amostragens, machos euglossíneos atraídos à iscas-odores de oito fragrâncias, foram coletados por meio de duas metodologias (captura ativa com rede entomológica e armadilhas). Foram realizadas 15 coletas, com cinco destas em cada período de amostragem. Durante todo período de estudo, foram amostrados 378 machos de 13 espécies. No primeiro ano, 112 machos de 11 espécies visitaram cinco fragrâncias das oito ofertadas; no segundo ano, 139 machos, pertencendo a 13 espécies, visitaram todas as oito essências, enquanto que no terceiro ano, 127 machos de sete espécies, visitaram sete fragrâncias das oito disponíveis. Do total de machos amostrados, 321 (85%) pertenciam a quatro espécies: *Euglossa annectans* Dressler (29,1%), *Eg. stellfeldi* Moure (25,7%), *Eg. iopocila* Dressler (16,7%) e *Eg. roderici* Nemésio (13,5%). Dentre estas, *Eg. annectans* mostrou comportamento mais generalista, tendo visitado todas as oito fragrâncias ao longo dos três anos. *Euglossa annectans* foi também a espécie que mostrou maior diversidade de recursos visitados e maior amplitude de nicho. *Euglossa roderici* visitou principalmente salicilato de metila, fragrância pouco explorada pelas outras três espécies, e como consequência disto, mostrou a menor porcentagem de sobreposição de nicho com as demais três espécies.

Palavras-Chave: Abelhas das orquídeas; Euglossíneos; iscas-odores; uso por fragrâncias



Temporal variations and similarities in the use of aromatic fragrances by males *Euglossini*

Abstract. The males of the Neotropical euglossine bees exhibit the peculiar behavior of collecting chemical fragrances from a variety of floral and non-floral sources, probably for mating purposes. Some studies have shown that the choice and collection of fragrances by these males can vary seasonally, among different locations and between habitats. Here, we investigated the use of male orchid bees for different fragrances in three consecutive years. The study was carried out in the Superagui Island, located in the Guaraqueçaba municipality, state of Paraná, southern Brazil. The samplings were performed in an area of Atlantic Rainforest, during the warm-wet season (October-March), as follows: Nov/2011-Mar/2012; Out/2012-Mar/2013; Oct-Mar/2014. During the surveys, males were attracted to eight fragrances and collected by two methodologies (active collect with insect net and bait traps). We performed 15 collections, five per year. During all period, we sampled 378 males from 13 species. In the first year, 112 individuals from 11 species visited five fragrances; in the second, 139 males, belonging to 13 species, visited all fragrances available, while in the third year, 127 males from seven species, visited seven out of eight chemicals. From the total of males sampled, 321 (85%) belonged to four species: *Euglossa annectans* Dressler (29.1%), *Eg. stellfeldi* Moure (25.7%), *Eg. iopoecila* Dressler (16.7%) and *Eg. roderici* Nemésio (13.5%). Among these, *Eg. annectans* visited all types of fragrances along the total period of study, showing a more generalist behavior to search for chemical fragrances. *Euglossa annectans* was also the species showing the highest diversity of resources explored and the larger niche breadth. *Euglossa roderici* visited predominately methyl salicylate bait, chemical less explored by the other three species, and as consequence, showed the lowest percentage of niche overlap with all these three species.

Keywords: Orchid bee; Euglossine; scent-baits, fragrance use.



1. Introdução

O comportamento de coleta de fragrâncias químicas em fontes florais e não florais por machos de abelhas Euglossini, e em especial em flores de orquídeas, é de longa data conhecido (Dodson et al., 1969; Dressler, 1982; Whitten et al., 1989, 1993; Roubik e Hanson, 2004; Cappellari e Harter-Marques, 2010). De modo particular, a reconhecida associação entre machos destas abelhas e centenas de espécies de orquídeas da região Neotropical, levou todo o grupo a ser popularmente conhecido como “abelhas das orquídeas” (Dressler, 1982).

Os compostos coletados pelos machos euglossíneos são depositados, ao longo do tempo, em expansões das tíbias posteriores destes e, posteriormente, são expostos em comportamentos de pré-acasalamento (Eltz et al., 2015). Já foi demonstrado que o conjunto de perfumes armazenados nas pernas dos machos são expostos, sem modificação (Eltz et al., 2007), em *blends* espécie-específico (Eltz et al., 1999, 2006; Pokorny et al., 2013), os quais parecem funcionar na atração de fêmeas conspecíficas (Eltz et al., 2003, 2005a), embora esta seja uma hipótese ainda carente de comprovação experimental (Eltz et al., 2015).

Enquanto os comportamentos de coleta e armazenamento de perfumes pelos machos de abelhas das orquídeas encontram-se relativamente bem elucidados e descritos na literatura (Dodson, 1966; Dressler, 1968, 1982; Eltz et al., 2003; Roubik e Hanson, 2004; Eltz et al. 2005a, 2007), ainda persistem diversas questões relacionadas à escolha e exploração na natureza do conjunto de fragrâncias que irão constituir a combinação destas, ou seja, os diferentes *blends* ou *bouquets* usados pelos machos. Para formar os diversos e complexos *bouquets*, os machos de Euglossini devem coletar em uma ampla gama de fontes, provavelmente, forrageando em áreas extensas de florestas em busca de tais recursos (Zimmermann et al., 2009). Tem sido também sustentado que tantos comportamentos inatos quanto aprendidos parecem direcionar as preferências ou escolhas dos machos euglossíneos pelas diferentes fragrâncias (Eltz et al., 2005b). Em relação ao comportamento aprendido, estes últimos autores demonstraram que machos de *Euglossa imperialis* Cockrell, mantidos em gaiolas e com acesso repetido a uma única essência interromperam a coleta desta após alguns dias. Entretanto, quando nova essência foi ofertada aos mesmos machos, estes retomaram a atividade de coleta. Assim, tem sido sugerido que os machos abastecidos com uma determinada fragrância mostram um *feedback* negativo em relação à mesma (Eltz et al., 2005b; Pokorny et al., 2013).



Adicionalmente, alguns estudos mostraram que a escolha e exploração das fragrâncias pode variar sazonalmente, entre localidades distintas e entre habitats (Ackerman, 1989; Abrahamczyk et al., 2012; Pokorny et al., 2013). Também já foi demonstrado que existe diferenças individuais intraespecíficas na composição dos *blends* de machos de diferentes idades, com machos mais velhos mostrando combinações mais complexas de fragrâncias (Eltz et al., 1999; Pokorny et al., 2013). No caso das diferenças sazonais observadas nas preferências das abelhas, uma hipótese provável é que tais diferenças estariam relacionadas à variação temporal nos recursos ofertados pelas espécies de plantas sob influência do clima nos diferentes períodos do ano (Abrahamczyk et al., 2012).

O conjunto de estudos realizados com machos de Euglossini atraídos a iscas-odores revelam que algumas essências são muito mais atrativas do que outras. Mesmo no caso dos estudos que fizeram uso de uma ampla gama de essências, ou seja, utilizaram uma dezena ou mais de fragrâncias diferentes, é perceptível a maior atratividade de determinadas fragrâncias (Ackerman, 1983, 1989; Zimmermann et al., 2009; Cordeiro et al., 2013; Rocha-Filho e Garófalo, 2014; Nemésio e Rasmussen, 2014). Nos resultados destes estudos, é notável a sobreposição na escolha das espécies em relação a algumas destas fragrâncias. Contudo, utilizando 16 fragrâncias diferentes em um levantamento que atraiu 44 espécies de Euglossini no Panamá, Ackerman (1989) observou que embora tenha havido sobreposição na escolha das fragrâncias, cada espécie apresentou um conjunto único de essências às quais estas foram atraídas.

Resultados de diferentes estudos mostram que, enquanto algumas espécies visitam uma ampla variedade de essências, apresentando um comportamento mais generalista na exploração das fragrâncias ofertadas, outras apresentam um comportamento mais seletivo, sendo atraídas a poucas das essências ofertadas (ex. Ramalho et al., 2009; Cordeiro et al., 2013; Rocha-Filho e Garófalo, 2014; Nemésio e Rasmussen, 2014). Além disso, a partir dos resultados destes estudos é possível constatar que, em alguns casos, uma mesma espécie pode mostrar uma variação neste tipo de comportamento ao explorar as fontes de recursos disponíveis (iscas-odores) em diferentes localidades, ou seja, comportando-se de forma mais generalista ou menos generalista nas suas escolhas de fragrâncias em diferentes áreas amostradas (Janzen et al., 1982, Ackerman, 1989; Rocha-Filho e Garófalo, 2014). Contudo, com base apenas nas informações disponíveis na literatura, uma discussão sobre a existência de comportamentos especialistas ou generalistas de diferentes espécies na exploração das



fragrâncias pode se tornar um tanto especulativa, requerendo uma investigação com foco específico nesta questão.

Assim, o principal objetivo deste estudo foi investigar possíveis variações na atratividade de oito fragrâncias artificiais à diferentes espécies de Euglossini, apresentadas às abelhas durante a estação quente e úmida, em três anos consecutivos de amostragens. Adicionalmente, foram analisados a amplitude e sobreposição de “nichos” das espécies mais frequentes, nas condições de estudo apresentadas a estas espécies.

2. Material e Métodos

2.1. Área de estudo

O presente trabalho foi realizado na Ilha do Superagui (IS), que integra juntamente com outras três ilhas (das Peças, Pinheiro e Pinheirinho) e uma área continental (Vale do Rio do Patos), o Parque Nacional do Superagui (PNS) ou simplesmente Parna do Superagui. No total, o PNS abrange uma área de 33.988 hectares, com localização na porção mais setentrional do estado do Paraná, litoral norte deste estado brasileiro, no município de Guaraqueçaba (Figura 1), fazendo parte do Complexo Estuarino Lagunar de Iguape - Cananéia e Paranaguá (Vivekananda, 2001; Pedroso-Júnior e Sato, 2005). O PNS é reconhecido por apresentar um estado de conservação surpreendentemente bom (IPARDES, 2001) e destaca-se por ser habitat de algumas espécies endêmicas como o Mico da cara-preta (*Leontopithecus caissara* Lorini e Persson, 1990)), o Papagaio da cara-roxa (*Amazona brasiliensis* Linnaeus, 1758), entre outros (ICMBIO, 1997; MMA, 2007).

Com uma extensão 14.511 ha inseridos no domínio Atlântico da Floresta Ombrófila Densa, a IS é uma ilha artificial, criada em 1953 pela construção do Canal do Varadouro (Vivekananda, 2001), que se encontra distante cerca de 50 metros do continente (Passos e Gracioli, 2004). Na IS ocorrem diferentes tipos de ecossistemas, com uma maior ocorrência de Floresta Ombrófila Densa (FOD) (46%), deste total, 44% é do tipo FOD de terras baixas e 2% de Submontana (Schmidlin et al., 2005).

O relevo da IS é relativamente plano, com três elevações ao todo - Morros do Superagui, das Pacas e do Canudal – (Vivekananda, 2001). O clima da região é do tipo *Cfa* (Köppen) ou subtropical úmido mesotérmico, não apresentando estação seca e geadas, com temperatura média anual a 21°C e médias pluviométricas em torno de 2500



mm. O mês mais frio apresenta temperatura média inferior a 18°C e o mais quente apresenta temperatura média superior a 22°C (IPARDES, 2001).

Para a amostragem de Euglossini foram selecionados três pontos de coleta, localizados em uma área de Floresta Ombrófila Densa (FOD) de Terras Baixas. As coordenadas geográficas do ponto de amostragem são as seguintes: 25°23'36"S e 48°13'02"W (Figura 1).

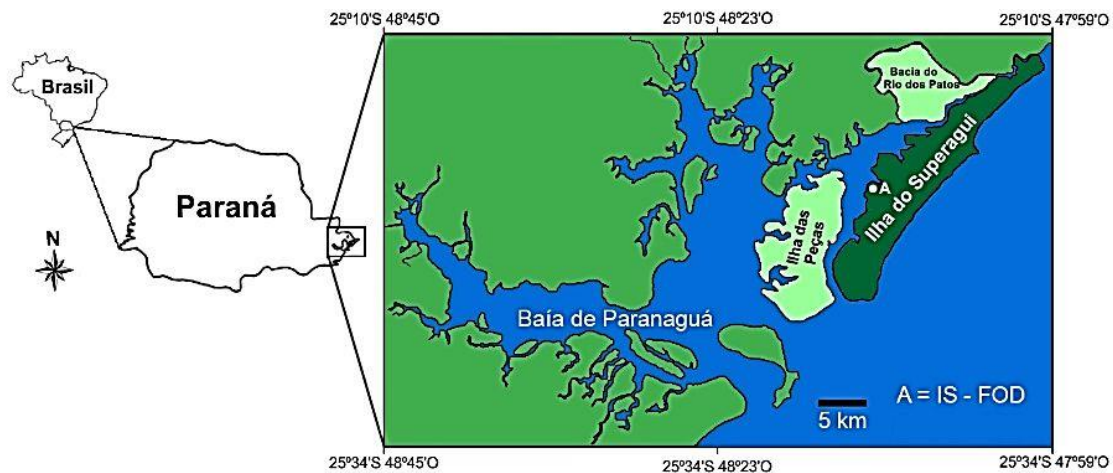


Figura 1. Localização geográfica do Parque Nacional do Superagui, em destaque (tons claros), encontra-se a Ilha das Peças e a Baía do Rio dos Patos e em tom escuro localiza-se a Ilha do Superagui, A refere-se ao ponto de amostragem composto de Floresta Ombrófila Densa.

2.2. Metodologia

A metodologia de amostragem foi baseada em Giangarelli et al. (2009), com algumas modificações. No presente estudo, além de coleta com rede entomológica (iscas-de-espera), foi realizada a captura com armadilhas confeccionadas com garrafas plásticas, usando um modelo similar ao descrito por Ramalho et al. (2009), nos dois métodos de coleta, foram utilizados iscas-odores com os compostos abaixo para a atratividade dos machos euglossíneos. No total foram utilizadas oito essências químicas disponibilizadas em iscas individuais: eucaliptol, eugenol, vanilina, beta-ionona, salicilato de metila, benzoato de benzila, acetato de benzila e cinamato de metila.

As amostragens ocorreram apenas durante a estação quente e chuvosa, que corresponde ao período de setembro a maio na região estudada (Pereira et al., 2008), totalizando 15 coletas, entre novembro de 2011 e março de 2014. As coletas ocorreram, preferencialmente, no horário entre 9:00 e 14:00 horas e tiveram duração de quatro



horas cada uma. Na Tabela 1 estão relacionados os dias de amostragem na área de estudo.

Tabela 1. Datas de coletas de machos de *Euglossini*, amostrados em uma área de Floresta Ombrófila Densa na Ilha do Superagui, município de Guaraqueçaba, estado do Paraná, sul do Brasil, entre novembro de 2011 e março de 2014.

Períodos de Amostragem		
Nov/2011 - Mar/2012	Nov/2012 - Mar/2013	Out/2013 – Mar/2014
10/11/2011	31/10/2012	31/10/2013
10/01/2012	17/12/2012	29/11/2013
02/02/2012	24/01/2013	17/12/2013
26/02/2012	26/02/2013	28/01/2014
08/03/2012	13/03/2013	20/03/2014

Foram selecionados três pontos de amostragem, os quais estavam separados entre si por uma distância aproximada de 300 m. Em um destes pontos foi colocado um conjunto de oito armadilhas, com as respectivas essências atrativas; nos outros dois pontos de amostragem, as abelhas atraídas às iscas-odores de espera foram capturadas por dois coletores, utilizando redes entomológicas. As coletas nestes três pontos ocorreram simultaneamente.

*2.3. Comparações entre as faunas de *Euglossini* de duas áreas de Floresta Ombrófila Densa na região da APA de Guaraqueçaba*

Para investigar possíveis variações no uso dos machos *Euglossini* às mesmas oito iscas-odores, amostrados em duas áreas de Floresta Ombrófila Densa (FOD), localizadas em uma mesma região (APA de Guaraqueçaba), mas em duas localidades distintas, foi feita uma comparação entre os resultados obtidos na IS (presente estudo) e os obtidos por Giangarelli (2011).

A área de FOD estudada por Giangarelli (2011) pertence à Reserva Natural Salto Morato (RNSM), também localizada no município de Guaraqueçaba, sob as seguintes coordenadas geográficas 25°09'36"S e 48°18'02"O, distante 24 km da IS. A caracterização detalhada da área da RNSM encontra-se em Giangarelli et al. (2015).



Na RNSM as amostragens foram realizadas de abril de 2009 a maio de 2010, entre 9:00 e 14:00 horas, e tiveram duração de três horas e meia cada uma, totalizando 21 amostragens e 74 horas de coleta. De forma similar ao presente estudo, as amostragens foram realizadas por dois coletores, posicionados em dois pontos distintos, distante cerca de 500 m. Entretanto, na RNSM, diferente da IS, foram amostradas, em dias consecutivos, duas áreas de FOD, distantes entre si cerca de 2 km. Também nas amostragens na RNSM, um conjunto de oito armadilhas foi utilizado em cada uma das áreas amostradas de FOD, totalizando três pontos de amostragem por área de FOD. Detalhes adicionais sobre a metodologia podem ser consultados em Giangarelli et al. (2015).

Os machos coletados em todas as amostragens, das diferentes áreas, foram anestesiados com éter ou sob refrigeração e, posteriormente, foram acondicionados em *freezer* (-20°C) até a montagem em alfinetes entomológicos. Posteriormente, este material foi identificado em estereomicroscópio Zeiss (Discovery V.20) e encontra-se depositado na Coleção de Abelhas do Laboratório de Genética e Ecologia Animal da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Todo este material deverá, após tombamento, ser depositado no Museu de Zoologia da UEL (MZUEL).

No que se refere à relação de espécies reconhecidas para a tribo Euglossini até o presente, a taxonomia deste estudo está de acordo com Moure et al. (2012). Por uma questão de praticidade, no texto a seguir foram adotadas as abreviações usuais para os gêneros de Euglossini amostrados neste estudo, como segue: *Eg.* = *Euglossa*; *Ef.* = *Eufriesea*; *El.* = *Eulaema*; *Ex.* = *Exaerete*.

2.4. Análise dos dados

Nas análises dos dados, estes foram tratados separadamente em dois conjuntos: a) os referentes exclusivamente às amostragens realizadas entre novembro de 2011 a março de 2014 na área de FOD da IS; b) comparação entre os conjuntos de espécies de Euglossini atraídas às diferentes essências nas duas áreas de estudo (FOD-IS e FOD-RNSM). Como houve diferenças relevantes nos esforços de amostragem entre as áreas, para as análises comparativas o número de indivíduos coletados de cada espécie foi utilizado a abundância relativa para cada área.

Mesmo no caso da área de FOD-IS, onde o esforço de coleta ao longo dos três períodos de amostragem foi similar, as análises referentes às escolhas dos machos das



diferentes espécies pelas essências ofertadas levaram em consideração principalmente as espécies mais abundantes (representando cerca de 10% ou mais do total de indivíduos amostrados nos três anos consecutivos).

Para verificar se ocorreram diferenças estatísticas nas abundâncias entre os anos amostrados foi utilizado o teste Qui-quadrado (χ^2). Este teste também foi utilizado para verificar: a) possíveis diferenças no uso das espécies mais abundantes ($n > 20$ indivíduos amostrados) as oito às iscas-odores, entre os três anos de amostragens; b) se houve maior procura por alguma fragrância pelas espécies (intraespecífica) em cada ano amostrado. Entretanto, quando o número de indivíduos amostrado por uma espécie foi menor que 20 indivíduos ($n < 20$) o teste não foi empregado, para evitar desvios pela baixa abundância. Estas análises foram calculadas de acordo com a fórmula: $\chi^2 = \sum [(o - e)^2 / e]$, onde o = frequência observada para cada espécie, e = frequência esperada para aquela classe (Siegel, 1981).

A diversidade de fontes de recursos (essências) visitadas pelos machos das espécies mais abundantes em número nas duas áreas estudadas (IS e RNSM), bem como o padrão de distribuição dos machos visitantes destas espécies no conjunto de essências exploradas por estes, foram estimadas aplicando-se os índices de diversidade de Shannon-Wiener (H') equitabilidade de Pielou (J') (Krebs, 2013). Estes dois índices ecológicos foram estimados usando-se o programa Past 2.17c (Hammer et al., 2001). Este programa computacional foi também empregado para comparar, por meio do teste t de Student, possíveis diferenças estatísticas entre os pares de valores de diversidade (H') das espécies mais abundantes em cada área de estudo.

Em ambas as áreas de estudo, também no caso das espécies mais abundantes (em número de machos coletados nas iscas-odores), foram estimadas a amplitude e sobreposição dos nichos destas espécies, considerando-se as fragrâncias visitadas por estas. Para o cálculo da amplitude de nicho foi utilizada a medida de Levins (Krebs 2013), segundo a fórmula:



$$\hat{B} = \frac{1}{\sum \hat{p}_j^2}, \text{ onde}$$

\hat{B} = Medida de amplitude de nicho de Levin

\hat{p}_j = Proporção de indivíduos encontrados usando a fonte j

$$\hat{B}_A = \frac{\hat{B} - 1}{n - 1}$$

Onde:

\hat{B}_A = Amplitude padronizada de nicho de Levin

\hat{B} = Medida de amplitude de nicho de Levin

n = Número de possibilidades (essências)

Para a estimativa da sobreposição de nicho empregou-se a *porcentagem de sobreposição* (PS), calculada pela seguinte fórmula:

$$\hat{P}_{jk} = \left[\sum_{i=1}^n (\text{minimum } \hat{p}_{ij}, \hat{p}_{ik}) \right] 100$$

- a qual é idêntica à *porcentagem de similaridade* proposta por Renkonen, usada normalmente para comparações entre faunas de diferentes localidades e que, segundo Krebs (2013) constitui uma das medidas mais simples de sobreposição de nicho. É importante destacar, que tanto no uso da amplitude de nicho como na sobreposição de nicho, esses índices foram utilizados de forma artificial, no intuito de se obter um índice, pois as oito essências ofertadas não representam todos os compostos explorados naturalmente pelos machos euglossíneos.

Neste estudo, as estimativas de frequência de ocorrência (FO) e dominância (D) e a determinação de categorias a partir da combinação destes dois parâmetros, empregadas por Palma (1975) e estabelecidas conforme critérios descritos a seguir, foram utilizadas para inferir sobre o uso das diferentes essências pelas espécies mais abundantes de Euglossini. Com base nos critérios já empregados por Palma (1975) para cálculos de categorias de espécies, foi feito neste estudo uma adaptação para a estimativa de categorias das *essências*, como segue: FO = número de amostras com a *essência* i / número de amostras total x 100; FO \geq 50% indica uso muito frequente (mf) da *essência* pela espécie de abelha; se FO < 50% e \geq 25%, indica uso frequente (f); se FO < 25%, indica uso pouco frequente (pf). Já a dominância foi calculada como: D = abundância da *essência* i / abundância total x 100. D \geq 5% = dominante (d); D < 5% e \geq 2,5% = acessória (a); D < 2,5% = *essência* ocasional (o). Estes índices, analisados em



conjunto foram usados para agrupar as essências utilizadas por cada espécie de abelha em três categorias (Ct): essência comum (C), intermediária (I) e rara (R).

O programa PAST 2.17c foi também utilizado para analisar as possíveis correlações lineares (r) entre variáveis abióticas (temperatura mensal média, umidade relativa mensal média e precipitação pluviométrica mensal acumulada) e abundâncias e riqueza das diferentes espécies. Os dados das variáveis abióticas foram fornecidos pelo Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR).

Possíveis variações significativas nos parâmetros abióticos relacionados acima entre os três anos de amostragens foram analisadas empregando-se os testes t e de Mann-Whitney, aplicados em conformidade as seguintes premissas: normalidade, homogeneidade e homostacidade dos dados analisados. Em todas as análises estatísticas empregadas, os resultados foram considerados significativamente diferentes para valores de $p < 0,05$ (Zar, 1996).

3. Resultados

No período de estudo, na região amostrada, as maiores médias térmicas ocorreram nos meses de fevereiro e dezembro de 2012, fevereiro de 2013 e janeiro de 2014 (Figura 2). A precipitação pluviométrica foi registrada para todos os meses de amostragem, com o maior índice tendo sido registrado em fevereiro de 2013. Os menores índices precipitação ocorreram em março e novembro de 2012 e outubro de 2013. As medidas de umidade relativa mensal média permaneceram acima de 80% em todos os meses de amostragem, com os menores valores registrados para os meses dezembro de 2013 e janeiro de 2014 e os maiores para os meses de março de 2013 e 2014. As maiores abundâncias de machos atraídos às iscas ocorreram em janeiro e dezembro de 2012 e janeiro de 2013; enquanto que, as menores ocorreram nos meses de fevereiro e março de 2012 e dezembro de 2013. As análises não revelaram correlação significativa entre nenhum destes três parâmetros abióticos com a abundância ou riqueza de *Euglossini* na área estudada (Figura 2).



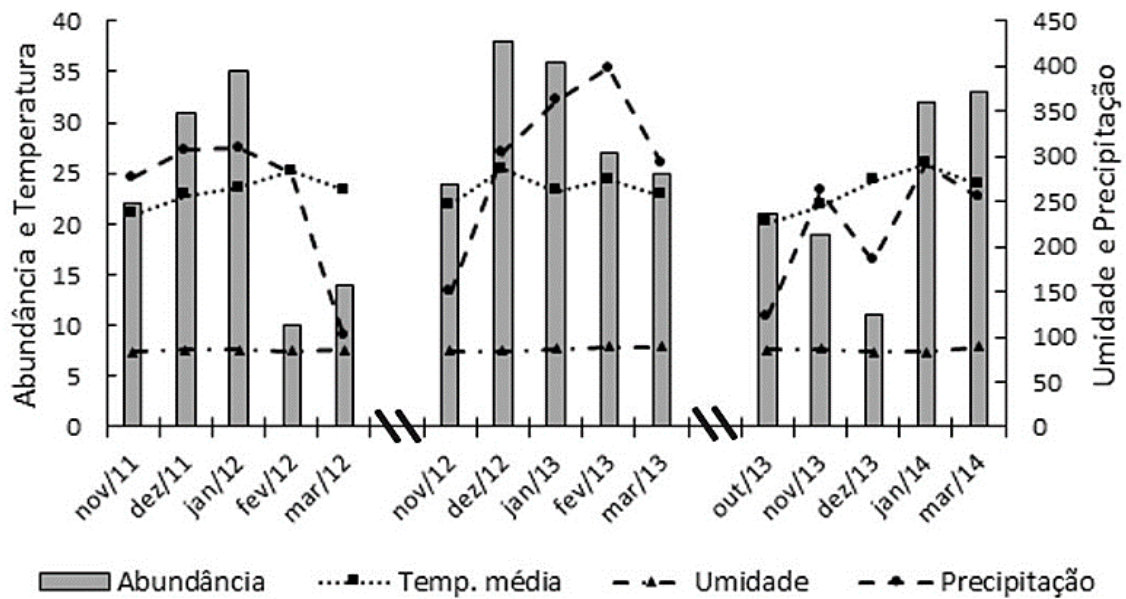


Figura 2. Variação mensal nos parâmetros abióticos (temperatura média, umidade relativa média e precipitação pluviométrica) e na abundância (número de indivíduos) de machos de *Euglossini* amostrados em uma área de Floresta Ombrófila Densa na Ilha do Superagui, no município de Guaraqueçaba, estado do Paraná, sul do Brasil, durante três anos consecutivos, no período entre novembro de 2011 e março de 2014.

No total foram coletados 378 machos de 13 espécies, pertencentes a quatro gêneros de *Euglossini* (Tabela 2). No primeiro ano de amostragem foram registrados 112 indivíduos pertencentes a quatro gêneros e 11 espécies. Neste período foram visitadas cinco fragrâncias atrativas. No segundo período de amostragem, o total de machos coletados foi de 139, distribuídos em 13 espécies e quatro gêneros. Finalmente, no terceiro período foram amostrados 127 machos, pertencentes a sete espécies e três gêneros de *Euglossini*. Nos dois últimos períodos de amostragem, todas as essências disponíveis foram visitadas pelos machos atraídos às iscas (Tabela 2).

As análises revelaram que as abundâncias (total de indivíduos) de machos de *Euglossini* atraídos às iscas-odores não diferiram significativamente entre os três anos ($t.1^{\circ}x2^{\circ}=1,35/p=0,21$; $t.1^{\circ}x3^{\circ}=0,12/p=0,90$; $t.2^{\circ}x3^{\circ}=1,34/p=0,22$). O mesmo foi verificado para as variações no número de espécies amostradas por período, ou seja, nenhuma diferença significativa foi detectada ($t.1^{\circ}x2^{\circ}=0,61/p=0,56$; $t.1^{\circ}x3^{\circ}=1,33/p=0,22$; $t.2^{\circ}x3^{\circ}=1,79/p=0,11$).

Do total de indivíduos amostrados, 321 (~ 85%) constituíram machos de quatro espécies: *Euglossa annectans* (29,1%), *Euglossa stellfeldi* (25,7%), *Euglossa iopoecila* (16,7%) e *Euglossa roderici* (13,5%), (Tabela 2). Considerando-se que apenas estas quatro espécies estiveram representadas por um número mais representativo de



indivíduos (>20) na amostra (ver Material e Métodos), as análises referentes aos padrões de abundância e do uso às diferentes fragrâncias durante os três períodos de amostragens restringiram-se a estas espécies.

As análises estatísticas revelaram para *Eg. annectans* e *Eg. Stellfeldi* ausência de diferenças significativas entre os três anos de amostragem nas abundâncias de machos atraídos destas duas espécies atraídos às diferentes essências. De modo diverso, tanto para *Eg. Iopoecila* ($\chi^2 = 14,86$; g.l. = 2 / $\chi^2_{\text{crítico}} = 5,99$), quanto para *Eg. Roderici* ($\chi^2 = 15,18$; g.l. = 2 / $\chi^2_{\text{crítico}} = 5,99$) foi constatado que as abundâncias de machos atraídos às essências variou significativamente entre os três anos (Tabela 2; Figura 3).

Além de ser a espécie mais abundante (Tabela 2), *Euglossa annectans* foi a única que ocorreu em todas as amostragens, apresentando seu pico de abundância em janeiro, consistentemente nos três anos de estudo. Esta espécie visitou todas as oito essências disponíveis, mas nunca todas estas no mesmo ano de amostragem (Figura 3). No primeiro ano os machos visitaram quatro tipos de essências, enquanto que, tanto no segundo, quanto no terceiro ano, sete essências foram visitadas por machos de *Eg. annectans* (Tabela 2, Figura 3). Entretanto, enquanto que no segundo ano, o acetato de benzila (AB) não atraiu nenhum macho desta espécie, no terceiro ano, o mesmo ocorreu para a fragrância cinamato de metila (CM) (Figura 3).



Tabela 2. Número de machos da tribo Euglossini amostrados (N), em uma área de Floresta Ombrófila Densa, na Ilha do Superagui, sul do Brasil, nos seguintes períodos: Nov/2011-Mar/2012 (1º ano), Nov/2012-Mar/2013 (2º ano) e Out/2013-Mar/2014 (3º ano) e as essências visitadas (EG= Eugenol; EC= Eucaliptol; BI= Beta-Ionona; SM= Salicilato de Metila; BB= Benzoato de Benzila; VN= Vanilina; AC= Acetato de Benzila; CM= Cinamato de Metila).

Espécies	1º ano		2º ano		3º ano		Total
	N	Essências visitadas	N	Essências visitadas	N	Essências visitadas	
<i>Euglossa annectans</i> * Dressler, 1982	45	EG,EC,BI, VN	29	EG,EC,BI,SM, BB,VN,CM	36	EG,EC,BI,SM, BB,VN,AC	110
<i>Euglossa cordata</i> (Linnaeus, 1758)	15	EC,BI	11	EG,EC,BI,CM	5	EC,BI,SM	31
<i>Euglossa iopoecila</i> * Dressler, 1982	7	EG,EC	33	EG,EC,BI, SM	23	EG,EC,BI	63
<i>Euglossa pleosticta</i> Dressler, 1982	-	-	2	EC	-	-	2
<i>Euglossa roderici</i> * Nemésio, 2009	4	BI,SM	26	EG,SM,BB, CM	21	EG,SM,VN,BB, CM	51
<i>Euglossa stellfeldi</i> * Moure, 1947	30	EG,EC,BI	28	EG,BI,SM, BB,VN	39	EG,BI,SM, VN,BB	97
<i>Euglossa townsendi</i> Cockerell, 1897	2	EC	1	EC	-	-	3
<i>Euglossa truncata</i> Rebêlo e Moure, 1996	-	-	1	EC	-	-	1
<i>Euglossa viridis</i> (Perty, 1833)	3	EG,EC	1	EG	-	-	4
<i>Eufriesea dentilabris</i> (Mocsáry, 1897)	2	EC	2	EC,SM	1	EC	5
<i>Eulaema cingulata</i> (Fabricius, 1804)	1	AC	1	AC	-	-	2
<i>Eulaema nigrita</i> Lepelletier, 1841	2	EC	3	EC	2	EC	7
<i>Exaerete smaragdina</i> (Guérin-Méneville, 1845)	1	EC	1	EC	-	-	2
Total	112	EG,EC,BI, VN,AC	139	EG,EC,BI,SM, BB,VN,AC,CM	127	EG,EC,BI,SM, BB,VN,AC,CM	378

* = espécies representadas por maior número de indivíduos na área estudada e que fizeram parte de análises sobre padrões de abundância e do uso por fragrâncias



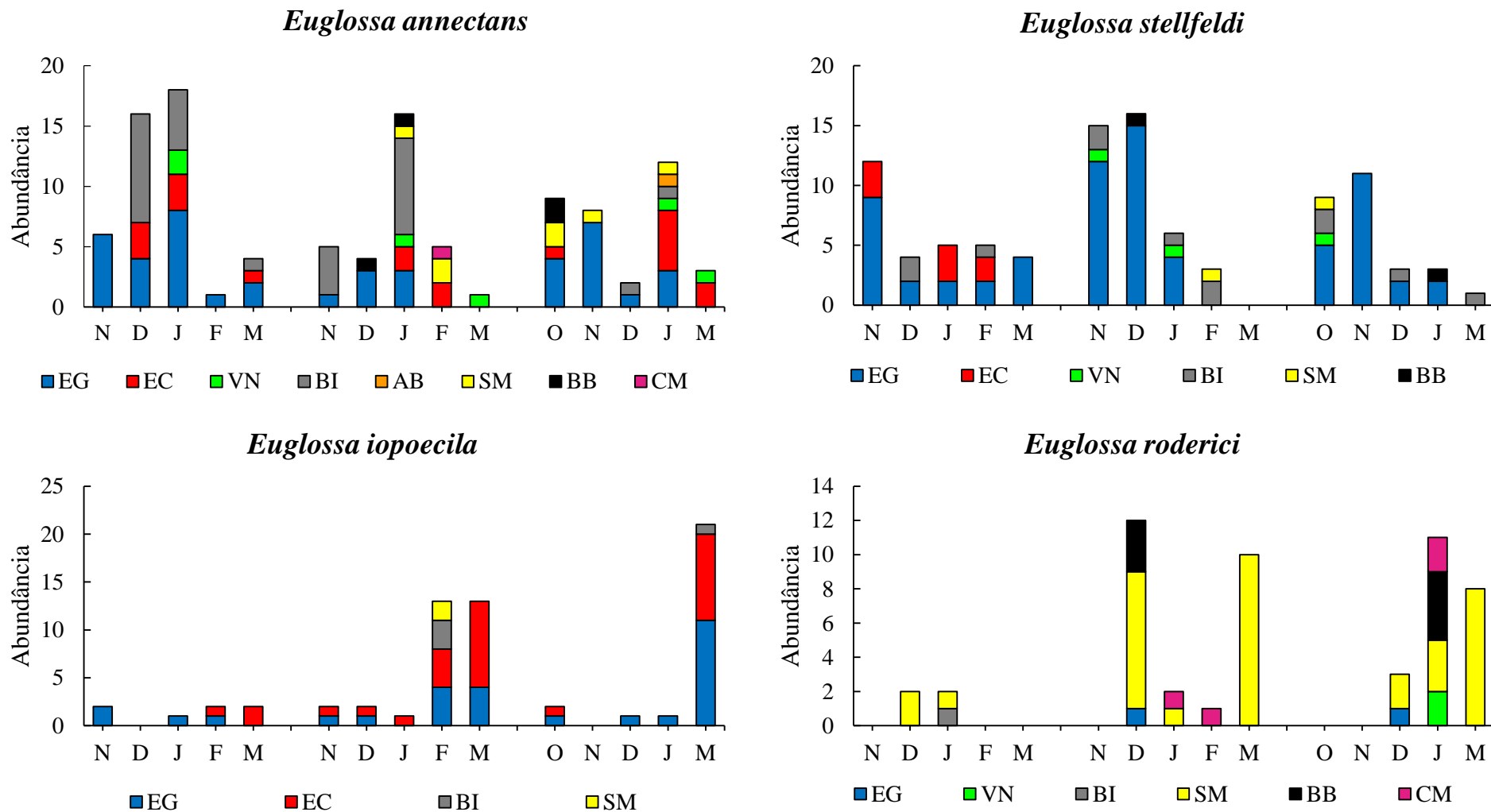


Figura 3. Padrão de abundância e do uso as essências ofertadas durante o período chuvoso nos três anos de amostragens. O, N, D, J, F, M refere-se aos meses amostrados (outubro, novembro, dezembro, janeiro, fevereiro e março). EG= Eugenol; EC= Eucalipitol; VN= Vanilina; BI= Beta-Ionona; AB= Acetato de Benzila; SM= Salicilato de Metila; BB= Benzoato de Benzila e CM= Cinamato de Metila. Os eixos y estão representados em escalas diferentes.



Ainda em relação à *Euglossa annectans*, foi constatado que esta espécie mostrou uma variação significativa no uso por determinadas essências nos diferentes anos. Assim, no primeiro e terceiro anos esta associação foi maior com o eugenol ($\chi^2 = 18,91$; g.l.= 2; $p < 0,0003$; $\chi^2 = 31,47$; g.l.= 2; $p < 0,001$, respectivamente), no segundo ano, beta-ionona foi a mais procurada ($\chi^2 = 20,26$; g.l.= 2; $p < 0,002$). Considerando-se os três anos de amostragem, o eugenol foi a mais atrativa para *Eg. annectans*, tendo atraído machos desta espécie em 12 das 15 amostragens realizadas. Eucaliptol e beta-ionona também foram essências bastante atrativas para esta espécie de Euglossini. Em conjunto, eugenol (43), eucaliptol (19) e beta-ionona (29) atraíram mais de 80% dos indivíduos de *Eg. annectans* (Figura 3; Tabela 3).

Machos de *Eg. stellfeldi*, a segunda espécie mais abundante na área estudada, também foram amostrados nas iscas-odores na maioria das coletas, ou seja, em 12 das 15 amostragens realizadas (Figura 3). Em relação às essências visitadas, os machos desta espécie foram atraídos a seis do conjunto de oito fragrâncias disponíveis. No primeiro ano, os machos de *Eg. stellfeldi* visitaram três essências, enquanto que, nos outros dois anos os machos visitaram cinco fragrâncias, por ano (Figura 3). O teste do qui-quadrado indicou uma associação significativa (1º ano = $\chi^2 = 13,4$; g.l.= 2; $p < 0,001$; 2º ano = $\chi^2 = 84$; g.l.= 4; $p < 0,001$; 3º ano = $\chi^2 = 50,5$; g.l.= 4; $p < 0,001$) entre os machos de *Eg. stellfeldi* e tipo de essência visitada por ano. Entre as fragrâncias disponibilizadas o eugenol foi a mais buscada por esta espécie na IS. Considerando-se os três anos de estudo em conjunto, foi verificado que, mais de 70% dos machos de *Eg. stellfeldi* coletados foram amostrados visitando as iscas de eugenol (Tabela 3).

Euglossa iopoecila, a terceira espécie em ordem de abundância, não foi amostrada em apenas duas coletas (dezembro/2011 e novembro/2013). Os machos desta espécie utilizaram duas, quatro e três fragrâncias diferentes nos três anos, respectivamente (Figura 3). O uso em relação às fragrâncias não foi testada no primeiro ano, devido ao baixo número ($n = 7$) de machos amostrados neste ano (Tabela 2). No segundo e terceiro anos, machos de *Eg. iopoecila* visitaram predominantemente as iscas de eugenol e eucaliptol. No geral, estas duas essências atraíram mais de 90% dos indivíduos desta espécie (Figura 2; Tabela 3).

Dentre as espécies mais abundantes na área de FOD da IS, *Eg. roderici* foi a que ocorreu em um menor número de meses, tendo sido amostrada em apenas nove das 15 coletas (Figura 3). Salicilato de metila foi a essência mais procurada por esta espécie



nos três anos amostrados; no conjunto destes anos 68,6% das visitas de *Eg. roderici* foram direcionadas para esta fragrância. Novamente, no caso desta espécie devido ao baixo número de machos coletados no primeiro ano ($n = 4$), as análises estatísticas envolveram apenas as amostras dos dois últimos anos. Estas também mostraram uma associação significativa entre esta espécie e as essências visitadas ($\chi^2 = 35$; g.l.= 3; $p < 0,001$; $\chi^2 = 22,09$; g.l.= 4; $p < 0,002$) durante o segundo e terceiro anos.

Vale destacar que estas duas últimas espécies de Euglossini foram as únicas que mostraram uma associação entre a atividade de seus machos com parâmetros abióticos. No caso de *Eg. iopoecila*, o número desta espécie atraídos às iscas mostrou uma correlação significativa com a temperatura média mensal ($r=0,75$; $p=0,0001$). Para *Eg. roderici*, uma correlação positiva significativa ($r = 0,55$; $p = 0,003$) foi detectada entre umidade relativa média mensal e a abundância de machos nas iscas-odores.

Ao se comparar a diversidade de essências exploradas pelas quatro espécies mais abundantes na IS, foi observado que *Eg. annectans* foi a espécie que mostrou a maior diversidade de essências visitadas ($H' = 1,56$), valor este que diferiu significativamente em relação das outras três espécies (Tabela 3). *Euglossa annectans* mostrou também os valores mais elevados de amplitude de nicho ($B_A = 0,38$). As estimativas de equidade, entretanto, se mostraram similares a de várias outras espécies.

Resultados bastante similares foram encontrados nas análises das mesmas quatro espécies de Euglossini, ou seja, *Eg. annectans*, *Eg. stellfeldi*, *Eg. iopoecila* e *Eg. roderici*, coletadas na RNSM (Tabela 3). Também na área de FOD desta reserva, no que se refere ao conjunto de essências exploradas, *Eg. annectans* mostrou os índices mais elevados de diversidade ($H' = 1,56$) e amplitude de nicho ($B_A = 0,36$). Foi a única espécie com um índice de diversidade na exploração das essências diferindo significativamente dos estimados para as demais espécies. Vale destacar que, na RNSM *Eg. annectans* foi também a única espécie que visitou as oito iscas, tendo explorado, assim como na IS, preferencialmente eucaliptol e eugenol (Tabela 3).

Em relação às outras três espécies abundantes amostradas na RNSM, merecem destaque os seguintes resultados: a) *Eg. iopoecila*, a espécie mais abundante na RNSM, visitou um número maior de fragrâncias ($n=7$) do que na IS ($n = 4$ essências), exibindo um valor de diversidade (H'), na busca por recursos, igual a 1,22. Na RNSM eugenol foi a fragrância mais explorada por esta espécie (Tabela 3); b) *Eg. stellfeldi*, com apenas 20 machos atraídos às iscas, visitou quatro essências. A medida de diversidade de fragrâncias exploradas por esta espécie foi de 1,01 e a estimativa de amplitude de nicho



de 0,17; estas duas medidas estiveram entre as menores encontradas para as quatro espécies analisadas (Tabela 3). Finalmente, *Eg. roderici*, representada apenas por 20 machos na RNSM, assim como na IS visitou preferencialmente iscas de salicilato de metila. A medida de diversidade de fontes exploradas por esta espécie foi de 1,26. Assim como foi observado para as demais espécies, a estimativa de amplitude de nicho obtida para *Eg. roderici* foi inferior (0,25) à de *Eg. annectans* (Tabela 3).

Em relação às estimativas de sobreposição de nicho, as análises revelaram que as menores medidas de sobreposição (PS) envolveram invariavelmente *Eg. roderici*, tanto no caso de IS quanto da RNSM (Tabela 4). As maiores estimativas de sobreposição de nicho em relação à exploração das essências pelas diferentes espécies de Euglossini foram registradas entre *Eg. annectans* e *Eg. iopoecila* (81,7%) e entre *Eg. annectans* e *Eg. stellfeldi* (70,8%) (ambas ocorrendo para a fauna da RNSM). Um padrão similar envolvendo estes dois pares de espécies também foi encontrado na IS (Tabela 4).



Tabela 3. Número de indivíduos e abundância relativa (%) das diferentes espécies de Euglossini amostradas nas áreas de Floresta Ombrófila Densa na Ilha do Superagui (IS) e Reserva Natural Salto Morato (RNSM), município de Guaraqueçaba, estado do Paraná, sul do Brasil. N = número total de machos de cada espécie. (EG=Eugenol, EC= Eucaliptol, BI= Beta-Ionona, SM= Salicilato de Metila, BB= Benzoato de Benzila, VN= vanilina, AB= Acetato de Benzila). Índice de diversidade de Shannon-Wiener (H'), índice de equidade de Pielou (J') e amplitude de nicho ((B_A): referente às diferentes fragrâncias exploradas pelos machos são fornecidos apenas para as quatro espécies mais abundantes nas duas áreas estudadas.

Espécies	N	Essências								B _A	H'	J'	Total de essências visitadas
		EG	EC	BI	SM	BB	VN	CM	AB				
IS													
<i>Euglossa annectans</i>	110	43 (39,1)	19 (17,3)	29 (26,4)	7 (6,4)	4 (3,6)	6 (5,5)	1 (0,9)	1 (0,9)	0,38	1,56 ^a	0,75	8
<i>Euglossa cordata</i>	31	1 (3,2)	18 (58,1)	10 (32,3)	1 (3,2)	-	-	1 (3,2)	-				5
<i>Euglossa iopoecila</i>	63	28 (44,4)	29 (46,1)	4 (6,3)	2 (3,2)	-	-	-	-	0,20	1,00 ^b t=4,77	0,72	4
<i>Euglossa pleosticta</i>	2	-	2 (100)	-	-	-	-	-	-				1
<i>Euglossa roderici</i>	51	2 (3,9)	-	1 (2,0)	35 (68,6)	7 (13,8)	2 (3,9)	4 (7,8)	-	0,14	1,06 ^b t=3,01	0,59	6
<i>Euglossa stellfeldii</i>	97	70 (72,2)	8 (8,2)	12 (12,4)	2 (2,1)	2 (2,1)	3 (3,0)	-	-	0,12	0,97 ^b t=4,29	0,54	6
<i>Euglossa townsendi</i>	3	-	3 (100)	-	-	-	-	-	-				1
<i>Euglossa truncata</i>	1	-	1 (100)	-	-	-	-	-	-				1
<i>Euglossa viridis</i>	4	2 (50,0)	2 (50,0)	-	-	-	-	-	-				2
<i>Eufriesea dentilabris</i>	5	-	4 (80,0)	-	1 (20,0)	-	-	-	-				2
<i>Eulaema cingulata</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	2 (100)				2
<i>Eulaema nigrita</i>	7	-	7 (100)	-	-	-	-	-	-				1
<i>Exaerete smaragdina</i>	2	-	2 (100)	-	-	-	-	-	-				1
Total	378	146	95	56	48	13	11	6	3				8



Continuação da Tab. 3

Espécies	N	Essências								B _A	H'	J'	Total de essências visitadas
		EG	EC	BI	SM	BB	VN	CM	AB				
RNSM													
<i>Euglossa annectans</i>	159	74 (46,5)	32 (20,1)	18 (11,3)	3 (1,9)	13 (8,2)	8 (5,0)	1 (0,6)	10 (6,4)	0,36	1,56 ^a	0,75	8
<i>Euglossa cordata</i>	5	-	3 (60,0)	2 (40,0)	-	-	-	-	-				2
<i>Euglossa fimbriata</i> Rebêlo e Moure, 1996	2	-	2 (100)	-	-	-	-	-	-				2
<i>Euglossa iopoecila</i>	210	100 (47,6)	78 (37,1)	3 (1,4)	3 (1,4)	12 (5,7)	3 (1,4)	-	11 (5,2)	0,24	1,22 ^b t=3,47	0,63	7
<i>Euglossa pleosticta</i>	4	-	4 (100)	-	-	-	-	-	-				1
<i>Euglossa roderici</i>	20	2 (10,0)	2 (10,0)	-	11 (55,0)	1 (5,0)	-	4 (20,0)	-	0,25	1,26 ^b t=1,85	0,78	5
<i>Euglossa stellfeldi</i>	21	13 (61,9)	1 (4,8)	5 (23,8)	-	2 (9,5)	-	-	-	0,17	1,01 ^b t=3,16	0,73	4
<i>Euglossa truncata</i>	1	1 (100)	-	-	-	-	-	-	-				1
<i>Euglossa viridis</i>	19	10 (52,6)	4 (21,1)	-	2 (10,5)	1 (5,3)	2 (10,5)	-	-				5
<i>Eufriesea dentilabris</i>	1	-	-	-	-	-	1 (100)	-	-				1
<i>Eulaema cingulata</i>	6	-	-	1 (17,7)	-	-	-	-	3 (83,3)				2
<i>Eulaema nigrita</i>	15	-	13 (86,7)	-	-	-	2 (13,3)	-	-				2
<i>Exaerete</i> sp	1	-	1 (100)	-	-	-	-	-	-				1
Total	464	200	140	29	19	29	16	5	26				8

H': letras sobrescritas diferentes = valores de $p < 0,05$; letras sobrescritas iguais = valores de $p > 0,05$. Sobrescrito entre parênteses = valores obtidos nas análises em que o teste t revelou diferenças significativas. Estes valores referem-se aos comparativos entre *Euglossa annectans* de cada localidade e as demais três espécies.



Tabela 4. Porcentagem de sobreposição de nicho (tipos de fragrâncias visitadas) entre as quatro espécies mais abundantes de Euglossini em duas áreas de Floresta Ombrófila Densa, localizadas na Ilha do Superagui (diagonal inferior) e Reserva Natural Salto Morato (diagonal superior), município de Guaraqueçaba, estado do Paraná, sul do Brasil. *Eg.* = *Euglossa*.

Espécies	<i>Eg. annectans</i>	<i>Eg. iopoecila</i>	<i>Eg. stelfeldi</i>	<i>Eg. roderici</i>
<i>Eg. annectans</i>	***	81,7	70,8	27,5
<i>Eg. iopoecila</i>	65,9	***	59,5	26,4
<i>Eg. stelfeldi</i>	66,9	61,0	***	19,8
<i>Eg. roderici</i>	20,7	9,1	13,1	***

No caso das amostras da IS, as estimativas de frequência de ocorrência (FO), dominância (D) e categorias envolvendo as essências utilizadas pelas quatro espécies mais abundantes de Euglossini na área estudada, revelaram que eugenol (EG) e eucaliptol (EC) constituíram recursos categorizados como comuns (C) para *Eg. annectans* e *Eg. iopoecila*. Destas duas essências apenas eugenol foi um recurso comum para *Eg. stelfeldi* (Tabela 5). Contudo, para esta espécie, beta-ionona (BI) também foi incluída na categoria de fragrância comum. No caso de *Eg. roderici*, espécie que mostrou as menores porcentagens de sobreposição de nicho com estas três espécies de *Euglossa*, apenas a fragrância salicilato de metila representou um recurso comum no uso por esta espécie. As demais fragrâncias exploradas por *Eg. roderici* se mostraram raras ou incidentais no uso por machos desta espécie (Tabela 5).



Tabela 5. Frequência de ocorrência (FO), dominância (D) e categorias (Ct) das essências de acordo com uso destas pelas quatro espécies mais abundantes de Euglossini na área de Floresta Ombrófila Densa da Ilha do Superagui, município de Guaraqueçaba, estado do Paraná, Brasil. *Eg.* = *Euglossa*. mf = fragrância muito frequente; f = frequente; pf = pouco frequente. d = fragrância dominante; a = acessória; o = ocasional. C = fragrância comum; I = intermediária e R = rara. EG= Eugenol, EC= Eucaliptol, BI= Beta-Ionona, SM= Salicilato de Metila, BB= Benzoato de Benzila, VN= vanilina, AB= Acetato de Benzila.

Essências	<i>Eg. annectans</i>			<i>Eg. iopoecila</i>			<i>Eg. stellfeldi</i>			<i>Eg. roderici</i>		
	FO	D	Ct	FO	D	Ct	FO	D	Ct	FO	D	Ct
EG	mf	d	C	mf	d	C	mf	d	C	pf	a	I
EC	mf	d	C	mf	d	C	pf	d	I	-	-	-
BI	f	d	I	pf	d	I	mf	d	C	pf	o	R
SM	f	d	I	pf	a	R	pf	o	R	mf	d	C
BB	f	a	I	-	-	-	pf	o	R	pf	o	R
VN	pf	d	I	-	-	-	pf	a	I	pf	o	R
CM	pf	o	R	-	-	-	-	-	-	pf	a	I
AB	pf	o	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4. Discussão

Em relação à exploração do conjunto de oito fragrâncias disponibilizadas às abelhas das orquídeas nas duas áreas de Floresta Ombrófila Densa (IS e RNSM), os resultados obtidos no presente trabalho apontam para diferenças relevantes entre as espécies, com algumas das quatro espécies mais abundantes se comportando de maneira mais generalista que outras na exploração das essências disponíveis. O fato de *Eg. annectans* ter mostrado, nestas duas áreas de estudo, um nicho mais amplo na ‘escolha’ das essências químicas visitadas por seus machos e de ter explorado uma diversidade (H’) significativamente maior de fragrâncias que as outras três espécies mais abundantes, é um resultado fortemente sugestivo de que esta espécie se comporta de forma mais generalista na busca de recursos químicos disponíveis.

Viotti et al. (2013) chamam a atenção para diferenças nos padrões de exploração de recursos pelo conjunto de espécies de abelhas Euglossini amostradas em uma área de campo rupestre no sudeste do Brasil, reconhecendo algumas espécies, a exemplo de *Eg. stellfeldi*, *Eg. melanotricha* Moure e *Eg. leucotricha* Rebêlo e Moure, como mais ‘generalistas’ que outras na exploração de fragrâncias. Na verdade, ao se analisar os resultados obtidos por diferentes autores, este parece ser um padrão dentro da tribo (ex.



Janzen et al., 1982; Pearson e Dressler, 1985; Ackerman, 1989; Cordeiro et al., 2013; Nemésio e Rasmussen, 2014).

Particularmente no caso de *Eg. annectans*, em consonância com os resultados do presente estudo, outros autores também registraram o uso de uma ampla gama de fragrâncias químicas por machos desta espécie (Nemésio e Silveira, 2007; Cordeiro et al., 2013). Interessantemente, no caso destes dois estudos, chama atenção o fato que este modo de explorar as fontes disponíveis foi registrado tanto em áreas de FOD (Cordeiro et al., 2013), quanto para remanescentes de Floresta Estacional Semidecidual (Nemésio e Silveira, 2007), sugerindo que este poderia ser um comportamento padrão para esta espécie, independente do tipo de ecossistema onde esta espécie é encontrada.

Além disto, no presente trabalho, o fato de *Eg. annectans* ter explorado de forma similar o mesmo conjunto de oito fragrâncias nas duas áreas de FOD na região de Guaraqueçaba, explorando nestas duas áreas predominantemente as iscas de eugenol, mas também de forma consistente as fragrâncias de eucaliptol e beta-ionona em ambas as áreas, mesmo em amostragens realizadas em períodos distintos, sugere uma maior atratividade destas três essências para esta espécie, pelo menos para a região estudada. Contudo, chama a atenção que ao longo dos três anos de amostragem na IS, este comportamento mais generalista de *Eg. annectans* esteve restrito aos dois últimos anos de amostragens. De qualquer modo, vale destacar que eugenol foi um recurso quase que constante para esta espécie, tendo sido coletado por machos de *Eg. annectans* em 12 das 15 amostragens realizadas na Ilha. Tal resultado também explica o fato de eugenol ter se mostrado como uma fragrância muito frequente e dominante e, portanto, considerada comum para esta espécie. Embora resultado similar tenha sido encontrado em relação ao eucaliptol, esta fragrância apesar de ter se mostrado uma substância comum para *Eg. annectans*, machos desta espécie foram coletados em iscas de eucaliptol apenas em oito das 15 amostragens. Dentre os poucos estudos disponíveis na literatura, nos quais *Eg. annectans* foi coletada em um número mais representativo de indivíduos ($n = 44$) e que discriminam a abundância desta abelha nas diferentes fragrâncias, Cordeiro et al. (2013) também identificaram uma maior atratividade de machos desta espécie por eugenol (56,8%) e eucaliptol (36,4%). Em outro estudo realizado na APA de Guaraqueçaba, aparece novamente como uma importante fragrância para *Eg. annectans*, mas neste caso, atraindo quase que exclusivamente (84,8%) os machos desta espécie coletados na área estudada (Mattozo et al., 2011).



Além de *Eg. annectans*, ao se analisar as ‘escolhas’ das diferentes espécies dentro do conjunto de iscas a estas disponibilizadas, fica também evidente que existe uma maior atratividade espécie-específica, corroborando os resultados obtidos por diferentes autores (Janzen et al., 1982; Pearson e Dressler, 1985; Ackerman 1989; Storck-Tonon et al., 2009; Cordeiro et al., 2013; Viotti et al., 2013; Nemésio e Rasmussen, 2014; Rocha-Filho e Garófalo, 2014). Por exemplo, no caso de *Eg. iopoecila*, assim como observado no presente estudo para as áreas de FOD da IS e da RNSM, Rocha-Filho e Garófalo (2014) demonstraram uma maior atratividade de machos desta espécie por eugenol e eucaliptol, em um estudo realizado também em um remanescente de FOD no *Corredor de Biodiversidade da Serra do Mar (CBSM)*, uma das áreas remanescentes de Mata Atlântica reconhecidas por sua alta biodiversidade (Galindo-Leal e Câmara, 2005). Ao retirar estas duas fragrâncias do conjunto de substâncias disponível às abelhas, estes autores conseguiram atrair apenas dois machos desta espécie, apesar da mesma espécie ter sido a mais abundante (n= 214) em número de indivíduos amostrados na área estudada no período no qual eugenol e eucaliptol foram utilizados nas amostragens (Rocha-Filho e Garófalo, 2014). Em outros dois estudos realizados em remanescentes de Mata Atlântica do CBSM, eugenol e eucaliptol também atraíram mais de 80% dos machos de *Eg. iopoecila* amostrados nestas áreas (Mattozo et al., 2011; Cordeiro et al., 2013), resultado este similar ao encontrado no presente trabalho tanto para IS quanto para a RNSM. Estes resultados sugerem que, pelo menos para áreas de FOD do CBSM, estas duas essências estão entre as substâncias químicas mais atrativas para esta espécie e que estas devem, provavelmente, compor o *blend* de fragrâncias usadas por machos de *Eg. iopoecila* na região.

Embora seja difícil explicar as causas que resultaram na variação do número de fragrâncias visitadas por *Eg. iopoecila* na IS (n=4) e na RNSM, algumas suposições podem ser levantadas. Em primeiro lugar, não se pode descartar aqui que o menor número de fragrâncias visitadas na IS esteja, de algum modo, relacionado ao menor número de machos desta espécie amostrados neste local. Ou seja, neste caso, deve ser levado em consideração quem amostras constituídas por um maior número de machos são, potencialmente, maiores as chances de se amostrar alguns indivíduos em um número maior de fragrâncias, se estas fizerem parte, mesmo em uma menor frequência, do conjunto de substâncias usadas na composição do *blend* final da espécie. Algo similar aconteceu para *Eg. stellfeldti*, espécie que teve, no caso, um maior número de machos amostrados na IS do que na RNSM, e que, do mesmo modo que *Eg. iopoecila*,



visitou uma maior riqueza de fragrâncias na área onde foi mais abundante (ver Tabela 3). Por outro lado, *Eg. roderici* que teve um número bem maior de machos amostrados na IS (n= 51) do que na RNSM (n=20), visitou apenas uma fragrância a mais na primeira área (n=6) do que na segunda, e mesmo assim em uma frequência muito baixa (2%). Assim, outros fatores devem também ser considerados como causas prováveis para as diferenças encontradas nas “escolhas” das espécies nas diferentes áreas. De fato, já foi demonstrado que uma mesma espécie pode apresentar diferenças no uso na exploração de essências em diferentes localidades (Janzen et al., 1982; Pearson e Dressler, 1985; Ackerman, 1989; Ramírez et al., 2010; Rocha-Filho e Garófalo, 2014) ou em diferentes estações do ano (Ackerman, 1989; Abrahamczyk et al., 2012). Alguns fatores têm sido apontados como prováveis causas das diferenças encontradas em relação às escolhas de diversas espécies de machos euglossíneos, entre estes estão, variações sazonais na idade da população (Ackerman, 1989) e influência do clima sobre a produção ou *turnover* das substâncias aromáticas pelas plantas (Abrahamczyk et al., 2012). Ackerman (1989) argumenta que, além das diferenças na idade das populações, diferenças genéticas das populações também podem ser atribuídas às diferenças geográficas encontradas. Apesar de tais diferenças entre populações de uma espécie reconhecidamente existirem, Ramírez et al. (2010) constataram, para a espécie *Euglossa* aff. *viridissima* Friese, que a maior parte das substâncias aromáticas (componentes químicos) individuais é mantida mesmo em populações de localidades geograficamente distantes e de habitats distintos. Paralelamente, estes autores também observaram que alguns dos componentes principais podem estar ausentes. Tais resultados explicariam as diferenças encontradas para algumas espécies do presente estudo.

Nemésio (2012) chama a atenção para o fato do uso do termo “escolha do bouquet” pelas diferentes espécies, lembrando que as mesmas estão explorando o conjunto de fragrâncias escolhido pelo pesquisador. Deste modo, deve-se ressaltar que a discussão realizada no presente estudo está levando em consideração apenas o conjunto de substâncias utilizadas neste trabalho. De qualquer modo, das oito fragrâncias utilizadas aqui, sete foram reconhecidas por Ackerman (1983) como potencialmente mais atrativas aos machos da maioria das espécies de Euglossini na área estudada, lembrando que este autor testou 16 essências em seu estudo, oito das quais foram pouco atrativas para as diferentes espécies. Além disto, deve-se destacar que cinco das oito fragrâncias utilizadas no presente estudo, estão entre os maiores constituintes do



conjunto de substâncias químicas presentes nas orquídeas visitadas por Euglossini na região Neotropical (Dodson et al., 1969; Williams e Dodson, 1972).

Encontra-se, há longa data, estabelecido que existem diferenças interespecíficas na preferência e na escolha dos recursos. Ackerman (1989), em seu estudo realizado no Panamá, observou que, embora tenha ocorrido uma sobreposição nas escolhas das substâncias coletadas pelas diferentes espécies, cada espécie tem um conjunto único de fragrâncias que a mesma explora. Tal resultado também foi verificado no presente estudo. Em particular, a sobreposição na exploração de algumas fragrâncias químicas, principalmente eugenol, eucaliptol e beta-ionona mais intensamente visitadas por *Eg. annectans*, *Eg. iopoecila* e *Eg. stellfeldi*, explica, em parte, as maiores medidas de sobreposição de nicho entre estas três espécies. Do mesmo modo, a maior atratividade de *Eg. roderici* por salicilato de metila, parece responder pela baixa sobreposição de nicho desta espécie com as outras três mais abundantes. Em especial para *Eg. roderici*, a relação “espécie-específica” entre esta espécie de Euglossini e a essência salicilato de metila é evidente, tendo sido observada tanto para a área de Mata Atlântica da IS, quanto para a área da RNSM. De forma similar, esta essência aparece sempre como uma fonte de recurso importante para machos de *Eg. roderici* em outros estudos realizados em remanescentes de Mata Atlântica do CBSM (Mattozo et al., 2011; Cordeiro et al., 2013; Rocha-Filho e Garófalo, 2014). A nítida maior atratividade desta espécie por salicilato de metila detectada especialmente na área de FOD da IS, onde esta fragrância atraiu quase 70% dos machos amostrados, é responsável, pelo menos em parte, pelo valor inferior de diversidade encontrado para esta espécie na IS ($H' = 1,06$) em comparação com o observado para a população da RNSM ($H' = 1,26$), onde esta espécie visitou uma fragrância a menos ($n=5$) que na Ilha do Superagui ($n=6$).

Tem sido proposto que existe um *feedback* negativo de compostos já coletados pelos machos direcionando as futuras escolhas de compostos a serem coletados por tais machos e que irão compor o conjunto de fragrâncias ou *blends*, os quais por sua vez, serão usados por estes machos durante o comportamento de corte (Eltz et al., 2005a; Pokorny et al., 2013). Além disto, já foi demonstrado que machos mais velhos apresentam maiores quantidades de compostos e uma mistura mais complexa destes, armazenados em suas pernas (Eltz et al., 2015). No presente estudo, como nenhum acompanhamento foi feito ao longo do tempo sobre as visitas de um mesmo macho a diferentes essências, nem tampouco foram feitas análises químicas dos compostos armazenados nas pernas dos machos, procedimento este que tem sido empregado por



alguns autores (Pokorny et al., 2013; Eltz et al., 2015), não se pode fazer qualquer inferência sobre tais aspectos em relação aos machos aqui amostrados. De qualquer modo, ao se analisar os dados obtidos para cada espécie ao longo dos cinco meses de amostragem de cada período de estudo, vale a pena destacar que para todas as quatro espécies analisadas não se observou qualquer interrupção ou declínio evidente de uso de qualquer fragrância. É conhecido que enquanto machos jovens, recém emergidos, buscam por fragrâncias para se abastecerem das mesmas, machos mais velhos (com maior desgaste alar) continuam a ser atraídos às iscas-odores, provavelmente, para se reabastecer de essências (Zimmermann e Madriñan, 1988). Assim, é possível supor que o uso das diferentes fragrâncias seja continuado, o que explicaria os resultados obtidos para as quatro principais espécies amostradas na IS, as quais exploraram suas fontes de recursos de forma mais ou menos constante.

Para finalizar, deve-se ressaltar aqui que este é um dos poucos trabalhos a analisar a similaridade, amplitude e sobreposição de nichos de compostos químicos usados por Euglossini. Os resultados deste estudo, além de adicionar informações relevantes para um maior conhecimento de aspectos biológicos envolvendo quatro espécies de Euglossini endêmicas à Mata Atlântica, sendo uma destas (*Eg. roderici*) considerada de elevado endemismo a este bioma (Nemésio, 2009; Moure et al., 2012), tais resultados abrem novas possibilidades de abordagens ecológicas envolvendo este grupo Neotropical tão interessante e peculiar de abelhas.



5. Referências

- Abrahamczyk, S., Gottleuber, P., Kessler, M., 2012. Seasonal changes in odour preferences by male euglossine bees (Hymenoptera: Apidae) and their ecological implications. *Apidologie* 43, 212–217.
- Ackerman, J.D., 1983. Diversity and seasonality of male euglossine bees (Hymenoptera: Apidae) in Central Panama. *Ecology* 64, 274–283.
- Ackerman, J.D., 1989. Geographic and seasonal variation in fragrance choice and preferences of male euglossine bees. *Biotropica* 21, 340–347.
- Cappellari, S.C., Harter-Marques, B., 2010. First report of scent collection by male orchid bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) from terrestrial mushrooms. *J. Kansas Entomol. Soc.* 83, 264–266.
- Cordeiro, G.D., Boff, S., Caetano, T.A., Fernandes, P.C., Alves-dos-Santos, I., 2013. Euglossine bees (Apidae) in Atlantic forest areas of São Paulo State, southeastern Brazil. *Apidologie* 44, 254–267.
- Dodson, C.H., Hills, H.G., 1966. Gas chromatography of orchid fragrances. *Am. Orch. Soc. Bull.* 35, 720–725.
- Dodson, C.H., Dressler, H.G., Hills, R.M., Adams, R.M., Williams, N.H., 1969. Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science* 164, 1243–1249.
- Dressler, R.L., 1982. Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 13, 373–394.
- Dressler, R.L., 1968. Observations on orchids and euglossine bees in Panama and Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 15, 143–183.
- Dressler, R.L., 1982. Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 13, 373–394.
- Eltz, T., Whitten, M.W., Roubik, D.W., Linsenmair, K.E., 1999. Fragrance collection, storage and accumulation by individual male orchid bees. *J. Chem. Ecol.* 25, 157–176.
- Eltz, T., Roubik, D.W., Whitten, W.M., 2003. Fragrances, male display and mating behaviour of *Euglossa hemichlora*: a flight cage experiment. *Phys. Entomol.* 28, 251–260.
- Eltz, T., Roubik, D.W., Lunau, K., 2005a. Experience-dependent choices ensure species-specific fragrance accumulation in male orchid bees. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 59, 149–156.



- Eltz, T., Sager, A., Lunau, K., 2005b. Juggling with volatiles: exposure of perfumes by displaying male orchid bees. *J. Comp. Physiol. A.* 191, 575–581.
- Eltz, T., Ayasse, M., Lunau, K., 2006. Species-specific antennal response to tibial fragrances in male orchid bees. *J. Chem. Ecol.* 32, 71–79.
- Eltz, T., Zimmermann, Y., Haftmann, J., Twele, R., Francke, W., Quezada-Euan, J. J. G., Lunau, K., 2007. Enfleurage, lipid recycling and the origin of perfume collection in orchid bees. *Proc. Royal. Soc. B. Biol. Sci.* 274, 2843–2848.
- Eltz, T., Bause, C., Hund, K., Quezada-Euan, J.J.G., Pokorny, T. 2015. Correlates of perfume load in male orchid bees. *Chemoecology* 1-7.
- Galindo-Leal, C., Câmara, I.G. (2005). *Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas*. Fundação SOS Mata Atlântica. Conservação Internacional, São Paulo.
- Giangarelli, D.C., Freiria, G.A., Colatreli, O.P., Suzuki, K.M., Sofia, S.H., 2009. *Eufriesea violacea* (Blanchard) (Hymenoptera: Apidae): an orchid bee apparently sensitive to size reduction in forest patches. *Neotrop. Entomol.* 38, 1-6.
- Giangarelli, D.C., 2011. Comunidade de abelhas Euglossini de dois remanescentes de Mata Atlântica do estado do Paraná. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- Giangarelli, D.C., Aguiar, W.M., Sofia, S.H., 2015. Orchid bee (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) assemblages from three different threatened phytophysiognomies of the subtropical Brazilian Atlantic Forest. *Apidologie* 46, 77-83.
- Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleont. Electron.* 4, 1-9.
- ICMBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade)., 1997. Relatório Parametrizado - Unidade de Conservação: Parque Nacional do Superagui. Versão online: <http://sistemas.mma.gov.br>. Acessado em 22/03/2015.
- IPARDES (Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social). 2001. Zoneamento da Area de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba/ Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico Social. Curitiba.
- Janzen, D.H., Devries, P.J., Higgins, M.L., Kimsey, L.S., 1982. Seasonal and site variation in Costa Rica euglossine bees at chemical baits in lowland deciduous and evergreen forest. *Ecology* 63, 66–74.



- Krebs, C.J., 2013. Population Fluctuations in Rodents. The University of Chicago Press, Chicago.
- MMA (Ministério Do Meio Ambiente), 2007. Mapa das áreas prioritárias. <http://www.mma.gov.br>. (Acessado em 06/05/2014).
- Nemésio, A., 2012. Methodological concerns and challenges in ecological studies with orchid bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossina). *Biosci. J.* 28, 118-135.
- Nemésio, A., Silveria, F.A., 2007. Orchid Bee Fauna (Hymenoptera: Apidae: Euglossina) of Atlantic Forest Fragments inside an Urban Area in Southeastern Brazil. *Neotrop. Entomol.* 36, 186-191.
- Nemésio, A., Rasmussen, C., 2014. Sampling a biodiversity hotspot: the orchid-bee fauna (Hymenoptera: Apidae) of Tarapoto, northeastern Peru, the richest and most diverse site of the Neotropics. *Braz. J. Biol.* 74, S33-S44.
- Passos, F.C., Graciolli, G. (2004) Observações ações da dieta de *Artibeus lituratus* (Olfers) (Chiroptera, Phyllostomidae) em duas áreas do sul do Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 21, 487-489
- Pearson, D.L., Dressler, R.L., 1985. Two-year study of male Orchid Bee (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) attraction to chemical baits in lowland South-Eastern Peru. *J. Trop. Ecol.* 1, 37-54.
- Pedroso-Junior, N.N., Sato, M., 2005. Ethnoecology and conservation in protected natural areas: incorporating local knowledge in Superagui National Park management. *Braz. J. Biol.* 65, 117-127.
- Pereira, L.M.P., Caramori, P.H., Ricce, W.S., Silva, D.A.B., Caviglione, J.H., 2008. Determinação do início e término da estação chuvosa no estado do Paraná. *Rev. Geografar* 3,01-12.
- Pokorny, T., Hannibal, M., Quezada-Euan, J.J.G., Hedenström, E., Sjöberg, N., Bång, J., Eltz, T., 2013. Acquisition of species-specific perfume blends: influence of habitat-dependent compound availability on odour choices of male orchid bees (*Euglossa* spp.). *Oecologia* 172, 417–425.
- Ramalho, A.V., Gaglianone, M.C., Oliveira, M.C., 2009. Comunidades de abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em fragmentos de Mata Atlântica no Sudeste do Brasil. *Rev. Bras. Entomol.* 53, 95-10.
- Ramirez, S.R., Eltz, T., Fritsch, F., Pemberton, R., Pringle, E.G., Tsutsui, N.D. 2010. Intraspecific Geographic Variation of Fragrances Acquired by Orchid Bees in Native and Introduced Populations. *J. Chem. Ecol.* 36, 873–884.



- Rocha-Filho, L.C., Garófalo, C.A., 2014. Phenological Patterns and Preferences for Aromatic Compounds by Male Euglossine Bees (Hymenoptera, Apidae) in Two Coastal Ecosystems of the Brazilian Atlantic Forest. *Neotrop. Entomol.* 43, 9-20.
- Roubik, D.W., Hanson, P.H., 2004. Orchid bees of tropical America, 1st edn. INBio, Santo Domingo de Heredia, Costa Rica.
- Schmidlin, L.A.J., Accioly, A., Accioly, P., Kirchner, F.F., 2005. Mapeamento e caracterização da vegetação da ilha de Superagüi utilizando técnicas de geoprocessamento. *Rev. Floresta*, 35, 303-315.
- Siegel, S., 1981. Estatística não-paramétrica: Para as ciências do comportamento. Ed. McGraw-Hill do Brasil. São Paulo.
- Storck-Tonon, D., Morato, E.F., Oliveira, M.L., 2009. Fauna de Euglossina (Hymenoptera: Apidae) da Amazônia Sul-Ocidental, Acre, Brasil. *Acta Amaz.* 39, 693-706.
- Vivekananda, G., 2001. Parque Nacional do Superagui: a presença humana e os objetivos de conservação. Dissertação de Mestrado Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Viotti, M.A., Moura, F.R., Lourenço, A.P., 2013. Species diversity and temporal variation of the Orchid-Bee fauna (Hymenoptera, Apidae) in a conservation gradient of a rocky field area in the Espinhaço range, state of Minas Gerais, Southeastern Brazil. *Neotrop. Entomol.* 42, 565–575.
- Whitten, W.M., Young, A.M., Williams, N.H., 1989. Function of glandular secretions in fragrance collection by male euglossine bees (Apidae: Euglossini). *J. Chem. Ecol.* 15, 1285-1295.
- Whitten, M.W., Young, A.M., Stern, D.L., 1993. Non floral sources of chemicals that attract male euglossine bees (Apidae: Euglossini). *J. Chem. Ecol.* 19, 3017–3027.
- Williams, N.H., Dodson, C.H., 1972. Selective attraction of male euglossine bees to orchid floral fragrances and its importance in long distance pollen flow. *Evolution* 26, 84–95.
- Zar, J.H., 1996. Biostatistical analysis. 3th ed. McElroy, W.D., Swanson, C.P (eds.). New Jersey, USA, Prentice-Hall INC, Englewood Cliffs.
- Zimmermann, Y., Ramírez, S.R., Eltz, T., 2009. Chemical niche differentiation among sympatric species of orchid bees. *Ecology* 90, 2994–3008.



Capítulo 3

Orchid bees: a new assessment on the rarity of diploid males in populations of this group of Neotropical pollinators

Douglas C. Giangarelli, Gabriele A. Freiria, Dhiego G. Ferreira,
Willian M. Aguiar, Rafael E.S. Penha, Alessandra N. Alves, Maria
C. Gaglianone, Silvia H. Sofia

Trabalho publicado no periódico Apidologie



Orchid bees: a new assessment on the rarity of diploid males in populations of this group of Neotropical pollinators

Douglas C. Giangarelli^{1,2}, Gabriele A. Freiria^{1,3}, Dhiego G. Ferreira^{1,3}, Willian M. Aguiar^{4,5}, Rafael E.S. Penha^{1,3}, Alessandra N. Alves^{1,3}, Maria C. Gaglianone⁴, Silvia H. Sofia^{1,*}

¹Laboratório de Genética e Ecologia Animal, Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rod. Celso Garcia Cid, km 380, CP 10.011, 86057-990, Londrina, PR, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, UEL

³Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UEL

⁴Laboratório de Ciências Ambientais, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

⁵Universidade Estadual de Feira de Santana. Av. Transnordestina, s/n, Novo Horizonte, 44036-900 - Feira de Santana, BA - Brazil

Short title: Diploid males in orchid bee populations



Abstract

The incidence of diploid males among 1457 individuals of different populations of six euglossine bee species (*Eufriesea violacea*, *Eulaema cingulata*, *Euglossa annectans*, *Euglossa iopoecila*, *Euglossa pleosticta* and *Euglossa truncata*) was investigated with microsatellite markers. Bees were surveyed in Atlantic Forest fragments showing different sizes and degrees of human interference. Our analyses revealed that, although the frequencies of diploid males remained below 10% for five out of six species studied, the frequencies of these males in three populations of *Eg. annectans* were above 15.0%. For this species, while the average estimate of diploid males was around 11.0%, the highest percentage (27%) of such males was found for the population from an island. Our findings indicate that the frequency of diploid males can vary substantially among species and this fact should be taking into consideration in studies and conservation actions involving different euglossine bees.

microsatellites / Euglossini / euglossine bees / *Euglossa annectans* / forest fragments



1. INTRODUCTION

Bees and other hymenopteran insects are characterized by haplodiploidy, with arrhenotokous parthenogenesis as the common mode of reproduction (Cook, 1993; Harpur et al. 2013). Among these insects, sex is determined by ploidy, by which unfertilized eggs develop into haploid males and fertilized eggs usually develop into diploid females (Cook, 1993; Cook and Crozier, 1995; Harpur et al. 2013)

At genic level, the single locus complementary sex determination (sl-CSD), which depends on allelic variation at a sex locus, is one of several mechanisms of sex determination in hymenopterans. Considered widespread in bees, sl-CSD is present among social and non-social bees (van Wilgenburg et al. 2006; Zayed et al. 2004, Zayed, 2009). Heterozygotes at the CSD locus develop into diploid females; however, when homozygous at this locus, instead of females, diploid males (2N males) are produced from fertilized eggs (Unruh and Messing, 1993; Zayed et al. 2004; van Wilgenburg et al. 2006). Although, several recent studies have shown that 2N males are viable (Cowan and Stahlhut, 2004; Elias et al. 2009; Harpur et al. 2013), they usually exhibit low fitness (Unruh and Messing, 1993) and are thus considered very costly to populations of haplo-diploid insects (Crozier, 1977; Unruh and Messing, 1993; Beye et al. 2004; Heimpel and de Boer, 2008; Zayed, 2009; Harpur et al. 2013). In addition, considering that for each diploid male produced a functional female ceases to be raised, diploid males inflict a significant cost on the reproductive success of their parents (Unruh and Messing, 1993; Zayed and Packer, 2005; Zayed, 2009).

In bees, diploid males have been observed in four families and in at least 27 species of both solitary and social bees (Zayed, 2009). In the last two decades, several studies have investigated the frequency of diploid males in Euglossini (Roubik et al. 1996; Zayed et al. 2004; López-Uribe et al. 2007; Souza et al. 2010), a Neotropical group of bees popularly known as orchid bees considered to be important pollinators throughout the tropical Americas (Dressler, 1982; Roubik and Hanson, 2004).

Roubik et al. (1996) reported high frequencies of these males in populations of some species of Euglossini (e.g. *Euglossa imperialis* Cockerell) in Panama. This finding was corroborated by a second study that showed high levels of diploid male production and low effective population sizes (Zayed et al. 2004). Both of these studies were based on allozyme analyses (Roubik et al. 1996; Zayed et al. 2004), as was a study carried out by Takahashi et al. (2001), which found very different results. More recently, Souza et al. (2010), using microsatellite markers, analysed 1010 euglossine males, belonging to



27 different species across the Neotropics, and also detected very low frequencies of 2N males for all samples studied. Based on their findings, Souza et al. (2010) suggested that diploid males are rare in orchid bees. However, it should be noticed that about 50% of the species surveyed by Souza et al. (2010) were represented by a restricted number of individuals ($n < 20$) in the samples analysed. Thus, further studies involving larger samples would be interesting to confirm whether diploid males are in fact rare among orchid bees and if this hypothesis can be generalized for the group.

Some euglossine species are apparently sensitive to environmental disturbances (Powell and Powell, 1987; Tonhasca et al. 2002; Giangarelli et al. 2009; Nemésio, 2013), such as forest fragmentation and reduction in fragment size (Powell and Powell, 1987; Sofia and Suzuki, 2004; Giangarelli et al. 2009). Apart from reductions in the abundance of orchid bees in forest fragments of reduced size, studies have shown that some species may have stronger dispersal limitations in fragmented landscapes, and the type of matrix may also affect the dispersal of some species of the group differently (Powell and Powell, 1987; Milet-Pinheiro and Schindwein, 2005).

Considering that declines in bee populations could result in genetic diversity loss (Cook, 1993; Zayed, 2009) and that in euglossine bees, the sl-CSD system has been proposed as the sex-determining mechanism for different species of this group of bees (Zayed et al. 2004; Van Wilgenburg et al. 2006; Souza et al. 2010), it would be expected that in small populations of these bees, a higher frequency of 2N males should occur (Zayed et al. 2004; Zayed, 2009). Despite this, to date, information regarding diploid male frequency in forest fragment showing different sizes and/or different degrees of disturbance is still scarce in the literature. Aiming to provide some information concerning this issue, the current study investigated the frequency of diploid males in populations of six species of orchid bees in Atlantic Forest fragments with different sizes and levels of preservation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Study areas

The 29 study sites where euglossine bees were collected are distributed throughout five different Brazilian states (Figure 1) located in southern and south-eastern Brazil as follows: in the southern region [States of Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), and Paraná (PR)]; and in the south-eastern region [States of São Paulo (SP) and Rio de Janeiro (RJ)]. The study sites consisted of areas that have



different types of vegetation and degrees of preservation (Table I). Bees were sampled in remnants of dense forest (DF), seasonal semi-deciduous forest (SF) and *Araucaria* mixed forest (MF), which represent important types of Atlantic Forest ecosystems, located in private and governmental areas. Also, a few forest fragments located in urban areas, one of them representing a governmental park (AT), were also surveyed for euglossine bees (Table I). The number of sites where bees were collected varied from four (*Eg. truncata*) to nine (*El. cingulata*).



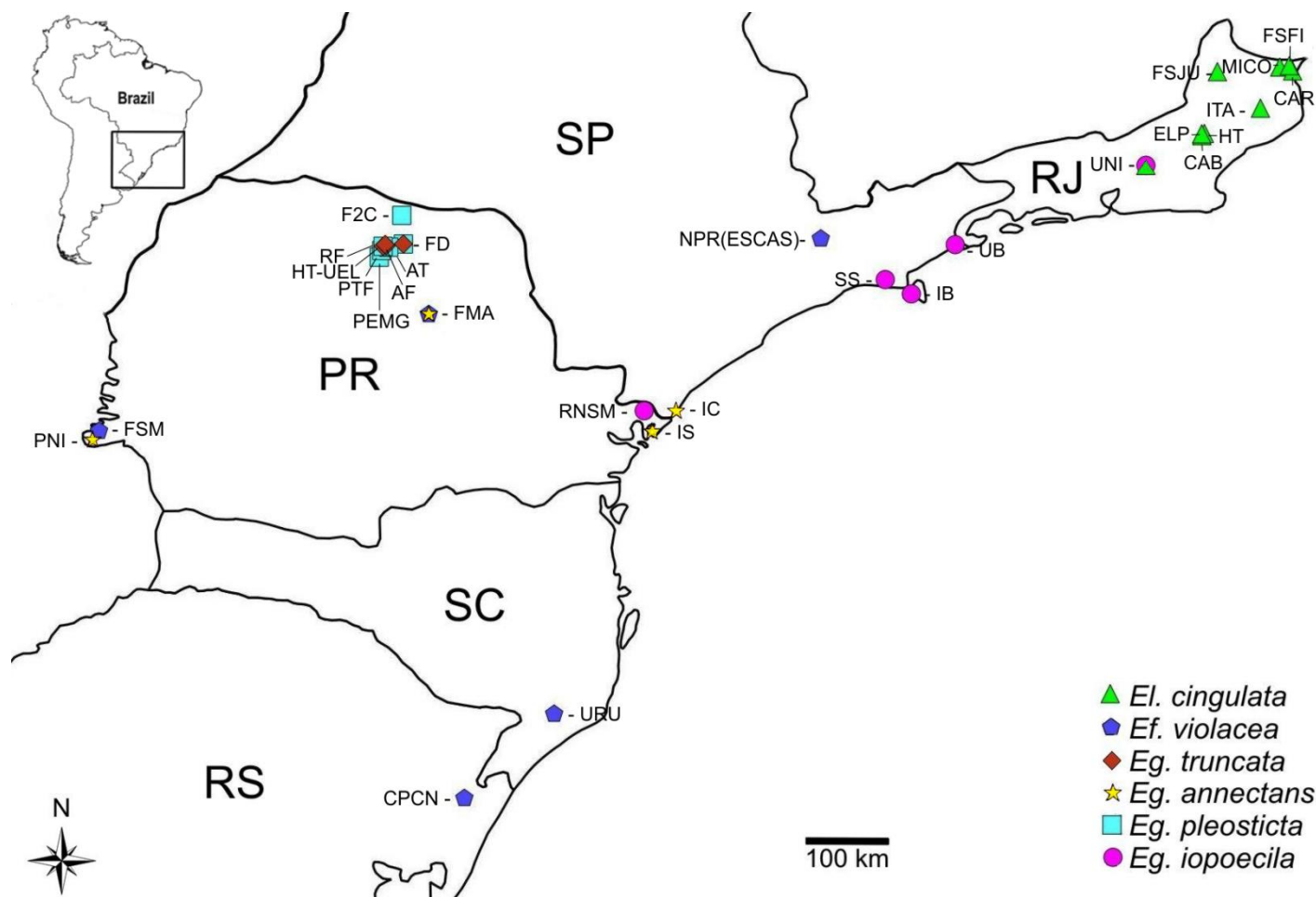


Figure 1. Map of Brazil, in South America, in detail, the 29 localities distributed in five Brazilian states (RS=Rio Grande do Sul, SC=Santa Catarina, PR=Paraná, SP=São Paulo and RJ=Rio de Janeiro) where males of the species *Eufriesea violacea*, *Eulaema cingulata*, *Euglossa annectans*, *Euglossa pleosticta*, *Euglossa iopoecila* and *Euglossa truncata* were sampled. Additional information on the 29 study sites, herein represented by codes (FSM, PEMG, FMA, ESCAS, CPCN, URU, CAB, UNI, ITA, FSJU, HT, MICO, CAR, ELP, FSFI, FD, F2C, PTF, AT, HT-UEL, RNSM, IS, PNI, IC, SS, IB, UB, AF and RF) are presented in Table I.



While some study areas had very well preserved native vegetation characterized by large areas with primary forest, others were forest fragments with vegetation in different stages of regeneration (mainly ranging from intermediate to advanced successional stages), referred to as ‘secondary forests’. Thus, in an attempt to characterize all of these areas, they were classified in one of three main categories of degree of disturbance: low, medium and high. For these three categories we took into consideration both the vegetation successional stage and the level of anthropogenic disturbance of the area.

2.2 Bee sampling

The analysis involved males of six species [*Eufriesea violacea* (Blanchard), *Eulaema cingulata* Fabricius, *Euglossa annectans* Dressler, *Euglossa iopoecila* Dressler, *Euglossa pleosticta* Dressler and *Euglossa truncata* Rebêlo and Moure] which are strongly associated with the Atlantic Forest (Nemésio and Silveira, 2007; Nemésio, 2009; Mattozo et al. 2011). Hereafter in the text the following abbreviations are used for different genera and commonly employed in studies on Euglossini: *Ef.* = *Eufriesea*; *Eulaema* = *El.* and *Eg.* = *Euglossa*.

Males were collected in different forest fragments in the states of Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul (Table I, Figure 1). Other descriptions of the areas of the sampling sites are showed in Table I.



Table I. Name of the six euglossine species surveyed, number of polymorphic microsatellite loci analysed (N_L), collection site, characterization of the 29 forest fragments sampled for orchid bees [including the following information: size (in hectare), type of vegetation, degree of disturbance and type of the surrounding matrix, private or governmental reserve], number of males analysed (n males), observed number of diploid males (2N males), expected heterozygosity (He), probability of a male, if diploid, being heterozygous for at least one polymorphic locus (P_{het}), probability of detecting a diploid males per locality adjusted for putative null alleles ($P_{het-null}$), number of diploid males. He_{iL} = intralocus heterozygosity; He_p = heterozygosity per population. Brazilian States of Paraná (PR), São Paulo (SP), Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) and Rio de Janeiro. FDM = Frequency of diploid males. 95% CI = confident interval of FDM.

Bee species (N_L) and Collection site	Size (ha)	Vegetation type	Type of reserve (degree of disturbance/ surrounding matrix)	2N/n males	FDM (95% CI)	He_p	He_{iL}	P_{het}	null alleles	$P_{het-null}$
^F <i>Eufriesea violacea</i> ($N_L = 6$)										
FSM - 25°25'S 54°25'W - PR	280	SF	Private reserve (medium to high/matrix: pastures and agricultural area)	2/53	0.0377 (0.005-0.130)	0.74	0.59-0.82	0.99974	2	0.999547
PEMG* - 23°27'S 51°14'W - PR	2,200	SF	Governmental reserve (low; matrix: pasture and agricultural areas)	1/60	0.0167 (0.0004-0.090)	0.70	0.53-0.84	0.99975	1	0.998804
FMA - 24°12'42"S 50°33'04"W - PR	217	SF	Private (medium/ reforested areas of <i>Pinus</i> and <i>Eucalyptus</i>)	3/60	0.0500 (0.010-0.140)	0.73	0.57-0.86	0.99976	1	0.999244
NPR (ESCAS) - 23°14'S 46°20'W - SP	2,809	SF	Private (medium/reforested areas of <i>Pinus</i>)	0/60	-	0.72	0.53-0.83	0.99968	10	0.995822
^C <i>Eufriesea violacea</i> ($N_L = 6$)							>			0.999430
^U							0.999			0.999646
^T										0.998296
FSM - 25°25'S 54°25'W - PR	280	SF	Private reserve (medium to high/matrix: pastures and agricultural area)	2/53	(0.008-0.040)				2	0.05
<i>Eulaema cingulata</i> ($N_L = 7$)										
CAB - 22°05'51"S 42°05'38"W - RJ	870	DF	Private reserve (medium/pastures, <i>Eucalyptus</i> and banana plantation)	0/40	-	0.64	0.23-0.80	0.99972	6	0.99869
UNI* - 22°25'44"S 42° 42'59"W - RJ	3,600	DF	Governmental reserve (low to medium/native vegetation pasture)	0/40	-	0.65	0.30-0.83	0.99966	2	0.99901
PEMG* - 23°27'S 51°14'W - PR	2,200	SF	Governmental reserve (low; matrix: pasture and agricultural areas)	1/60	0.70				1	0.02
FMA - 24°12'42"S 50°33'04"W -	217	SF	Private (medium/ reforested areas	1/60	0.73				3	0.06



ITA - 21°47'34"S 41°26'30"W - RJ	630	SF	Private (medium/sugar cane and pastures)	1/40	0.025 (0.001-0.130)	0.64	0.32-0.83	0.99967	7	0.99835
FSJU - 21°23'10"S 41°55'15"W - RJ	6.5	SF	Private (high/pastures and agricultural areas)	0/40	-	0.67	0.33-0.84	0.99984	1	0.99973
HT - 22°04'27"S 42°3'55"W - RJ	26	SF	Private/Municipal Garden (high/pasture and reforested areas of <i>Eucalyptus</i>)	0/20	-	0.60	0.09-0.82	0.99919	0	0.99919
MICO - 21°20'07"S 41°13'37"W - RJ	200	SF	Private (medium/ pasture)	0/26	-	0.65	0.23-0.84	0.99964	4	0.99765
CAR* - 21°22'40" S 41°5'1" W - RJ	1,200	SF	Governmental reserve (low/pasture and sugar cane)	0/39	-	0.66	0.34-0.80	0.99975	7	0.99831
ELP - 22°04'43"S 42°05'45"W - RJ	141	DF	Private (low/ reforested areas of <i>Eucalyptus</i>)	0/34	-	0.64	0.25-0.81	0.99965	6	0.99834
FSFI - 21°19'10"S 41°07'15"W - RJ	55	SF	Private (high/ pasture, sugar cane, agricultural areas)	2/40	0.050 (0.006-0.170)	0.64	0.13-0.85	0.99980	6	0.99859

Total per species				3/319	0.009 (0.002-0.030)	0.64	0.30-0.82	0.99966	39	0.99828
--------------------------	--	--	--	--------------	--------------------------------------	-------------	------------------	----------------	-----------	----------------

<i>Euglossa pleosticta</i> ($N_L = 6$)	Size (ha)	Vegetation type	Type of reserve (degree of disturbance/ surrounding matrix)	2N/n males	FDM (95% CI)	H_{cp}	H_{eIL}	P_{het}	null alleles	$P_{het-null}$
FD - 23°18'15.68"S 50°58'51.81"W - PR	170	SF	Private (medium to high/agricultural areas)	0/74	-	0.69	0.60-0.96	0.99999	2	0.99999
PEMG* - 23°27'S 51°14'W - PR	2,200	SF	Governmental (low/matrix: pastures and agricultural areas)	0/45	-	0.49	0.27-0.95	0.99914	0	0.99914
F2C - 22°58'55"S 51°00'W - PR	180	SF	Private (high/pastures)	0/55	-	0.55	0.19-0.90	0.99929	1	0.99929
PTF - 23°22'30"S 51°13'15"W - PR	14.6	SF	Private (high/agricultural areas)	0/20	-	0.61	0.03-0.89	0.99843	0	0.99806
AT - 23°20'S 51°08'W - PR	66	SF	Governmental park (medium/urban matrix)	0/24	-	0.51	0.17-0.94	0.99921	0	0.99921
HT-UEL - 23°19'05"S 51°12'10"W - PR	13.4	SF	Urban area (high/urban matrix)	0/51	-	0.65	0.45-0.95	0.99991	2	0.99908

Total per species				0/269	-	0.58	0.18-0.93	0.99954	5	0.99811
--------------------------	--	--	--	--------------	----------	-------------	------------------	----------------	----------	----------------

<i>Euglossa annectans</i> ($N_L = 9$)	Size (ha)	Vegetation type	Type of reserve (degree of disturbance/ surrounding matrix)	2N/n males	FDM (95% CI)	H_{cp}	H_{eIL}	P_{het}	null alleles	$P_{het-null}$
FMA - 24°12'42"S 50°33'04"W - PR	217	SF	Private (medium/ reforested areas of <i>Pinus</i> and <i>Eucalyptus</i>)	4/26	0.154 (0.040-0.350)	0.61	0.33-0.81	0.99970	1	0.99942
RNSM* - 25°09'36"S 48°18'02"W - PR	2,340	DF	Private reserve (low/native vegetation in different successional stages)	4/60	0.067 (0.020-0.160)	0.78	0.54-0.89	0.99999	4	0.99999
IS* - 25°23'11"S 48°13'57"W	6,738	DF	Governmental (low/native vegetation)	7/46	0.152 (0.060-0.290)	0.76	0.56-0.86	0.99999	0	0.99999
PNI* - 25°37'46"S 54°26'47"W	185,262	SF	Governmental (low/ native vegetation)	5/60	0.083	0.63	0.41-0.82	0.99983	1	0.99979



IC* - 25°08'48"S 47°56'47"W	22,500	DF	Governmental reserve (low/native vegetation)	3/11	(0.030-0.180) 0.272 (0.060-0.610)	0.74	0.48-0.84	0.99997	0	0.99997
Total per species				23/203	0.113 (0.070-0.170)	0.70	0.52-0.84	0.99995	6	0.99988
<i>Euglossa iopoecila</i> ($N_L = 10$)	Size (ha)	Vegetation type	Type of reserve (degree of disturbance/ surrounding matrix)	2N/n males	FDM (95% CI)	He_p	He_{iL}	P_{het}	null alleles	P_{het-null}
RNSM* - 25°09'36"S 48°18'02"W - PR	2,340	DF	Private (low/ native vegetation in different successional stages)	0/60	-	0.65	0.45-0.93	0.99999	29	0.99914
SS* - 23°46'11"S, 45°36'24"W - SP	> 30,000	DF	Governmental (low/native vegetation)	0/57	-	0.72	0.52-0.92	0.99999	13	0.99993
IB* - 23°50'39"S 45°21'23"W - SP	> 30,000	DF	Governmental (low/native vegetation)	1/57	0.017 (0.0004-0.090)	0.70	0.49-0.91	0.99999	6	0.99998
UB* - 23°21'51"S 44°49'25"W - SP	> 30,000	DF	Governmental (low /native vegetation)	0/37	-	0.66	0.46-0.93	0.99999	6	0.99996
UNI - 22°25'44"S 42°42'59"W - RJ	3,600	DF	Governmental reserve (low to medium/ native vegetation, pasture, reforested areas of <i>Eucalyptus</i>)	0/60	-	0.68	0.28-0.91	0.99999	15	0.99994
Total per species				1/271	0.004 (0.0001-0.020)	0.68	0.51-0.93	0.99999	69	0.99990
<i>Euglossa truncata</i> ($N_L = 7$)	Size (ha)	Vegetation type	Type of reserve (degree of disturbance/ surrounding matrix)	2N/n males	FDM (95% CI)	He_p	He_{iL}	P_{het}	null alleles	P_{het-null}
FD - 23°18'15.68"S 50°58'51.81"W - PR	170	SF	Private (medium to high/ pastures)	0/7	-	0.56	0.56-0.81	0.99577	1	0.99346
HT-UEL - 23°19'05"S 51°12'10"W - PR	13.4	SF	Urban area (high/urban matrix)	0/10	-	0.69	0.27-0.77	0.99958	3	0.99814
AFF - 23°19'26.27"S 51°10'20.63"W - PR	18	SF	Urban area (high/ urban matrix)	0/14	-	0.68	0.46-0.86	0.99931	7	0.99226
RF - 23°18'32.32"S 51°11'0.78"W - PR	20	SF	Urban (high/ urban matrix)	0/11	-	0.62	0.19-0.84	0.99910	5	0.99028
Total per species				0/42		0.64	0.37-0.82	0.99884	16	0.99053
ALL				34/1457	0.023 (0.016-0.030)				154	

*Reserves showing large areas of primary forests

^FSamples analyzed by Freiria et al. (2012) through of genotyping in bis-acrylamide gel, and re-analyzed herein in an automated sequencer

SF (Seasonal Semi-deciduous Forest); DF (Dense Forest); MF (Mixed Forest)



Individuals ($n = 1457$; Table I) of these six species analysed here were sampled in different studies, with some variation in methodologies between these studies. In the case of males of *El. cingulata*, odour-baits were used with the following fragrances: methyl cinnamate, vanillin, eucalyptol, benzyl acetate and methyl salicylate. Samplings of this species occurred between May 2007 and May 2009, and the males were collected using aromatic traps (for details, see Aguiar and Gaglianone, 2012). To sample the other euglossine species, aromatic traps and/or insect nets were used. To attract males of *Ef. violacea*, *Eg. pleosticta* and *Eg. truncata*, only three chemicals (eucalyptol, eugenol and vanillin) were used during the sampling, while in the case of *Eg. annectans* and *Euglossa iopoecila*, in addition to these three fragrances, another five were used to attract males: beta-ionone, benzyl acetate, methyl salicylate, benzyl benzoate and methyl cinnamate. The period of sampling varied among these five species and from site to site: a) Males of *Eufriesea violacea* were collected in November and December of 2008 and 2009 (see Freiria et al. 2012); b) *Eg. iopoecila*: between 2009 and 2013; c) *Eg. truncata* in 2008; d) *Eg. pleosticta* from 2004 to 2009; and e) *Euglossa annectans*: between 2008 and 2013. Particularly in the case of this latter species, the samplings in the five study sites occurred as follows: FMA (Monte Alegre Farm) = March/2008 - March/2010; RNSM (Salto Morato Reserve) = April/2009 - October/2010; IS (Superagui Island) = November/2011-February/2013; PNI (Iguaçu Park) = March/2012; and IC (Cardoso Island) = February/2012.

It is important to mention that the 353 males of *Ef. violacea* examined herein were those also studied by Freiria et al. (2012), but for the confirmation of diploid males, new analyses were performed on an automated sequencer, which confirmed only part of 2N males previously identified by these authors.

In general the collecting effort per area was greater than 20 hours, distributed over several days of collecting and usually involving a minimum of five days of sampling. However, for *Euglossa annectans*, in the Ilha do Cardoso State Park (IC), *Euglossa iopoecila*, in São Sebastião (SS) and Ubatuba (UB), and, for *Eufriesea violacea* in NPR (Nazaré Paulista Reserve), CPCN-Pró Mata (CPCN Reserve) and Urussanga fragment (URU), sampling was carried out on only one or two days, resulting in a sampling effort less than 15 hours per area.



2.3 DNA extraction and molecular analysis

DNA extraction from *Eufriesea violacea* (n = 353), *Eg. annectans* (n = 203) and *Eg. pleosticta* (n = 269) was performed as in Freiria et al. (2012), while DNA from males of *Eulaema cingulata* (n = 319), *Euglossa iopoecila* (n = 271) and *Euglossa truncata* (n = 42) was obtained according to Almeida et al. (2001), with minor modifications, described as follows: parts of the body (legs or thorax) were placed in micro-centrifuge tubes containing 300 µL extraction buffer (500 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH 8.0 and 1% SDS) and 5 µL K proteinase (20 µg/µL). Using small scissors, the body parts of bees were cut, held in a water bath at 63°C for two hours and then subjected to phenol-chloroform washes. The DNA obtained was re-suspended in 30 µL TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) and stored at -20°C. The concentration of DNA was measured using a DyNA Quant 200 fluorometer (Hoefer), following the quantification methodology proposed by the manufacturer. After reading, the DNA samples were diluted in water to a concentration of 5 ng/µL to then be used in the amplifications.

The genetic analyses of euglossine males from the six species herein surveyed involved genotyping at a minimum of six (*Ef. violacea* and *Eg. pleosticta*) and a maximum of 10 microsatellite loci (*Eg. iopoecila*) (Table I), using primers developed for *Eg. cordata* (Souza et al. 2007), *Eg. annectans* (Paxton et al. 2009) and *Eg. iopoecila* (Penha et al. 2014). Amplifications of the different microsatellite loci of *Ef. violacea*, *El. cingulata*, *Eg. pleosticta* and *Eg. annectans* were based on protocols of Souza et al. (2007), Paxton et al. (2009) and Freiria et al. (2012), with some modifications. PCR reactions were produced in a final volume of 5µL, including: 1x GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega), 0.5 µM of tag-F primer + 0.5 µM of R-primer mixture, 5 µM M13- primer labelled with fluorochrome, 1% of glycerol, 5 ng of DNA and 1.15 µL nuclease-free water (Promega).

Samples were amplified in thermal cyclers (PCT-100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research Inc. and Multigen LabNetBios), according to the protocol described below: 94°C for 4 minutes followed by 35 cycles of: [94°C denaturation for 40 seconds, 1 min for primer annealing at temperatures varying according to the primer and species, and extension at 72°C for 1 minute], ending with an extension at 72°C for 10 minutes. Furthermore, in the case of *Eg. iopoecila* and *Eg. truncata*, we employed a second amplification protocol: 94°C for 4 min, followed by 10 cycles de 94°C/30 s, 56°C/1 min, 72°C/1 min, followed by 25 cycles 89°C/30 s, 56°C/1 min, 72°C/1 min, with a final



extension at 72°C for 30 minutes. The primers and annealing temperatures employed in the amplification of microsatellite loci of the different species are shown in Table S1.

Sample genotyping was conducted in an automated sequencer (Applied Biosystems® 3500 XL Genetic Analyzer) and GeneScan600-LIZ (Applied Biosystems) was used as the standard marker. The sample genotypes were read using the GeneMarker 1.85 software (SoftGenetics) and checked visually. All samples that failed to amplify at any locus and all those indicating diploid males were re-amplified at least two more times. In our analyses we considered as diploid males only those cases for which heterozygous status of diploid males was confirmed in all three PCRs.

In all amplification reactions for analysis in the automated sequencer, the forward primers were modified at the 5' end with a tail (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'), according to the method proposed by Schuelke (2000), to which the M13 primer labelled with 6-FAM fluorophore (blue), NED (yellow) and HEX (green) was ligated. This methodology eliminates the need for individually labeling the forward primers of all loci (Schuelke, 2000).

2.4 Data analysis

The expected heterozygosity (H_e) - intralocus and per population – were estimated with the software package TFGPA 1.3 (Miller, 1997).

The calculation of P_{het} , i.e. a probability of the molecular marker to detect a diploid individual as heterozygous, was performed according to Souza et al. (2010). However, putative null alleles can cause difficulties in microsatellites scoring and can lead to an overestimation of P_{het} (Souza et al. 2010; Boff et al. 2014). Like these authors, to account for putative null alleles we assumed that a male lacking an allele at a locus was caused by a null allele. Thus, we performed the calculation of $P_{het-null}$ applying the formula of Boff et al. (2014). In Table S2 we show the number of samples that failed to amplify for different loci surveyed for the different species and populations.

The binomial 95% confidence interval of the proportion of diploid males was calculated according to Souza et al. (2010) and Boff et al. (2014) (on-line tool at <http://statpages.org/confint.html>).

For species in which more than five study areas were analysed for the occurrence of 2N males, the Pearson correlation index was used to test for a correlation between the size of the study areas and frequencies of diploid males. We used a Chi-



square test to test for significant difference in the frequency of diploid males sampled in our study and by Souza et al. (2010); P -values < 0.05 were considered statistically significant.

3. RESULTS

From the total of 1457 males analysed, belonging to six different euglossine species, 34 were diploid, which were found only among four species distributed as follows: *Ef. violacea* = 7; *El. cingulata* = 3; *Eg. annectans* = 23 and *Eg. iopoecila* = 1 (Table I).

Considering the frequency of diploid males in the total sample of each species, the highest frequency (11.3%) was observed for *Eg. annectans* (Table I). Actually, diploid males were found in all five populations of this species surveyed in our study. Whereas the number of 2N males of *Eg. annectans* varied only from three to seven, their frequencies varied across a larger range: from 6.7% (RNSM) to 27.3% (IC = Cardoso Island). Remarkably, among the five areas surveyed for this species, three showed frequencies of 2N males above 10%. However, for *Eg. annectans* as well the other euglossine species studied, our analyses showed no significant correlations ($P > 0.05$) between the size of the study area (forest fragment) and the number of 2N males.

Finally, with regard to P_{het} calculations, our analyses revealed that, even when null alleles were considered in our analyses ($P_{\text{het-null}}$), the power of detecting diploid males was very high (> 0.99) for all species and populations surveyed (Table I), even for *Eg. annectans*.

4. DISCUSSION/ CONCLUSION

Considering the variation in frequencies of diploid (2N) males found for the six euglossine species surveyed in this study, our findings show that generalizations concerning the frequencies of such males among this group of bees should be avoided. This view is reinforced by both in the substantial number of males of each species from different populations analysed (except for *Eg. truncata*) and by the number of microsatellite loci used in the analyses, which varied from six to ten. Contrary to Souza et al. (2010), who found only five diploid males in a total sample of 1010 individuals belonging to 27 euglossine species, we detected 34 diploid males among the 1457 analysed. Considering that both studies employed the same microsatellite molecular



markers and based their analyses mainly on the genotyping of samples in an automated sequencer, it is possible to see that a substantial difference was found between our results and those found by Souza et al. (2010). Indeed, through the Chi-square test, we found significant difference between the frequencies of 2N males of these both studies ($\chi^2 = 12.96$, $d.f = 1$; $P < 0.0004$). Except for *Eg. annectans*, the frequencies of diploid males described in our study for the different species tended to be higher than those reported by Souza et al. (2010). Although it is difficult to explain such dissimilarities between both studies, the large number of individuals analysed per species in each study is a factor to be considered. In general, although Souza et al. (2010) analysed 1010 males, for many species these authors analysed only a few individuals. In fact, the number of bees surveyed by these authors varied from 1 (e.g. *Eg. cognata*, *Eg. mourei* and *Eg. viridis*) to about 150 (e.g. *El. bombiformes*). From the 27 studied by Souza et al. (2010), 13 were represented by less than 20 individuals in the samples analysed. Also, for some species Souza et al. (2010) analysed only two or three microsatellite loci.

According to Owen and Packer (1994), in panmictic natural populations of bees the expected frequencies of 2N males are low, 10% or less. In our study, populations of five of six euglossine species surveyed revealed frequencies of diploid males lower than 10% and, thus, they would be in accordance with the expected for panmictic populations. Conversely, three of the five populations of *Eg. annectans* showed estimates of 2N males above 10%. Regarding this species Souza et al. (2010) found a diploid male in a sample of 17 males analysed, i.e., at a frequency equal to 5.9%. It should be emphasized here that our findings regarding the high frequency (27.3%) of diploid males of *Eg. annectans* found to IC, an island population, must be viewed with caution, since only 11 individuals of this island were captured and analysed.

Although it has been shown that some euglossine bees are able to cross water bodies (Dressler, 1982), a recent study showed that the sea seemed to act as a barrier to gene flow to *Eg. cordata* populations (Boff et al. 2014). These authors detected that island isolation reduced genetic diversity in populations of this species, but did not significantly elevate diploid male production. Considering our data, it is worth noting that two of three *Eg. annectans* populations which showed frequencies of diploid males above 10% were island populations.

One of the causes for an increase of diploid males in populations of Euglossini and other groups of bees is the reduction in population size, with consequent loss of allelic diversity at the sex locus (Cook, 1993; Roubik et al. 1996; Zayed et al. 2004; van



Wilgenburg et al. 2006; Paxton et al. 2009). Thus, apparently, except for *Eg. annectans*, the frequencies of diploid males detected for populations of euglossine species analysed in our study do not suggest any declines in populations of these species, since all of them showed frequencies of 2N males within the range expected for panmictic populations (see Owen and Packer, 1994). We should also consider that, in addition to null alleles, our estimates of diploid male may be elevated slightly because of overestimates of marker variability and unknown mating structure for majority of euglossine species herein studied.

All euglossine species surveyed in our study are endemic to the Atlantic Forest or show a strong association with this threatened South American forest (Faria Jr and Melo, 2007; Nemésio and Silveira, 2007; Nemésio, 2009). With less than 10% of its original cover, the Atlantic Forest is today totally fragmented, with most of its remnants having sizes less than 100 ha and under significant human interference (Ribeiro et al. 2009). It is within this highly threatening scenario that populations of different euglossine species seek resources for their survival. Undoubtedly, those most sensitive species that depend more closely on more preserved forest areas are more susceptible to loss of genetic diversity. When considering the results especially related to *Eg. annectans* and its intimate distribution with the Atlantic Forest, this species merits the focus of further studies on population genetic structure, taking also into account variation in the frequencies of 2N males.

Based on our findings, we suggest that, in addition to other euglossine species that have been pointed out as potentially more sensitive to habitat disturbance (Powell and Powell, 1987; Tonhasca et al. 2002; Giangarelli et al. 2009), *Eg. annectans* is another Euglossini species sensitive to anthropogenic interference. However, since without a more complete knowledge about different factors which can affect diploid male production in bees, such as sex allele diversity, effective population size and dispersal rate, it is difficult to suggest whether the relatively higher frequencies of diploid males of *Eg. annectans* could be due to an increased incidence of inbreeding in the studied populations of this species. Based on that, we recommend further genetic studies involving a larger number of populations of this orchid bee species to corroborate or not the hypothesis that this orchid bee species is sensitive to habitat fragmentation.

Our results for *Eg. annectans*, which revealed the occurrence of diploid males in all remnants of Atlantic Forest where this species was sampled, suggest that we should



pay more attention to populations of this species. Moreover, the results presented here indicate, regarding to frequency of diploid males in natural populations of orchid bees, that generalizations should be avoided since our findings highlighted that they are not invariably rare within this group of bees.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank: Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)/Procad (158/2007), Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Fundação O Boticário de Proteção à Natureza (FBPN) and Klabin S.A. and Biota-FAPESP for financial support; IBAMA and IAP for environmental license; Instituto Florestal de São Paulo for the license for the collections and staff of State Parks of São Sebastião, Ilhabela, Ilha do Cardoso, Ubatuba (Picinguaba), for the infrastructure and help in field work; Isabel Alves-dos-Santos, Guaraci Duran Cordeiro and Samuel Boff by donation of the specimens of *Euglossa iopoecila* from Ilhabela; and owners of private reserves for permission for the collection of bees. D.C. Giangarelli thanks CAPES for the scholarship. Silvia H. Sofia and Maria C. Gaglianone are research fellows from the CNPq. The authors are also grateful to two anonymous referees for their valuable comments, which contributed to improve the quality of this paper.

Abeilles à orchidée: une nouvelle évaluation de la rareté de mâles diploïdes dans les populations de ce groupe de pollinisateurs néotropicaux

microsatellite/ Euglossini/ Euglossa annectans/ fragments forestiers

Prachtbienen: Neue Daten zur Seltenheit diploider Männchen in Populationen dieser Gruppe neotropischer Bestäuber

Mikrosatelliten/ Euglossini/ Euglossine Bienen/ *Euglossa annectans*/ Waldfragmente



REFERENCES

- Aguiar, W.M., Gaglianone, M.C. (2012) Euglossine bee communities in small forest fragments of the Atlantic Forest, Rio de Janeiro state, southeastern Brazil (Hymenoptera, Apidae). *Rev. Bras. Entomol.* **56**, 210-219
- Almeida, F.S., Fungaro, M.H.P., Sodr , L.M.K. (2001) RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes, Pimelodidae) from the Tibagi river, Brazil. *J. Zool.* **253**, 113-120
- Beye, M., Hasselmann, M., Fondrk, M.K., Page, R.E., Omholt, S.W. (2003) The gene *csd* is the primary signal for the sexual development in the honeybee and encodes as SR-type protein. *Cell* **114**, 419-429
- 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. *Conserv. Genet.* doi:10.1007/s10592-014-0605-0
- Cook, J.M. (1993) Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. *Heredity* **71**, 421-435
- Cook, J.M., Crozier, R.H. (1995) Sex determination and population biology of the Hymenoptera. *Trends Ecol. Evol.* **10**, 281-286
- Cowan, D.P., Stahlhut, J.K. (2004) Functionally reproductive diploid and haploid males in an inbreeding hymenopteran with complementary sex determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 10374-10379
- Crozier, R.H. (1977) Evolutionary genetics of the Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* **22**, 263-288
- Dressler, R.L. (1982) Biology of orchid bees (Euglossini). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **13**, 373-394
- Elias, J., Mazzi, D., Dorn S. (2009) No need to discriminate? Reproductive diploid males in a parasitoid with complementary sex determination. *Plos One* **4**, e6024
- Faria Jr, L.R.R., Melo, G.A.R. (2007) Species of *Euglossa* (*Glossura*) in the Brazilian Atlantic forest, with taxonomic notes on *Euglossa stellfeldi* Moure (Hymenoptera, Apidae, Euglossina). *Rev. Bras. Entomol.* **51**, 275-284
- Freiria, G.A., Ruim, J.B., Souza, R.F., Sofia, S.H. (2012) Population structure and genetic diversity of the orchid bee *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae,



- Euglossini) from Atlantic Forest remnants in southern and southeastern Brazil. *Apidologie* **43**, 392-402
- Giangarelli, D.C., Freiria, G.A., Colatreli, O.P., Suzuki, K.M., Sofia, S.H. (2009) *Eufriesea violacea* (Blanchard) (Hymenoptera: Apidae): an orchid bee apparently sensitive to size reduction in forest patches. *Neotrop. Entomol.* **38**, 1-6
- Harpur, B.A., Sobhani, M., Zayed, A. (2013) A review of the consequences of complementary sex determination and diploid male production on mating failures in the Hymenoptera. *Entomol. Exp. Appl.* **146**, 156-164
- Heimpel, G.E., de Boer J.G. (2008) Sex determination in the Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* **53**, 209-230
- López-Uribe, M.M., Almanza, M.T., Ordonez, M. (2007) Diploid male frequencies in Colombian population of euglossine bees. *Biotropica* **39**, 660-662
- Mattozo, V.C., Faria, L.R.R., Melo, G.A.R. (2011) Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) in the coastal forests of southern Brazil: diversity, efficiency of sampling methods and comparison with other Atlantic forest surveys. *Pap. Avulsos Zool.* **51**, 505-515
- Milet-Pinheiro, P., Schlindwein, C. (2005) Do euglossine males (Apidae, Euglossini) leave tropical rainforest to collect fragrances in sugarcane monocultures? *Rev. Bras. Zool.* **22**, 853-858
- Miller, M.P. (1997) Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author
- Nemésio, A. (2009) Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of Brazilian Atlantic Forest. *Zootaxa* **2041**, 1-242
- Nemésio, A. (2013) Are orchid bees at risk? First comparative survey suggests declining populations of forest-dependent species. *Braz. J. Biol.* **73**, 367-374
- Nemésio, A., Silveira, F.A. (2007) Diversity and distribution of orchid bees (Hymenoptera: Apidae) with a revised checklist of their species. *Neotrop. Entomol.* **36**, 874-888
- Owen, R.E., Packer, L. (1994) Estimation of the proportion of diploid males in populations of Hymenoptera. *Heredity* **72**, 219-227
- Paxton, R.J., Zobel, M.U., Steiner, J., Zillikens, A. (2009) Microsatellite loci for *Euglossa annectans* (Hymenoptera: Apidae) and their variability in other orchid bees. *Mol. Ecol. Resour.* **9**, 1221-1223



- Penha, R.E.S., Gaglianone, M.C., Almeida, F.S., Boff, S.V., Sofia, S.H. (2014) Mitochondrial DNA of *Euglossa iopoevila* (Apidae, Euglossini) reveals two distinct lineages for this orchid bee species endemic to the Atlantic Forest. *Apidologie*, DOI: 10.1007/s13592-014-0329-7.
- Powell, A.H., Powell, G.V.N. (1987) Population dynamics of male euglossine bees in Amazonian forest fragments. *Biotropica* **19**, 176-179
- Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F.J., Hirota, M.M. (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol. Conserv.* **142**, 1141-1153
- Roubik, D.W., Hanson, P.H. (2004) Orchid bees of tropical America, 1st edn. INBio, Santo Domingo de Heredia, Costa Rica
- Roubik, D.W., Weight, L.A., Bonilla, M. A. (1996) Population genetics, diploid males, and limits to social evolution of euglossine bees. *Evolution* **50**, 931-935
- Souza, R.O., Cervini, M., Del Lama, M.A., Paxton, R.J. (2007) Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera, Apidae). *Mol. Ecol. Notes* **7**, 1352–1356
- Souza, R.O., Del Lama, M.A., Cervini, M., Mortari, N., Eltz, T., Zimmermann, Y., Bach, C., Brosi, B.J., Suni, S.; Quezada-Euán, J.J.G., Paxton, R.J. (2010) Conservation genetics of neotropical pollinators revisited: microsatellite analysis suggests that diploid males are rare in orchid bees. *Evolution* **64**, 3318-3326
- Sofia, S.H., Suzuki, K.M. (2004) Comunidades de machos de abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) em fragmentos florestais no sul do Brasil. *Neotrop. Entomol.* **33**, 693-702
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments, *Nat. Biotechnol.* **18**, 233-234
- Takahashi N.C., Peruquetti R.C., Del Lama M.A., de Oliveira Campos L.A. (2001) A reanalysis of diploid male frequencies in euglossine bees (Hymenoptera: Apidae), *Evolution* **55**, 1897–1899.
- Tonhasca, A., Blackmer, J.L., Albuquerque, G.S. (2002) Abundance and diversity of euglossine bees in the fragmented landscape of the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* **34**, 416-422
- Unruh, T.R., Messing, R.H. (1993) Intraspecific biodiversity in Hymenoptera: implications for conservation and biological control, in: Lasalle, J. and Gauld, I.D. (Eds.), *Hymenoptera and Biodiversity*, CAB International, Wallingford, pp. 27-52



-
- Van Wilgenburg, E., Driessen, G., Beukeboom, L.W. (2006) Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an "unintelligent" design? *Front. Zool.* **3**, 1-15
- Zayed, A. (2009) Bee genetics and conservation. *Apidologie* **40**, 237-262
- Zayed, A., Packer, L. (2005) Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 10742-6
- Zayed, A., Roubik, D.W., Packer, L. (2004) Use of diploid male frequency data as an indicator of pollinator decline. *Proc. R. Soc. B* **271**, S9-S1



APIDOLOGIE

Supplementary material

Orchid bees: a new assessment on the rarity of diploid males in populations of this group of Neotropical pollinators

Douglas C. Giangarelli, Gabriele A. Freiria, Dhiego G. Ferreira, Willian M. Aguiar, Rafael E.S. Penha, Alessandra N. Alves, Maria C. Gaglianone, Silvia H. Sofia *

Laboratório de Genética e Ecologia Animal, Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rod. Celso Garcia Cid, km 380, CP 10.011, 86057-990, Londrina, PR, Brazil

Table S1. Set of primers and annealing temperatures employed in the amplification of microsatellite loci of the different species orchid bee.

<i>Eufriesea violacea</i>		<i>Eulaema cingulata</i>		<i>Euglossa annectans</i>		<i>Euglossa pleosticta</i>		<i>Euglossa iopoecila</i>		<i>Euglossa truncata</i>	
Primers	Temp (°C)	Primers	Temp (°C)	Primers	Temp (°C)	Primers	Temp (°C)	Primers	Temp (°C)	Primers	Temp (°C)
* Eln12b	54	Eln1*	52	ann2**	60	Egc17*	54	ann24**	56	Egc18*	56
Eln2J*	54	Eln12b*	52	ann3**	54	Egc18*	54	ann37**	56	Egc24*	56
Eln7J*	54	Eln2J*	54	ann4**	60	Egc24*	54	Egc18*	56	Egc26*	56
* Eln12J	51	Eln10J*	54	ann6**	60	Egc26*	54	Egc26*	56	ann8**	56
Egc17*	56	Eln13*	52	ann8**	60	Egc35*	54	iop1	56	ann24**	56
Egc18*	57	Eln19J*	52	ann24**	60	Egc51*	54	iop2	56	ann28**	56
		Eln12a*	53	ann28**	60			iop3	56		
				ann37**	60			iop4	56		
				ann41**	60			iop13	56		
								iop16	56		

*Souza et al. (2007); Paxton et al. (2009)



Table S2. Number of alleles that failed to amplify at different microsatellite loci, in each population of the six orchid bee species surveyed (see Table I for details of each study site where bees were collected) in Brazilian Atlantic Forest remnants, mean expected heterozygosity (\bar{H}_e) per loci and number of alleles found for each loci.

<i>Eufriesea violacea</i>		Loci					
Population	Sampling period	Egc17	Egc18	Eln2J	Eln7J	Eln12J	Eln12b
FSM	2009				2		
PEMG	2008/2009					1	
FMA	2008/2009					1	
NPR (ESCAS)	2009	3	2	1	3		1
CPCN	2009	1			2	1	
URU	2009					1	
2N		-	2	-	-	-	5
\bar{H}_e		0.74	0.84	0.59	0.80	0.81	0.63
Allele number		9	10	7	9	3	7

<i>Eulaema cingulata</i>		Loci						
Population	Sampling period	Eln2J	Eln1	Eln13	Eln19J	Eln10J	Eln12b	Eln12a
CAB			1	2			3	
UNI		1					1	
ITA		5						2
FSJU			1					
HT								
MICO		1	1				2	
CAR			1				4	2
ELP								
FSFI			3				2	1



2N	-	3	-	-	-	-	-
\bar{H}_e	0.82	0.74	0.30	0.34	0.71	0.75	0.76
Allele number	10	8	4	3	5	6	5

Euglossa pleosticta

Loci

Population	Sampling period	Egc17	Egc18	Egc24	Egc26	Egc35	Egc51
FD	2004 to 2008				1		1
PEMG	2004 to 2008						
F2C	2004 to 2008				1		
PTF	2004 to 2008						
AT	2004 to 2008						
HT	2004 to 2008	1	1				

2N	-	-	-	-	-	-	-
\bar{H}_e	0.93	0.89	0.18	0.47	0.47	0.67	
Allele number	4	3	3	5	7	3	

Euglossa annectans

Loci

Population	Sampling period	ann2	ann3	ann4	ann6	ann8	ann24	ann37	ann41
FMA							1		
RNSM			3	1					
IS									
PNI			1						
IC									
2N		5	4	7	-	2	5	-	-
\bar{H}_e		0.70	0.52	0.83	0.58	0.79	0.84	0.64	0.58
Allele number		7	5	15	7	17	18	12	8



<i>Euglossa iopoecila</i>		Loci									
Population	Sampling period	ann24	ann37	Egc26	Egc18	iop1	iop2	iop3	iop4	iop13	iop16
RNSM			8	2	1	8	1	2	2	3	4
SS			2		1	3	1	1	1	2	3
IB				1		3		2	2		
UB						2				1	3
UNI		3	1	3		6		1	1		1
2N		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
\bar{H}_e		0.75	0.84	0.54	0.53	0.93	0.72	0.91	0.86	0.63	0.51
Allele number		12	15	9	6	21	7	33	17	11	4

<i>Euglossa truncata</i>		Loci					
Population	Sampling period	ann8	ann24	ann28	Egc18	Egc24	Egc26
FD				1			
HT		1		2			
AFF		1	4	2			
RF		2	1	2			
2N		-	-	-	-	-	-
\bar{H}_e		0.74	0.82	0.50	0.57	0.79	0.37
Allele number		9	14	3	12	4	5

No diploide male detected =



CONCLUSÕES



Conclusões

- ✓ A riqueza amostrada nas duas fitofisionomias da Ilha do Superagui mostrou-se significativamente maior na Floresta Ombrófila Densa do que na Restinga, indicando que a vegetação deve ser um fator importante na composição e riqueza da fauna de abelhas Euglossini mesmo em áreas localizadas geograficamente muito próximas.
- ✓ A estrutura de comunidades de Euglossini pode variar consideravelmente entre duas fitofisionomias distintas localizadas em uma mesma área.
- ✓ A fauna da Ilha do Superagui se mostrou muito similar à área do continente localizada na Reserva Natural Salto Morato (RNSM), mas com diferenças relevantes na estrutura de comunidades presentes nas áreas de Floresta Ombrófila Densa destas duas áreas.
- ✓ Os resultados corroboram os obtidos em um estudo prévio realizado em uma área no continente (RNSM) na mesma região, indicando uma riqueza de Euglossini para a região da APA de Guaraqueçaba inferior às áreas próximas localizadas em regiões norte e sul do litoral de São Paulo, em latitudes menores. Contudo, confirmam uma riqueza maior ao previamente esperado para a região estudada.
- ✓ Dentro do conjunto de essências artificiais disponibilizadas aos machos euglossíneos, *Euglossa annectans* se mostrou a espécie mais generalista em relação à busca de compostos aromáticos, visitando uma maior variedade de fragrâncias para a composição de seus *blends* aromáticos.
- ✓ As medidas de similaridade na exploração de recursos pelas diferentes espécies de Euglossini e de amplitude e sobreposição de nicho se mostraram informativas para o maior conhecimento da forma como as diferentes espécies de Euglossini exploram os compostos aromáticos em um mesmo ambiente.



- ✓ Salicilato de metila se mostrou uma fragrância de grande importância para *Euglossa roderici*, uma espécie altamente endêmica ao Corredor de Biodiversidade da Serra do Mar, tendo sua escolha por esta espécie de Euglossini sido determinante para a menor sobreposição de nicho entre esta espécie e as demais espécies deste grupo de abelhas em duas áreas de Floresta Ombrófila Densa da Mata Atlântica.
- ✓ Para uma mesma área e mesma estação do ano, as abundâncias de populações de algumas espécies de Euglossini, a exemplo de *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roderici* na Ilha do Superagui, podem variar em períodos relativamente curtos de tempo, enquanto que de outras espécies podem permanecer mais estáveis em número de indivíduos em atividade.
- ✓ *Euglossa annectans* revelou elevadas taxas de machos diploides em relação a outras espécies de Euglossini já analisadas, sugerindo que esta espécie é potencialmente mais sensível a perturbações no ambiente ou tenha populações menores em comparação com outras espécies.
- ✓ As análises envolvendo o estudo de machos diploides indicam que generalizações sobre as frequências destes machos em populações de diferentes espécies de Euglossini devem ser evitadas.
- ✓ O presente trabalho adiciona informações inéditas e relevantes sobre a ecologia e genética de abelhas Euglossini presentes na APA de Guaraqueçaba, contribuindo para um maior conhecimento das comunidades e populações deste grupo de abelhas presentes no Corredor de Biodiversidade da Serra do Mar.

